

Medicinska mikrobiologija

Praktikum za vježbe za studente Dentalne medicine

Marija Tonkić i suradnici

UDŽBENICI SVEUČILIŠTA U SPLITU

MANUALIA UNIVERSITATIS STUDIORUM SPALATENSIS

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
KATEDRA ZA MEDICINSKU MIKROBIOLOGIJU I PARAZITOLOGIJU

Medicinska mikrobiologija

Praktikum za vježbe za studente Dentalne medicine
2. dopunjeno izdanje
2023.

Marija Tonkić i suradnici

Split, 2023.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| Predgovor..... | 7 |
| 1. VJEŽBA. Uupoznavanje s mikrobiološkim laboratorijem i osnovnim principima sigurnosnog rada. Laboratorijske infekcije. Mikroskopiranje osnovnih bakterijskih oblika. Bojanja u bakteriologiji. Uzgoj bakterija: vrste podloga, izgled kolonija. (Katarina Šiško-Kraljević) | 9 |
| 2. VJEŽBA. Određivanje antimikrobne osjetljivosti bakterija (metoda disk-difuzije, dilucija u bujonu, E-test). Serološke reakcije i dokaz protutijela na bakterijske antigene. (Marina Radić) | 21 |
| 3. VJEŽBA. Uzimanje i nasađivanje brisa nosa i ždrijela. Principi kultivacije i identifikacije piogenih koka (Žana Rubić) | 31 |
| 4. VJEŽBA. Kultivacija i identifikacija rodova <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Legionella</i> . (Ivana Goić-Barišić) | 39 |
| 5. VJEŽBA. Identifikacija i serotipizacija enterobakterija. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (Anita Novak) | 45 |
| 6. VJEŽBA. Uzimanje i prijenos uzoraka za izolaciju anaerobnih bakterija. Principi anaerobne kultivacije. Mikroskopska slika – <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> . (Žana Rubić) | 53 |
| 7. VJEŽBA. Obrada uzoraka za dokazivanje mikobakterija. <i>Corynebacterium</i> -uzgoj, bojanje i mikroskopija. (Ivana Goić-Barišić)..... | 59 |
| 8. VJEŽBA. Kultivacija i identifikacija gljiva. (Anita Novak) | 65 |
| 9. VJEŽBA. Metode izravne dijagnostike virusnih bolesti. Uzimanje kliničkog materijala za izravnu virološku dijagnostiku, transport i pohrana. Sustavi za izolaciju virusa. (Katarina Šiško-Kraljević) | 71 |
| 10. VJEŽBA. Serološke metode u dijagnostici virusnih bolesti. (Marija Tonkić) | 77 |
| 11. VJEŽBA. Fiziološka flora čovjeka. Mikrobiološka dijagnostika parodontalne bolesti. (Marija Tonkić) | 83 |

POPIS AUTORA

prof. dr. sc. GOIĆ BARIŠIĆ, IVANA, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije,
Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Klinički bolnički centar Split,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

doc. dr. sc. KRALJEVIĆ-ŠIŠKO, KATARINA, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije,
Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko- dalmatinske županije,
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija

doc. dr. sc. NOVAK, ANITA, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije,
Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Klinički bolnički centar Split,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

RADIĆ, MARINA, dr. med., specijalist kliničke mikrobiologije,
Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Klinički bolnički centar Split

RUBIĆ, ŽANA, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije,
Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Klinički bolnički centar Split

prof. dr. sc. TONKIĆ, MARIJA, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije,
Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Klinički bolnički centar Split,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

PREDGOVOR

Drugo dopunjeno izdanje Praktikuma za vježbe za studente Dentalne medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu nastalo je nakon što je iz tiska izašao novi udžbenik Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, koji se od ove akademske godine koristi kao službena literature za predmet Osnove mikrobiologije na studiju Dentalna medicina na Medicinskom fakultetu u Splitu.

Ovaj praktikum u potpunosti je usklađen s prijevodom 5. izdanja udžbenika Osnove mikrobiologije za dentalnu medicine, Placebo 2022.

U Splitu, studeni 2023.

Urednice prijevoda 5. izdanja udžbenika

Ivana Goić Barišić

Marija Tonkić

VJEŽBA 1

Upoznavanje s mikrobiološkim laboratorijem i osnovnim principima sigurnosnog rada. Laboratorijske infekcije. Mikroskopiranje osnovnih bakterijskih oblika. Bojenja u bakteriologiji. Uzgoj bakterija: vrste podloga, izgled kolonija.

Katarina Šiško-Kraljević

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je ponoviti teoretsko znanje o mikrobiološkoj laboratorijskoj dijagnostici (udžbenik L. Samaranyake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Prvi dio: Opća mikrobiologija, poglavlje 6. str. 51-56).

1. UPOZNAVANJE S MIKROBIOLOŠKIM LABORATORIJEM I OSNOVNIM PRINCIPIMASIGURNOSNOG RADA

U mikrobiološkom laboratoriju se radi s umnoženim živim mikroorganizmima, uzročnicima zaraznih bolesti u ljudi. Stoga rad u mikrobiološkom laboratoriju nosi određene opasnosti po zdravlje djelatnika te je vrlo važno pridržavati se načela dobre laboratorijske prakse.

OSNOVNA PRAVILA PONAŠANJA U LABORATORIJU SU:

- U laboratoriju treba nositi odgovarajuću zaštitnu odjeću (radni mantil) i zatvorenu obuću.
- Prije ulaska u vježbaonicu/laboratorij treba se presvući u radnu odjeću (zaštitni mantil), a sve osobne predmete (torbu, knjige, mobitele, kaput i sl.) treba ostaviti u garderobi. U vježbaonicu se smije ponijeti samo ovaj praktikum, olovke i bojice.
- Zadnji student koji izlazi iz garderobe zaključava vrata i ključ ostavlja na za to predviđeno mjesto u vježbaonici.
- Po potrebi se, u dogovoru s asistentom, treba dodatno zaštititi rukavicama (pri radu s krvlju i drugim tjelesnim tekućinama) ili drugim osobnim zaštitnim sredstvima (zaštitne naočale, maske i sl.).
- Ne smije se raditi ako osoba ima otvorene rane ili posjekotine. Potrebno ih je adekvatno prekriti i zaštititi (flaster + rukavice).
- Zbog rada s plamenicima potrebno je dugu kosu vezati u rep.
- Ne smije se ostavljati osobne predmete (npr. naočale, mobitele) na radnoj površini.
- Za vrijeme rada se ne smije doticati oči, nos ni usta. U laboratoriju se ne smije doticati kontaktne leće.
- U laboratoriju se ništa ne smije stavljati u usta - ne smije se jesti, piti ni pušiti!
- Predmetna stakla, igle i druge oštre instrumente nakon upotrebe treba odbaciti u posebne, za to namijenjene, posude s dezinficijensom.
- Na radnu površinu se ne smije odlagati kontaminirane predmete (eze).
- Žičane mikrobiološke ušice (eze) treba sterilizirati plamenom prije i poslije svake upotrebe.
- Sve upotrijebljeno (eze, boje i dr.) treba vraćati na mjesto.
- O svakoj incidentnoj situaciji (prolijevanje zaraznog materijala i sl.) treba izvijestiti asistenta kako bi se poduzele primjerene mjere.

PRAKTIKUM ZA VJEŽBE ZA STUDENTE DENTALNE MEDICINE

- Po završetku vježbe treba ugasiti mikroskop i vratiti sve ploče s bakterijskim kulturama i trajne preparate na predviđeno mjesto (prema uputama voditelja).
- Iz laboratorija se ne smije iznositi podloge, opremu ni bakterijske kulture.
- Prije izlaska iz laboratorija ruke treba dobro oprati sapunom i tekućom vodom (vidi upute) te osušiti papirnatim ručnikom.

IZJAVA: Pročitao/la sam i razumio/jela ove upute i suglasan/sna sam pridržavati ih se u radu.

Potpis:

Datum:

UPUTE ZA PRANJE RUKU:

- Ruke navlažiti toplom tekućom vodom i nanijeti tekući sapun.
- Trljati dlanom o dlan.
- Dlanom desne ruke trljati dorzum šake lijeve ruke i obratno.
- Ispreplesti prste te dobro istrljati područja između prstiju.
- Šakama obuhvatiti prste suprotne ruke i dobro istrljati vrhove prstiju.
- Kružnim pokretima trljati palac lijeve ruke u desnom dlanu i obratno.
- Isprati ruke pod mlazom tekuće tople vode.
- Osušiti ruke papirnatim ručnikom.
- Upotrijebljenim papirnatim ručnikom zatvoriti slavinu.

2. MIKROSKOPIRANJE OSNOVNIH BAKTERIJSKIH OBLIKA. BOJENJA U BAKTERIOLOGIJI.

2. 1. Upoznavanje s mikroskopom – dijelovi mikroskopa

OKULARI: Dio mikroskopa kroz kojeg se gleda, zapravo se radi o nizu leća koje povećavaju 10x. Naši mikroskopi su binokularni, tj. imaju dva okulara što omogućava mikroskopiranje s oba oka. Oči treba opustiti kao da promatramo predmet udaljen 5-10 metara od nas. Međusobnu udaljenost okulara treba namjestiti prema očnom razmaku osobe koja mikroskopira. Lijevi okular ima mogućnost korekcije razlike očnih dioptrija. Najbolje je na početku rada namjestiti prsten lijevog okulara u neutralan položaj (na „0“).

OBJEKTIVI: Dio mikroskopa smješten neposredno iznad uzorka, sustav leća koje prikupljaju svjetlost koja je prošla kroz preparat i usmjerava je kroz tubus u okulare. Naši mikroskopi imaju četiri objektiva koji imaju različita povećanja. To su „suhi“ objektivi koji povećavaju 4x (crveni), 20x (žuti) i 40x (plavi) teimerziona objektivi koji povećava 100x, a označen je crnom i bijelom linijom. Suhi objektivi se koriste za mikroskopiranje nativnih, nebojenih preparata. Imerziona objektivi se koriste za mikroskopiranje bojenih preparata tako da se prvo na preparat kapne kapljica imerzionog sredstva (cedrovo ulje, anisol i sl.) u koju se zatim uroni imerziona objektivi.

STOLIĆ: Ravna površina s otvorom u sredini na koju se postavlja preparat. Stolić je pomičan uz pomoć vijaka koji se nalaze s desne donje strane stolića, učvršćeni preparat se može pomicati gore - dolje i lijevo - desno što olakšava detaljno pretraživanje.

KONDENZOR: Sustav leća ispod stolića mikroskopa koji skuplja svjetlo od izvora (lampe) i fokusira ga na uzorak. Na kondenzoru se nalazi dijafragma (blenda) kojom se može regulirati količina svjetlosti usmjerena na preparat. Najbolje je blendu namjestiti na oznaku u skladu s korištenim objektivom.

VIJAK ZA POMICANJE KONDENZORA: Ispod stolića s lijeve strane nalazi se mali vijak kojim se kondenzor može pomicati gore-dolje. Pri mikroskopiranju nativnih preparata kondenzor treba biti postavljen u niži, a kod gledanja obojenih preparata u viši položaj.

IZVOR SVJETLA: Lampa se pali na prekidaču desno, a jačina svjetla se može regulirati uz pomoć vijka.

MAKROVIJAK I MIKROVIJAK: Vijci za grubo i fino fokusiranje slike koji reguliraju udaljenost objektiva od preparata. Nalaze se s obje strane mikroskopa.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1. Na shemu (Slika 1. 1.) upišite nazive dijelova mikroskopa.



Slika 1. 1. Binokularni svjetlosni mikroskop

2. 2. Mikroskopiranje - postupak

Prije mikroskopiranja:

- Uključiti mikroskop.
- Provjeriti lijevi okular i namjestiti ga u neutralan položaj.
- Okulare razmaknuti sukladno svom očnom razmaku.
- Postaviti i učvrstiti preparat na stolić mikroskopa.

Mikroskopiranje nativnih (neobojenih) preparata

- Kondenzor pomoću vijka spustiti dolje.
- Blendu kondenzora maksimalno zatvoriti (namjestiti na 10x).
- Postaviti žuti objektiv (10x) iznad uzorka i gledajući sa strane makrovijkom maksimalno primaknuti objektiv preparatu.
- Gledajući kroz okulare, makrovijkom odmicati okular dok uzorak ne dođe u fokus.
- Mikrovijkom izoštriti sliku.
- Prebaciti na plavi objektiv (40x) i po potrebi blendu kondenzora otvoriti.
- Mikrovijkom izoštriti sliku.
- Sustavno pregledati čitavu površinu preparata ispod pokrovnog stakla

Mikroskopiranje obojenih preparata

- Prvo pregledati čitavu površinu preparata uz manje povećanje (10 ili 40x). Izabrati dio preparata u kojem su stanice u tankom sloju.
- Kondenzor podignuti bliže preparatu i blendu maksimalno otvoriti (namjestiti na 100x).
- Kapnuti malu kap anisola na sredinu preparata.
- Uroniti crno-bijeli objektiv (100x) u anisol i mikrovijkom izoštriti sliku.

Ukoliko mikrovijkom ne uspijevate naći sliku, treba postupiti na slijedeći način:

- Gledajući sa strane, makrovijkom maksimalno primaknuti objektiv (100x) preparatu.
- Vrh objektiva treba biti uronjen u anisol i uvučen. VAŽNO: Na znak otpora stati, u suprotnom ćete slomiti preparat i oštetiti leću objektiva!
- Gledajući kroz okulare, makrovijkom podizati okular dok uzorak ne dođe u fokus.
- Mikrovijkom izoštriti sliku

2. 3. Mikroskopiranje – interpretacija

Pri interpretaciji mikroskopskih preparata potrebno je uočiti o kakvom se preparatu radi (neobojeni ili obojeni), a za obojene preparate prepoznati vrstu bojenja.

Kod jednostavnih bojenja svi elementi mikroskopske slike bit će obojeni istom bojom:

- metilensko modrilo: sve bakterije i stanični elementi su modro obojeni
- karbol fuksin: sve bakterije i stanični elementi su crvene boje

Kod složenih bojenja različiti elementi slike poprimit će različitu boju ovisno o svojstvima stanične stijenke:

- Gram bojenje:
 - gram-pozitivne bakterije i kvasci su ljubičasto-modri
 - gram-negativne bakterije i ostali stanični elementi (epitelne stanice, leukociti) su ružičasto-crveni
- Bojenje po Ziehl-Neelsenu:
 - acido-rezistentne bakterije su crvene boje
 - sve ostale bakterije i ostali stanični elementi (epitelne stanice, leukociti) su plavo-modro obojeni.

Promatrajući pojedinačne izdvojene bakterije treba uočiti karakterističnu morfologiju i raspored mikroorganizama.

- Osnovni oblici bakterija su:
 - o okrugle bakterije (koki), kokobacili, štapičaste bakterije (bacili), filamenti
- U odnosu na središnju os, štapičaste bakterije mogu biti:
 - ravne, zavijene, poput galebovih krila, spiralne.

- Neke gram-pozitivne bakterije mogu imati spore:
 - spore mogu biti uže ili šire od tijela bakterije
 - spore mogu biti smještene centralno, supterminalno i terminalno
- Neke bakterije neravnomjerno primaju boju:
 - npr. metakromatska zrnca
- Bakterije mogu biti međusobno razmještene na različite načine:
 - nepravilan raspored, parovi, tetrade, grozdovi, lanci, palisade, V i L oblici, nalik kineskim slovima

PRIMJER OPISA MIKROSKOPSKE SLIKE:

U preparatu obojenom po Gramu vide se gram-pozitivni koki u parovima zašiljenih vrhova što odgovara Streptococcus pneumoniae ili gram-negativni bacili što bi odgovaralo enerobakteijama ili gram-pozitivni sporogeni bacili u lancima, što bi odgovaralo Bacillus spp.

Zadatak 2. Izrada i mikroskopiranje nativnog preparata.

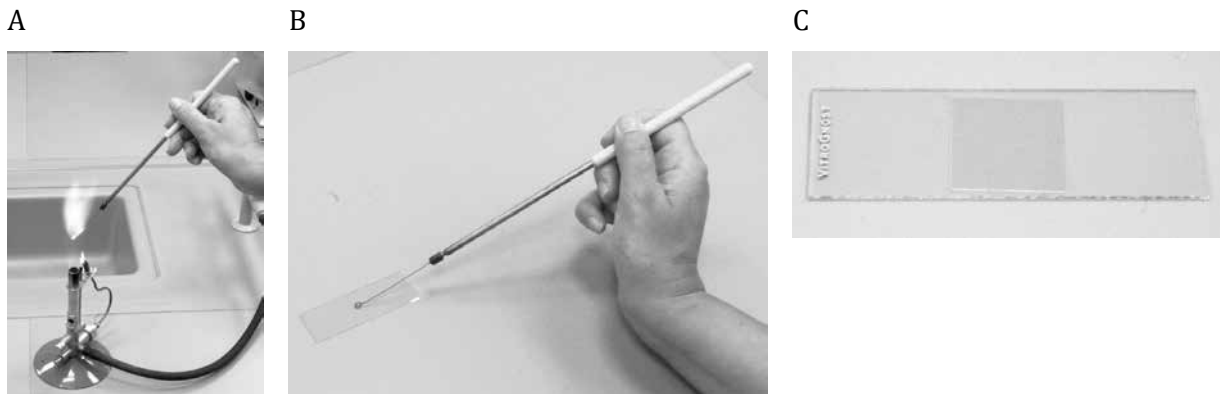
Potreban materijal:

- epruveta sa sedimentom urina
- predmetna stakalca
- pokrovna stakalca
- mikrobiološka ušica (eza)
- posude s dezinficijensom za odbacivanje preparata

Postupak:

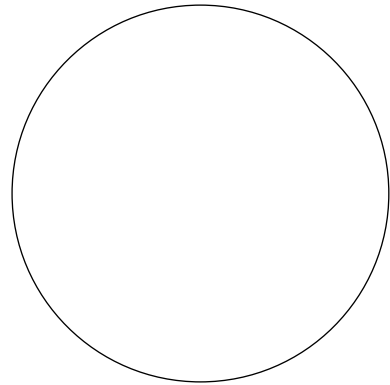
1. Spaljenom i ohlađenom ezom prebaciti kap sedimenta urina napredmetno stakalce (Slike 1. 2. A i B).
2. Spaliti ezu i vratiti je u stalak.
3. Kap urina prekriti pokrovnim stakalcem (Slika 1. 2. C).
4. Pažljivo staviti preparat na mikroskop i gledati pod povećanjem 10 i 40x.
5. Opisati i nacrtati sliku.
6. Nakon završetka preparat odbaciti u posudu s dezinficijensom.

(S preparatima rukovati oprezno, riječ je o zaraznom materijalu!)



Slika 1. 2. (A) Sterilizacija mikrobiološke ušice (eze) plamenom. (B) Pravilno rukovanje ezom. (C) Nativni preparat

Opis slike:



Zadatak 3. Izrada i mikroskopiranje obojenih preparata.

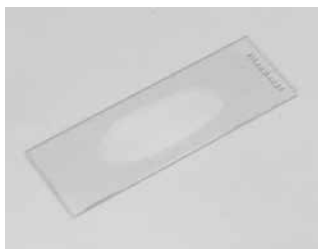
Potreban materijal:

- epruveta sa sedimentom urina
- predmetna stakalca
- mikrobiološka ušica (eza)
- plamenik
- boje: karbol fuksin i metilensko modrilo
- posude s dezinficijensom za odlaganje preparata

Postupak:

1. Spaljenom i ohlađenom ezom prebaciti kap sedimenta urina na predmetno stakalce (Slike 1. 2. A i B).
2. Napraviti razmaz po sredini predmetnice (Slika 1. 3. A).
3. Preparat ostaviti da se suši na za to predviđeno mjesto.
4. Osušeni preparat fiksirati provlačenjem kroz plamen 2-3 puta (Slika 1. 3. B).
5. Bojati preparat tako da jedan student (u paru sa susjednim kolegom/icom), oboji svoj preparat karbol fuksinom, a drugi student iz para oboji svoj preparat metilenskim modrilom.
6. Staviti osušeni i fiksirani preparat na rešetku na sudoperu.
7. Pipetom nanijeti dovoljno boje da prekrije razmaz (Slika 1. 3. C)

A



B



C



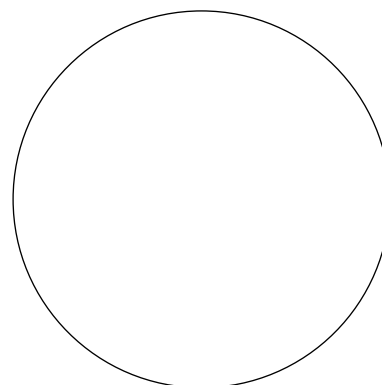
Slika 1. 3. (A) Pravilno napravljen razmaz. (B) Fiksiranje preparata plamenom.
(C) Nanošenje boje na preparat.

8. Ostaviti da se boja 15 minuta.
9. Isprati vodovodnom vodom i ostaviti da se suši (Slika 1. 4. A i B).
10. Vrlo je važno da preparat bude potpuno suh prije mikroskopiranja, u suprotnom nije moguće izoštriti sliku.
11. Osušeni, obojeni preparat gledati uz pomoć imerzionog objektiva i imerzionog ulja (povećanje 100x).
12. Opisati i nacrtati sliku oba preparata.
13. Nakon završetka preparat odbaciti u posudu s dezinficijensom

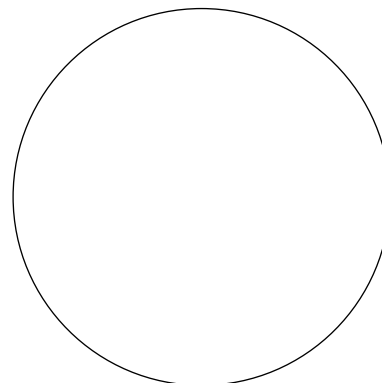


Slika 1. 4. (A) Ispiranje preparata. (B) Sušenje preparata.

Opis slike:



Opis slike:

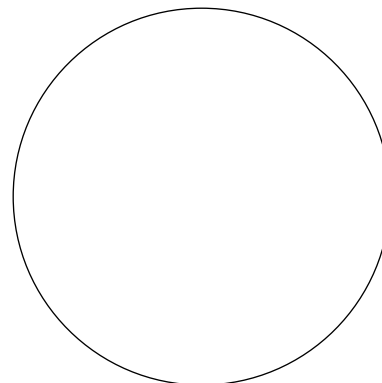


Zadatak 4. Mikroskopiranje gotovog preparata obojenog po Gramu.

Opisati i nacrtati sliku preparata.

NAPOMENA: Nakon završetka ovaj preparat NE odbaciti u posudu s dezinficijensom.

Opis slike:



3. UZGOJ BAKTERIJA: VRSTE PODLOGA, IZGLED KOLONIJA

Za uzgoj i izolaciju bakterija koriste se različite hranjive podloge, a izgled kolonija temelj je klasiifikacije i identifikacije bakterijskih vrsta

3. 1. Vrste podloga

Podloge se prema konzistenciji mogu podijeliti u: krute, polukrute i tekuće.

Podloge se prema konzistenciji mogu podijeliti u: krute, polukrute i tekuće. Prema sastavu se podloge dijele u jednostavne (obični hranjivi agar, HA) i obogaćene (krvni agar, KA; čokoladni agar, ČA). Ovo su neselektivne podloge na kojima raste većina bakterija. Podloga za izradu antibiograma (Müller-Hinton agar, MH) je također neselektivna.

Za izolaciju bakterija iz primarno nesterilnih uzoraka u kojima se mogu naći brojne bakterijske vrste koriste se selektivne i diferencijalne podloge (npr. CLED i SS agar)

- CLED agar (cistin laktoza elektrolit-deficijentni agar) je diferencijalna podloga koja se najčešće koristi za izolaciju bakterija iz urina. Nije selektivna, na njoj rastu i gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Od metaboličkih svojstava na njoj se očitava sposobnost razgradnje laktoze
- Salmonella-Shigella (SS) agar je selektivna i diferencijalna podloga koja se koristi za izolaciju bakterija rodova Salmonella i Shigella iz kliničkih uzoraka. Rast većine gram-pozitivnih i mnogih gram-negativnih bakterija inhibiran je zbog dodatka žučnih soli, te boja (brilijantno zeleno i neutralno crveno). Dodatak laktoze u podlogu omogućuje razlikovanje mikroorganizama koji fermentiraju laktozu od onih koji nemaju tu sposobnost, a natrijev tiosulfat i željezni citrat omogućavaju prepoznavanje mikroorganizama koji produciraju H₂S.

Osim hranjivih tvari, za uspješno razmnožavanje bakterija potrebno je osigurati i odgovarajući sastav plinova u zraku (aerobni, anaerobni, mikroaerofilni uvjeti), temperaturu (inkubatori na 35±2°C, na 42°C) te vrijeme (od 18 h do 12 tjedana). Umnožavanjem jedne bakterije stvara se kolonija sastavljena od klonova iste vrste.

3. 2. Izgled kolonija

Pri opisivanju kolonija na krutim podlogama važno je izabrati jednu izdvojenu koloniju koja je imala optimalne uvjete za rast i promotriti njezine karakteristike koristeći se niže navedenim ključem za interpretaciju.

Na svim podlogama se opisuju osnovne značajke kolonija (VORP):

- **Veličina**/promjer u milimetrima:
 - velika (> 1 mm),
 - srednja (= 1 mm),
 - mala (< 1 mm)
- **Oblik**:
 - točkaste,
 - okrugle,
 - nitaste,
 - nepravilne
- **Rub**:
 - ravan,
 - valovit,
 - nazubljen,
 - kao izgrizen
- **Površina**:
 - plosnata,
 - uzdignuta,
 - konveksna,
 - s centralnim uzdignućem,
 - s centralnim uleknućem.

Pigmentiranost kolonija se opisuje isključivo na podlogama bez dodatka indikatora, kao što su: obični hranjivi agar (HA), krvni agar (KA) te Müller- Hinton agar (MH) koji se koristi za izradu antibiograma.

Na **krvnom agaru** se obvezno opisuje **hemoliza**. Tri su tipa hemolize:

- alfa hemoliza – djelomična razgradnja krvi oko kolonije s promjenom boje podloge u zelenu, eritrociti su sačuvani, a hemoglobin je reduciran u methemoglobin.
- beta hemoliza – eritrociti oko kolonije su potpuno razgrađeni, agar gubi crvenu boju i postaje bistar poput običnog hranjivog agara.
- gama hemoliza – nema razgradnje krvi oko kolonije, nema lize ni diskoloracije eritrocita

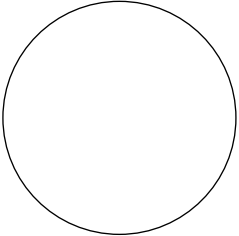
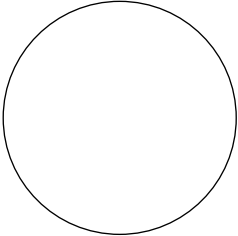
Na diferencijalnim se podlogama (SS, CLED) očitavaju metabolička svojstva bakterija:

- **CLED agar** (podloga je plavkaste boje)
 - žute kolonije – laktoza pozitivne (L+)
 - bezbojne, plavkaste kolonije – laktoza negativne (L-)
- **Salmonella-Shigella (SS) agar**
 - crvene kolonije – laktoza pozitivne (L+)
 - bezbojne kolonije – laktoza negativne (L-)
 - crna točka u sredini kolonije - H₂S pozitivno (H₂S+)
 - nema crne točke - H₂S negativno (H₂S-).

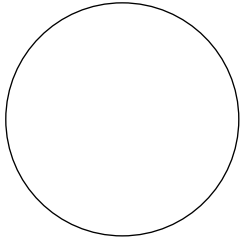
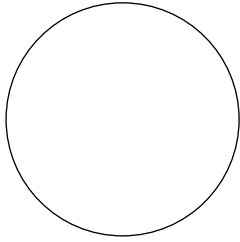
Za svaku koloniju na SS agaru treba očitati oba navedena svojstva (npr. *Citrobacter* spp. stvara crvene kolonije s crnom točkom što opisujemo kao L+ i H₂S+).

Zadatak 5. Opis kolonija.

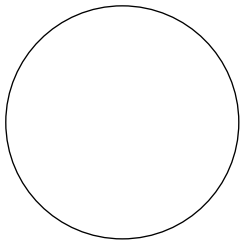
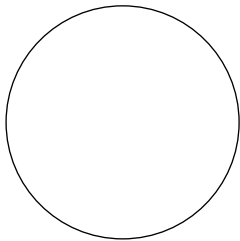
A. Promotriti pojedinačnu izdvojenu koloniju na hranjivom agaru, nacrtati je i opisati njezine značajke:

| Hranjivi agar | | |
|---------------|---|---|
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| Veličina | | |
| Oblik | | |
| Rub | | |
| Površina | | |
| Pigment | | |
| |  |  |

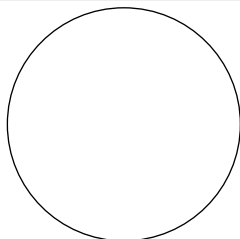
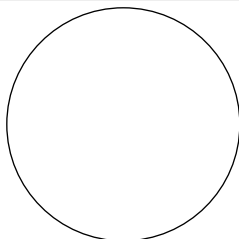
B. Promotriti pojedinačno izdvojenu koloniju na krvnom agaru, nacrtati je i opisati njezine značajke:

| Krvni agar | | |
|------------|---|--|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Veličina | | |
| Oblik | | |
| Rub | | |
| Površina | | |
| Hemoliza | | |
| Pigment | | |
| |  |  |

C. Promotriti pojedinačno izdvojenu koloniju na krvnom agaru, nacrtati je i opisati njezine značajke:

| Krvni agar | | |
|------------|---|--|
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| Veličina | | |
| Oblik | | |
| Rub | | |
| Površina | | |
| Hemoliza | | |
| Pigment | | |
| |  |  |

D. Promotriti pojedinačno izdvojenu koloniju na SS agaru, nacrtati je i opisati njezine značajke:

| SS agar | | |
|----------------------|---|---|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella spp.</i> |
| Veličina | | |
| Oblik | | |
| Rub | | |
| Površina | | |
| Metaboličko svojstvo | | |
| |  |  |

Zadatak 6. Pranje ruku-kultivacija otisaka prstiju

- Sterilnu ploču krvnog agara označiti flomasterom. Upisati svoje ime, datum te po sredini povući crtu (pisati na reverznoj strani agara, ne po poklopcu).
- Na jednu polovicu ploče upisati „PRIJE“, a na drugu „POSLIJE“.
- Dignuti poklopac i na dio agara označen s „PRIJE“ ostaviti otiske prstiju neoprane dominantne ruke.
- Vratiti poklopac i odložiti agar.
- Oprati ruke po uputama i na kraju utrljati alkoholni antiseptik na ruke.
- Paziti da se ništa ne dotiče dominantnom rukom.
- Nedominantnom rukom opet odignuti poklopac s ploče i ostaviti otiske dominantne ruke na dio agara označen s „POSLIJE“.

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 2

1. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE OSJETLJIVOSTI BAKTERIJA (METODA DISK-DIFUZIJE, DILUCIJA U BUJONU, E-TEST)

Marina Radić

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti poglavlje o antimikrobnom liječenju (udžbenik L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Prvi dio: Opća mikrobiologija, poglavlje 7. str. 69-80).

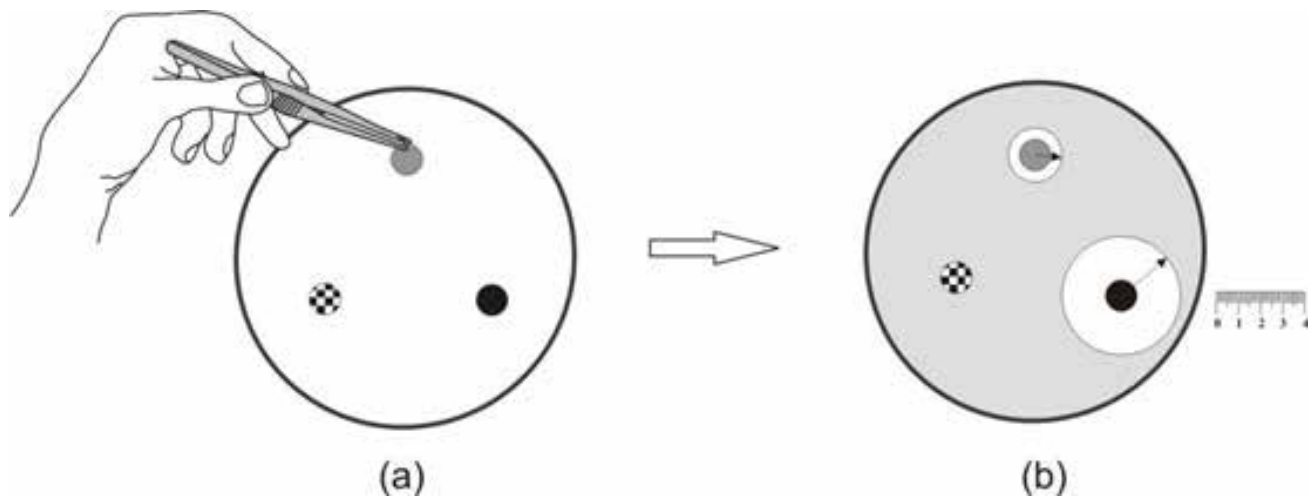
UVOD

Antibiotik je kemijski spoj koji inhibira rast bakterija (bakteriostatik) ili ih ubija (baktericid) uz minimalnu štetu za domaćina. S obzirom da ne postoji univerzalni antibiotik koji bi podjednako učinkovito djelovao na sve poznate patogene, prilikom odabira antibiotika za liječenje potrebno je odabrati onaj s maksimalnim učinkom na bakteriju koja je uzročnik infekcije. U mikrobiološkim laboratorijima rutinski se može ispitivati antimikrobna osjetljivost bakterija, a testovi koji se primjenjuju su dobro standardizirani. Izbor antimikrobnih lijekova za testiranje osjetljivosti ovisi o određenoj vrsti ili rodu bakterija, odnosno vrsti biološkog uzorka. Često je dovoljno testirati samo jednog predstavnika iz određene skupine antimikrobnih lijekova (primjerice, eritromicin iz skupine makrolida).

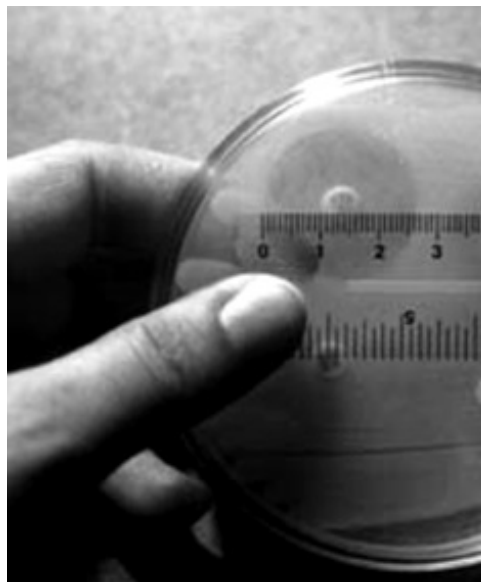
Testovi za određivanje antimikrobne osjetljivosti (antibiogram) utvrđuju sposobnost antimikrobnih tvari da inhibiraju bakterijski rast *in vitro*. Testiranje se može izvesti difuzijskim, odnosno dilucijskim metodama. Pri tome je važno naglasiti značaj pravilnog postupka izvođenja antibiograma i interpretacije nalaza, što kliničarima u konačnici predstavlja vodič u odabiru najboljeg antimikrobnog sredstva za liječenje.

1.1. Disk-difuzija (Kirby-Bauer metoda)

Ova metoda predstavlja najčešći rutinski način testiranja antimikrobne osjetljivosti bakterija. Komercijalno dostupni papirnati diskovi, natopljeni određenom količinom antibiotika, postavljaju se na površinu čvrste standardizirane podloge za izradu antibiograma (Müller-Hinton agar). Prethodno je ezom potrebno 'pikirati' kolonije čiste kulture ispitivanog soja te u sterilnoj fiziološkoj otopini pripremiti standardiziranu suspenziju, pri čemu gustoća otopine treba iznositi 0,5 McFarlanda (McF). Unutar 15 minuta od pripreme suspenzije, sterilni bris se natopi suspenzijom, lagano ocijedi na stijenci epruvete te se tako suspenzija nanese na površinu podloge. Zatim se pomoću dispencora (ili sterilnom pincetom) na površinu podloge nanose diskovi antibiotika, pri čemu je najmanja udaljenost među njima 20 mm. Podloga sa postavljenim diskovima se zatim inkubira u termostatu 18-24 sati, na 35-37°C. Tijekom inkubacije, antibiotik iz diska difundira u podlogu te, ako je djelotvoran, inhibira rast bakterije te bakterija poraste na određenoj udaljenosti od diska na kojoj je koncentracija difundiranog antibiotika premala i, stoga, nedjelotvorna. Taj izostanak rasta se naziva zonom inhibicije, pri čemu se mjeri njezin promjer i izražava u milimetrima (mm) (Slike 1. i 2



Slika 1. A) Postavljanje papirnatih diskova sterilnom pincetom. B) Bakterijski rast je inhibiran na određenoj udaljenosti od diska (zona inhibicije).



Slika 2. Ispravno mjerenje promjera zone inhibicije (mm).

Prema veličini promjera zone inhibicije, izražene u milimetrima, testirani soj se prema europskim standardima (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) svrstava u jednu od tri kategorije:

- Osjetljiv ('susceptible'; oznaka S) → soj je podložan terapijskom učinku antibiotika u srednjim ili prosječnim dozama u svim područjima organizma;
- Umjereno (intemedijarno) osjetljiv ('intermediate'; oznaka I) → soj je podložan terapijskom učinku antibiotika u prosječnim dozama samo na mjestima izlučivanja na kojima se koncentrira, odnosno u maksimalnim dozama na ostalim mjestima u organizmu;
- Rezistentan ('resistant'; oznaka R) → antibiotik primijenjen u mogućim netoksičnim dozama ne djeluje na soj

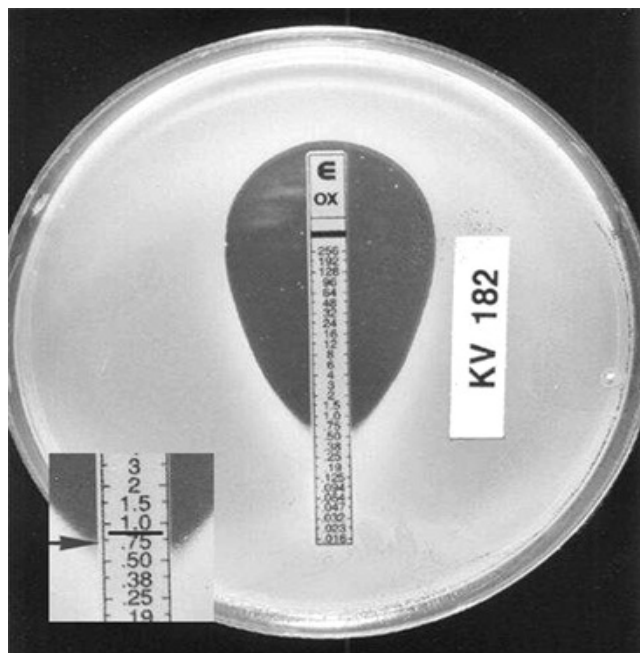
1.2. Dilucija u bujonu (makrodilucija)

Razrjeđivanje u tekućem ili na krutom hranilištu je postupak u kojem se epruvete ili bazečiči (jažice u mikrotitarskoj ploči) pune jednakom količinom inokuliranog soja (0,5 McF), pri čemu se koncentracija testiranog antibiotika dvostruko serijski razrjeđuje. Nakon inkubacije (18-24 sata, 35-37°C) promatra se porast bakterija koji se očituje замуćenjem tekuće podloge (bujona) ili poraslim kolonijama na krutoj podlozi nakon supkultivacije. Cilj ovog postupka je odrediti najnižu koncentraciju koja inhibira rast bakterija, tj. minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK), odnosno minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBK).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najniža koncentracija u nizu dvostrukih razrjeđenja antibiotika (izražena u $\mu\text{g/ml}$, odnosno mg/l) koja in vitro sprječava rast bakterija. Koncentracija antibiotika u prvoj bistroj epruveti u nizu, dakle onoj bez bakterijskog porasta, označava vrijednost MIK-a.

Ako u dilucijskoj metodi, nakon inkubacije, nije uočeno zamućenje bujona, tada se nezamućeni bujon presadi (supkultivira) na krutu podlogu bez antibiotika (najčešće na krvni agar). Podloge se zatim inkubiraju, pri čemu se određuje prva koncentracija antibiotika koja u potpunosti onemogućava porast bakterija na podlozi i izražava kao MBK. Ta vrijednost označava najnižu koncentraciju antibiotika (izraženu u $\mu\text{g/ml}$, odnosno mg/l) koja ubija 99,9% bakterija i u pravilu je veća od MIK-a. Određivanje MBK se rutinski rijetko izvodi, uglavnom ako postoji sumnja da je velika razlika između MIK-a i MBK-a kod, na primjer, stanja poput endokarditisa, gdje je nužan baktericidni učinak antibiotika.

1.3. E-test (Epsilonometer test) predstavlja kombinaciju difuzijske i dilucijske metode. Određeni kontinuirani gradijent koncentracije antibiotika nanesen je na plastičnu test traku koja se stavlja na površinu suspenzijom premazane ploče (Müller-Hinton agara). Nakon inkubacije (18-24 sata, 35-37°C) uočava se zona inhibicije u obliku elipse (suze). Rub zone inhibicije „siječe“ graduiranu traku, pri čemu se očitava brojčana vrijednost na mjestu ukrštenja i izražava kao MIK (minimalna inhibitorna koncentracija). Mjerna jedinica te vrijednosti se označava u $\mu\text{g/ml}$ ili mg/l (Slika 3.).



Slika 3. Interpretacija E-testa. MIK iznosi 0,75 $\mu\text{g/ml}$.

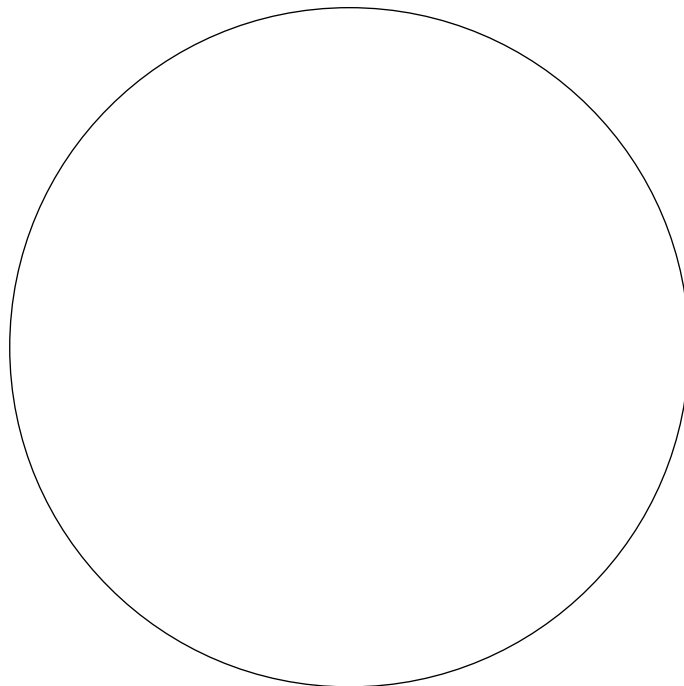
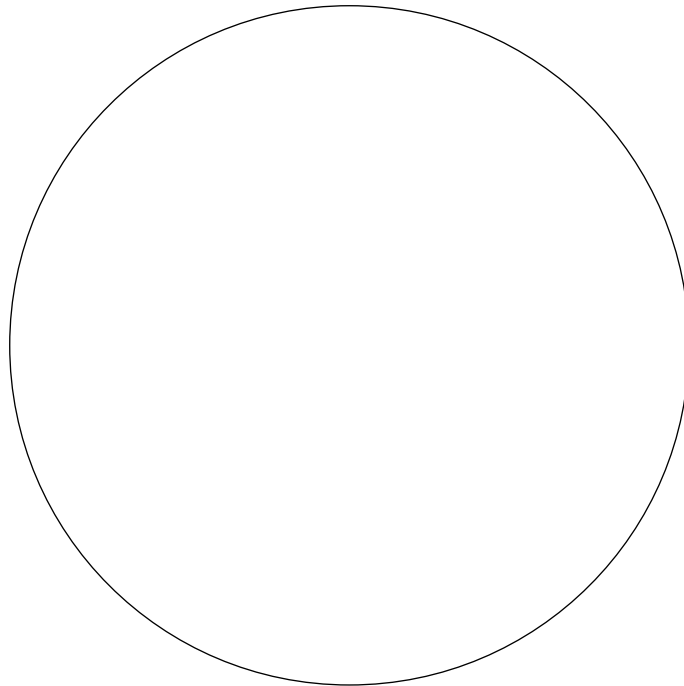
Dokazivanje lučenja ESBL-a. ESBL (engl. extended spectrum beta lactamase) je oznaka za beta-laktamaze proširenog spektra koje luče enterobakterije (najčešće *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*). Ti enzimi dovode do razaranja svih penicilinskih i cefalosporinskih antibiotika, ali ne i karbapenema. Na antibiogramu se uočava tzv. sinergizam između inhibitora beta-laktamaza u fiksnoj kombinaciji s beta-laktamskim antibiotikom (npr. amoksicilin i klavulanska kiselina, AMC) i nekog cefalosporina (npr. ceftriakson, CRO). To se očituje pojavom tzv. „zone duha“ (engl. ghost zone) ili zone koja izgleda „poput šampanjskog čepa“.

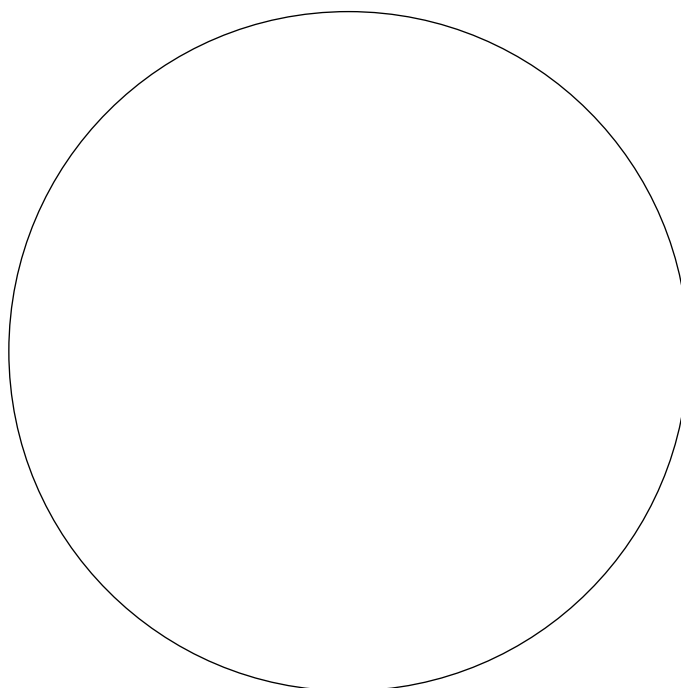
Test cefinaze. Disk cefinaze se koriste za brzu detekciju stvaranja beta-laktamaza u nekih bakterija, npr. *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, te nekih anaerobnih bakterija. Disk cefinaze je impregniran kromogenim cefalosporinom, nitrocefinom, koji vrlo brzo mijenja boju od osnovne žute u crvenu nakon što beta-laktamaza hidrolizira amidnu vezu u beta-laktamskom prstenu.

Test se izvodi tako da se papirnati disk stavi na predmetno stakalce, natopi fiziološkom otopinom te se na njegovu površinu ezom nanese ispitivani bakterijski soj i potom se prati promjena boje. Pojava crvene boje označava pozitivnu reakciju, tj. testirani bakterijski soj luči beta-laktamazu.

PRAKTIČNI RAD

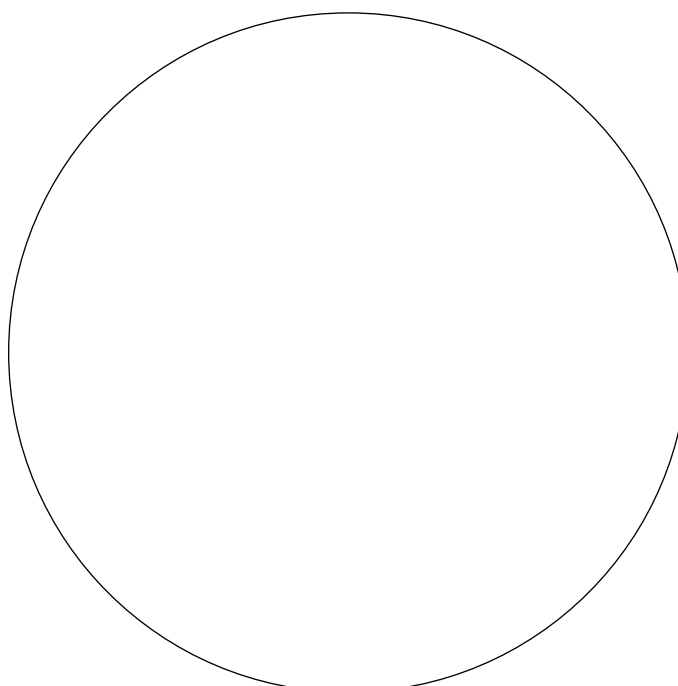
Zadatak 1. Shematski prikazati izgled antibiograma iz rutine te interpretirati osjetljivost ispitivanog bakterijskog soja.





| Antibiotik | | | Promjer zone inhibicije (mm) | | | Interpretacija (S, I, R) | | |
|------------|--|--|------------------------------|--|--|--------------------------|--|--|
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |

Zadatak 2. Shematski prikazati izgled E-testa iz rutine i očitati vrijednost MIK-a.



MIK = µg/ml

2. SEROLOŠKE REAKCIJE I DOKAZ PROTUTIJELA NA BAKTERIJSKE ANTIGENE

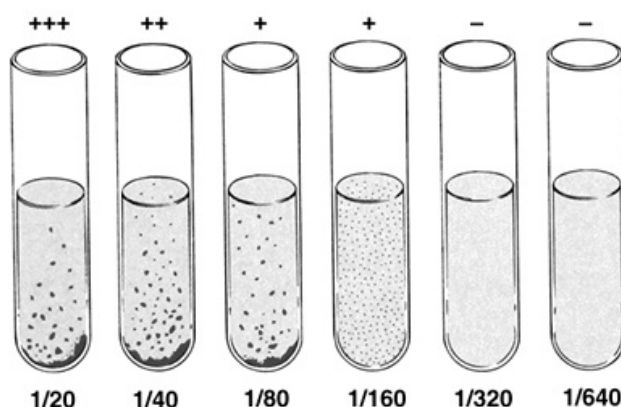
UVOD

Za razliku od direktne (izravne) dijagnostike, u bakteriologiji se nešto rjeđe koriste metode indirektne (neizravne) dijagnostike. U te metode se ubrajaju različiti serološki testovi kojima je moguće dijagnosticirati bolest pomoću reakcije antigena i protutijela. Dakle, u serologiji se prate značajke humoralnog imunološkog odgovora, pri čemu se mogu određivati protutijela određenih razreda imunoglobulina (najčešće IgM i IgG). U primarnoj infekciji (prvi kontakt s nepoznatim antigenom), najprije se pojavljuju protutijela IgM klase. Nakon nekog vremena dolazi do stvaranja protutijela IgG klase koja postepeno rastu.

Za serološka testiranja se rabi serum izdvojen iz uzetog uzorka bolesnikove krvi, pri čemu je cilj odrediti specifična protutijela na određene bakterijske antigene. Uzorak krvi za serološko testiranje se uzima natašte, venepunkcijom kubitalne vene, u aseptičkim uvjetima, pri čemu je dovoljno 8 do 10 ml za odrasle pacijente, odnosno 3 do 4 ml uzorka za pacijente dječje dobi. Epruveta s uzorkom krvi se ostavi 20 do 30 minuta na sobnoj temperaturi da se odvoji koagulum (ugrušak) koji se zatim odstrani, a preostali dio se centrifugira (3000 rpm/5-10 minuta) radi izdvajanja seruma. Tako dobiveni, izdvojeni serum se stavlja u novu epruvetu i pohrani na 2-8°C ukoliko će se testiranje raditi unutar tjedan dana, odnosno na -20°C u slučaju odgođenog testiranja. Potrebno je izbjegavati ponavljana zamrzavanja i odmrzavanja seruma, kao i testiranje ikteričnog, hemoliziranog ili lipemičnog seruma, jer takvi uzorci nisu prikladni za serološka testiranja.

Pojam parnog seruma. Za potrebe serološkog testiranja, svakom pacijentu se uzimaju dva seruma, **prvi ili akutni serum i drugi ili rekonvalescentni (parni) serum**. Prvi serum je potrebno uzeti što ranije u početku bolesti, najkasnije do kraja 1. tjedna bolesti, dok se uzorak rekonvalescentne faze obično uzme 2-3 tjedna nakon uzimanja prvog uzorka. Navedene serume treba testirati istodobno, da bi se ispravno utvrdila odgovarajuća dinamika titra protutijela.

Titar. Uzorci seruma se dvostruko serijski razrjeđuju, pri čemu se svakom razrjeđenju seruma dodaje ista količina bakterijskog antigena. Ukoliko pacijentov serum sadrži protutijela na odgovarajuće antigene, doći će do stvaranja kompleksa antigen-protutijelo (aglutinina ili aglutinata), koji će nalikovati na grudice ili pahuljice te će se lako moći uočiti golim okom (protresti svaku epruvetu radi boljeg uočavanja). Koncentracija protutijela se na taj način kvantitativno interpretira kao **titar**. Dakle, pojam titra označava recipročnu vrijednost najvećeg razrjeđenja seruma u nizu epruveta u kojem još dolazi do očekivane reakcije antigena i protutijela (vidljivog zamućenja) (Slika 4.). Važno je usporediti titar prvog i drugog seruma radi utvrđivanja dijagnostičkog značaja.



Slika 4. Primjer određivanja titra. Titar ovog seruma iznosi 160.

Interpretacija. Nakon određivanja odgovarajuće vrijednosti titra parnih uzoraka seruma, rezultati se tumače na sljedeći način:

- dijagnostički je značajan **četverostruki ili veći** porast (akutna infekcija) ili pad titra (faza rekonvalescencije ili oporavka)

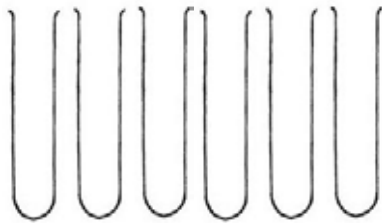
- **serokonverzija** → promjena karakteristična za primarnu infekciju kada u prvom serumu nisu dokazana protutijela a u drugom su dokazana u bilo kojem titru
- svaki drugi ishod reakcije u niskom ili graničnom titru ne može se smatrati dijagnostički značajnim

Dakle, u interpretaciji seroloških nalaza važno je istaknuti nekoliko ključnih čimbenika:

- ✓ vrijeme uzimanja uzoraka – npr. u prerano uzetom prvom serumu protutijela nije moguće detektirati
- ✓ nespecifični poticaji imunološkog odgovora (poliklonska aktivacija limfocita B)
- ✓ križne reakcije (zbog zajedničkih antigenih determinanti)
- ✓ anamnestički odgovor organizma (stvaranje protutijela na antigen iz ranijeg kontakta)

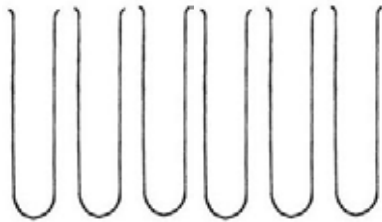
PRAKTIČNI RAD

Zadatak 3. Očitati zadanu serološku reakciju (aglutinaciju) i interpretirati dobiveni rezultat.



Početno razrjeđenje:

Titar prvog seruma:



Početno razrjeđenje:

Titar drugog seruma:

Interpretacija serološke reakcije: _____

VJEŽBA 3

Uzimanje i nasađivanje brisa nosa i ždrijela. Principi kultivacije i identifikacije piogenih koka.

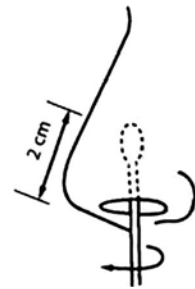
Žana Rubić

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti poglavlje o gram- pozitivnim kokima (udžbenik L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Treći dio: Mikroorganizmi od značaja u stomatologiji, poglavlje 11. str. 121-128).

PRAKTIČNI RAD

Uzimanje i nasađivanje brisa nosa

1. Nakon higijenskog pranja ruku, potrebno je staviti jednokratne zaštitne rukavice.
2. Na naljepnicu epruvete s brisom napisati ime i prezime pacijenta, datum i vrstu uzorka.
3. Lagano ući brisom u nosnicu do otprilike 2 cm dubine i nježno zarotirati nekoliko puta po sluznici nosa.
4. Oprezno vratiti bris u epruvetu i začeptiti.



Bris bi trebalo dostaviti u laboratorij na sobnoj temperaturi u roku od 2 sata.

Može se čuvati najdulje do 24 sata, također na sobnoj temperaturi.

Uzimanje i nasađivanje brisa ždrijela

1. Na naljepnicu epruvete s brisom napisati ime i prezime pacijenta, datum i vrstu uzorka.
2. Sterilnim štapićem se potisne jezik prema dolje, a pacijent istovremeno izgovara samoglasnik 'A' da bi se podigla uvula.
3. Sterilnim brisom se čvrsto obrišu tonzile, nepčani lukovi i stražnji zid ždrijela. Pri tome treba izbjegavati dodir s jezikom, bukalnom sluznicom i slinom.
4. Oprezno vratiti bris u epruvetu i začeptiti.



Bris bi trebalo dostaviti u laboratorij na sobnoj temperaturi u roku od 2 sata.

Može se čuvati najdulje do 24 sata, također na sobnoj temperaturi.

PRINCIPI KULTIVACIJE I IDENTIFIKACIJE PIOGENIH KOKA

DEMONSTRACIJA

Hemoliza: Prema stupnju razgradnje hemoglobina na krvnom agaru, razlikujemo nepotpunu ili _____, sa zelenkastom zonom oko kolonija, te potpunu ili _____ s prozračnom zonom oko kolonija, dok se izostanak hemolize naziva još _____.

Test katalaze: Određuje se sposobnost mikroorganizma da uz pomoć enzima katalaze razgradi vodikov peroksid na vodu i kisik. Ušicom eze prenese se uzorak kulture na predmetnicu i doda 1-2 kapi 3%-tnog H₂O₂. Pozitivna reakcija se očituje pjenušanjem tj. stvaranjem mjehurića kisika u ispitivanoj kapi. Stafilokoki su katalazajoš _____, dok su streptokoki katalazajoš _____.

Test koagulaze: Određuje se sposobnost nekih bakterija da sintetiziraju enzime koji koaguliraju krvnu plazmu.

- a) **Vešana koagulaza** nalazi se na površini bakterije i dokazuje testom na predmetnici. Testirana kultura se pomiješa s kapi fiziološke otopine, a potom doda plazma kunića i promiješa. Kod pozitivnog testa, nakon 5-10 sekundi pojaviti će se bijeli ugrušci.
- b) **Slobodna koagulaza** se otpušta u okolinu, a dokazuje testom u epruveti. U 0,5 mL razrijeđene plazme kunića se doda 0,5 mL suspenzije testiranog mikroorganizma i epruveta lagano promiješa kružnim pokretima. Nakon inkubacije od 1-4 h na 37°C, stvorit će se bijeli ugrušak na dnu epruvete.

S. aureus je koagulaza _____, te se po tome razlikuje od ostalih stafilokoka koji se jednim imenom nazivaju _____ (CONS).

Test DNA-ze: Određuje se sposobnost nekih bakterija da sintetiziraju enzim koji razgrađuje DNA. Soj se kultivira na krutoj podlozi koja sadrži polimeriziranu DNA. Nakon inkubacije, dodatak razrijeđene klorovodične kiseline precipitira nerazgrađenu DNA i stvara se zamućenje, dok oko sojeva koji stvaraju DNA-zu ostaje prozračna zona. *S. aureus* je DNA-za _____.

Test osjetljivosti na optohin: Na ispitivani soj postavi se disk optohina. Nakon inkubacije od 18-24 h na 35-37°C, očitava se zona oko diska. Ako je zona veća ili jednaka 14 mm, soj se smatra osjetljivim na optohin, što odgovara _____. Ako je soj rezistentan na optohin, pripada nekom od _____ streptokoka.

Test osjetljivosti na bacitracin: Na ispitivani soj postavi se disk bacitracina. Nakon inkubacije od 18-24 h na 35-37°C, očitava se zona oko diska. Ako postoji bilo kakva zona oko diska, soj se smatra osjetljivim na bacitracin, što odgovara _____. Ako je soj rezistentan na bacitracin, pripada nekom od drugih _____ streptokoka

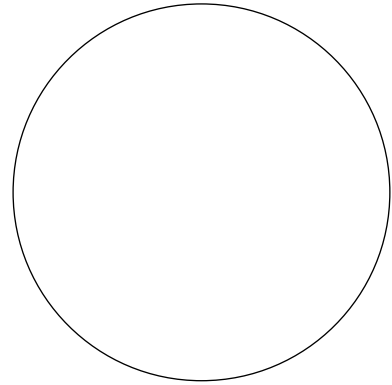
PRAKTIČNI RAD

Postupak bojenja po Gramu:

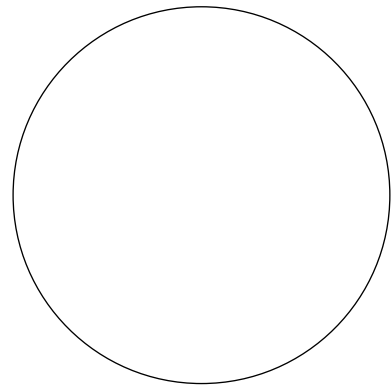
1. Na predmetnici napraviti tanki razmaz materijala i ostaviti da se osuši na zraku.
2. Fiksirati nad plamenom 3-4 puta.
3. Predmetnicu staviti na rešetku za bojanje.
4. Razmaz prelići otopinom kristal-violeta, ostaviti 1 min.
5. Odliti višak otopine kristal-violeta.
6. Razmaz prelići Lugolovom otopinom, ostaviti 1 min.
7. Isprati vodom.
8. Držeći predmetnicu između palca i kažiprsta, razmaz pokapati aceton- alkoholom, 8-10 sek.
9. Isprati vodom.
10. Predmetnicu staviti na rešetku za bojanje i prelići otopinom karbol fuksina, ostaviti 1 min.
11. Isprati vodom.
12. Postaviti predmetnicu da se osuši.
13. Na potpuno suhi razmaz staviti kap anisola i gledati imerzionim objektivom, pod velikim povećanjem (100x).

Zadatak 1. Izrada i mikroskopiranje preparata bojenih po Gramu, te uočavanje mikromorfološke osobitosti bakterijskih vrsta.

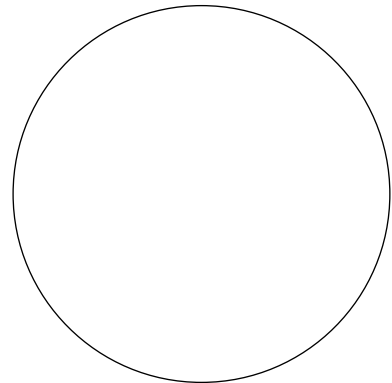
a) *S. aureus* iz kulture na krvnom agaru



b) *S. pneumoniae* iz kulture na krvnom agaru

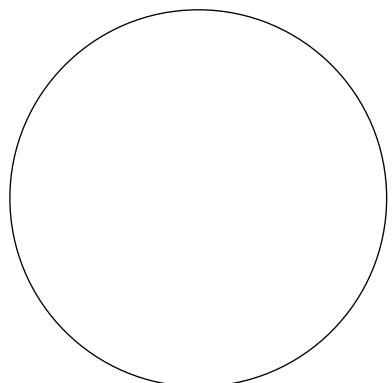


c) *S. pyogenes* iz bujona

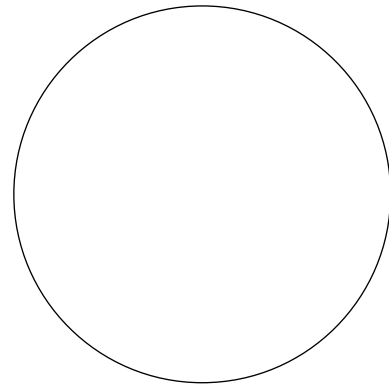


Zadatak 2. Mikroskopiranje pripremljenih preparata bojenih metilenskim modrilom i po Gramu, te uočavanje razlike u bojanjima, mikromorfologije i smještaja mikroorganizama u izravnom preparatu dobivenom iz kliničkog uzorka.

a) *S. pneumoniae* iz krvi miša; bojenje metilenskim modrilom



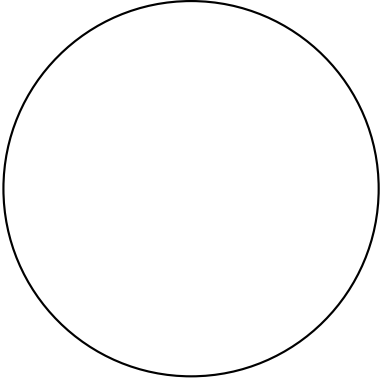
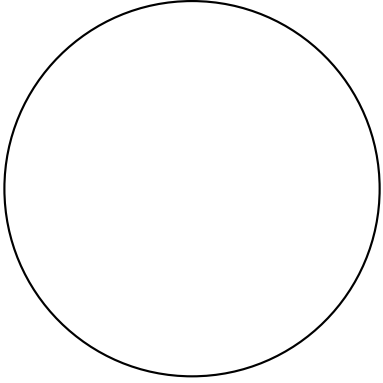
b) *S. pneumoniae* iz likvora, krvi ili iskašljaja; bojenje po Gramu

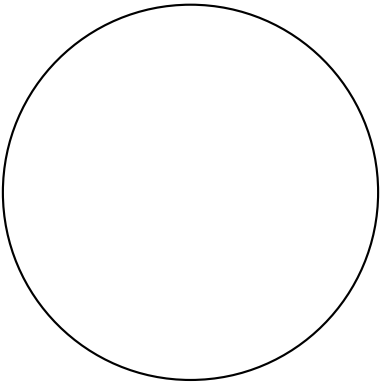
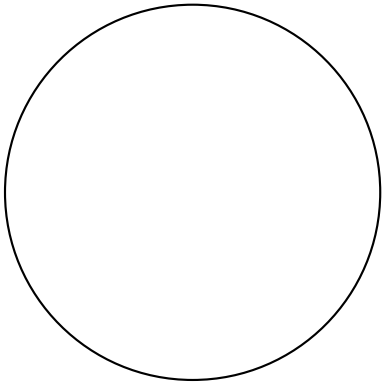


Zadatak 3. Opis kolonija i očitavanje identifikacijskih testova za *S. aureus*, *S. pneumoniae* i *S. pyogenes*, uočavanje makromorfoloških osobitosti pojedinih kultura, identifikacija pojedinih vrsta.

| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
|----------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Veličina | | |
| Oblik | | |
| Rub | | |
| Površina | | |
| Hemoliza | | |
| Pigment | | |
| | | |
| | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| Veličina | | |
| Oblik | | |
| Rub | | |
| Površina | | |
| Hemoliza | | |
| Pigment | | |
| | | |

Zadatak 4. Očitavanje testova antimikrobne osjetljivosti metodom disk-difuzije, vježbanje ispravnog očitavanja zona inhibicije i interpretacije osjetljivosti.

| Meticilin osjetljivi <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) | | | Meticilin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) | | |
|--|------|---------|---|------|---------|
| Antibiotik | Zona | S, I, R | Antibiotik | Zona | S, I, R |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
|  | | |  | | |

| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | | Viridans streptokoki | | |
|---|------|---------|--|------|---------|
| Antibiotik | Zona | S, I, R | Antibiotik | Zona | S, I, R |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
|  | | |  | | |

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva

1. Obrisci nosa i ždrijela transportiraju se na _____ temperaturi.
2. Hemoliza nastaje zbog _____ .
3. Svi β -hemolitički streptokoki pripadaju serološkoj skupini _____ .
4. Testom slobodne ili vezane koagulaze dokazuje se _____ .
5. *Streptococcus pneumoniae* se dokazuje testom osjetljivosti na _____ .

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 4

Kultivacija i identifikacija rodova *Neisseria*, *Haemophilus*, *Legionella*

Ivana Goić-Barišić

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti poglavlja o navedenim mikroorganizmima (udžbenik L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Treći dio: Mikroorganizmi od značaja u stomatologiji, poglavlja 14 i 19. str. 140-144, 167-168).

UVOD

Rod *Neisseria*

Rod *Neisseria* obuhvaća gram-negativne diplokoke posebne mikromorfologije, koji dijelom predstavljaju apatogene saprofite gornjeg dišnog sustava, a dijelom patogene i uvjetno patogene vrste. U identifikaciji najserija koristimo test katalaze i oksidaze, specifičnu mikromorfologiju i fermentaciju šećera.

Test oksidaze: služi za dokaz enzima citokrom-oksidade. Supstrat je tzv. oksidaza reagens koji se nakapa na filter papir. Na to se ezom doda bakterijska kultura koja se ispituje. Pozitivnu reakciju prestavlja nastanak tamnoplave do crne boje u roku 5-10 sekundi.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1. Navedite neke saprofitne vrste roda *Neisseria*:

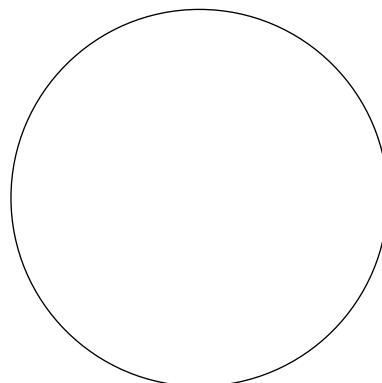
Navedite patogene i uvjetno patogene vrste roda *Neisseria*:

Testovi koji se koriste u identifikaciji najserija su:

Zadatak 2. Mikroskopski preparat obojen metodom po Gramu: karakteristična mikromorfologija

Nacrtajte mikroskopski izgled kulture.

Opis slike:



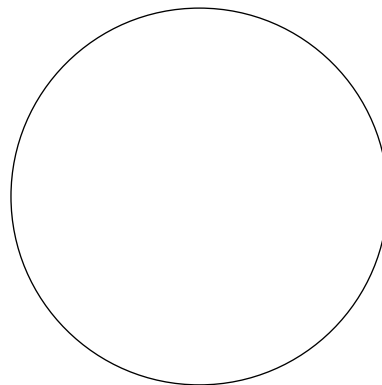
Zadatak 3. Test katalaze: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Napraviti test katalaze za najserije.

Test katalaze je

Zadatak 4. Očitati test oksidaze za pripremljenu bakterijsku kulturu najserija. Nacrtati pozitivnu reakciju oksidaze.

Opis slike:



Zadatak 5. Testovi razgradnje šećera (glukoza, maltoza, laktoza)

Očitajte test razgradnje šećera za pripremljenu bakterijsku kulturu (+/-). Prilikom očitavanja crvena boja predstavlja negativnu reakciju, a žuta boja pozitivnu reakciju fermentacije

1. epruveta: ispitivanje razgradnje glukoze + -

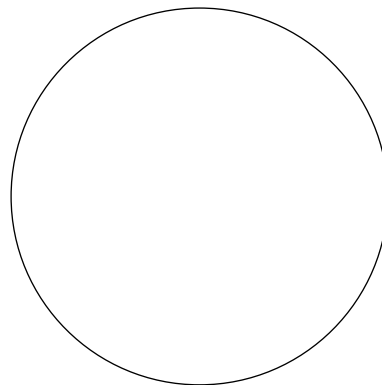
2. epruveta: ispitivanje razgradnje maltoze + -

3. epruveta: ispitivanje razgradnje laktoze + -

Zadatak 6. Miroskopiranje pripremljenih preparata

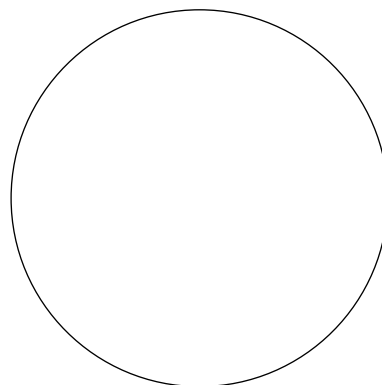
N. meningitidis – likvor – Gram preparat

Opis slike:



N. gonorrhoeae - obrisak uretre – Gram preparat

Opis slike:



Rod *Haemophilus*

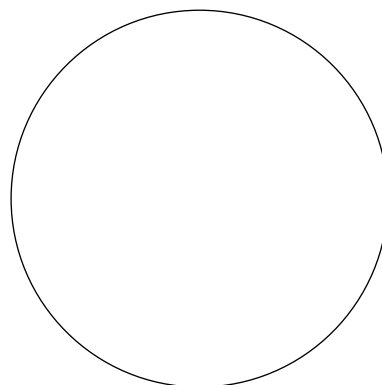
Hemofilus spada u parvobakterije, gram-negativne bakterije s posebnim zahtjevima za rast i kultivaciju. Da bi se osigurali posebni zahtjevi ovog mikroorganizma, respiratorni uzorci se nasijavaju na KA uz dodatak kulture *Staphylococcus aureus* (tzv. stafilokokna crta) ili na čokoladni agar. U testiranju osjetljivosti hemofilusa na antibiotike izvodi se test cefinaze (nitrocefinski test). Test se izvodi za dokazivanje prisutnosti β -laktamaze u *Haemophilus influenzae*.

Za izvođenje testa cefinaze pogledati 2. vježbu. Promjena boje diska se očitava u roku 5-30 sekundi.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 7. Od pripremljene bakterijske kulture napraviti gram preparat. Miroskopiraj i nacrtaj sliku. Osnovna mikromorfologija hemofilusa je:

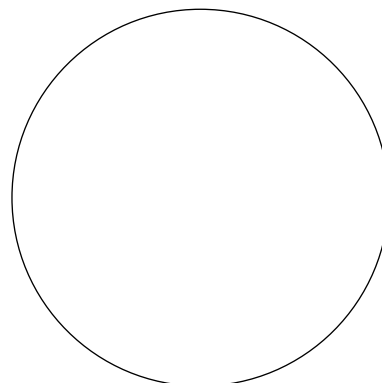
Opis slike:



Zadatak 8. Kultivacija hemofilusa na krvnom agaru zahtijeva dodatne čimbenike rasta. Navesti potrebne faktore za rast kulture hemofilusa.

Prikazati fenomen satelitskog porasta na krvnom agaru.

Opis slike:



Zadatak 9. Rezultat nitrocefinskog testa za pripremljenu kulturu je:

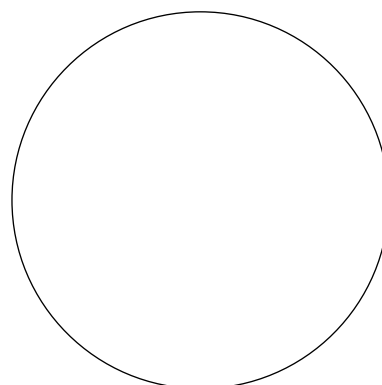
Rod *Legionella*

Legionela je sitan gram-negativan bacil ili kokobacil koji ne raste na običnim podlogama za kultivaciju većine mikroorganizama. Među brojnim vrstama koje su prisutne u okolišu, bolest u čovjeka uzrokuje *L. pneumophila*. Preživljava u vodenoj sredini i aerosol koji nastaje od onečišćene vode predstavlja izvor infekcije unutar zatvorenih sredina. Za kultivaciju legionele koristi se posebna podloga - BCYE-agar koja sadrži cistein, drveni ugljen i ekstrakt kvasca, uz obavezan rad u biozaštitnom kabinetu. Uzrokuje respiratorne infekcije, najčešće atipičnu pneumoniju u starijih osoba i imunokompromitiranih bolesnika (legionarska bolest). Dijagnoza se postavlja serološkim testom i otkrivanjem antigena legionele u urinu bolesnika pri sumnji na legionarsku bolest.

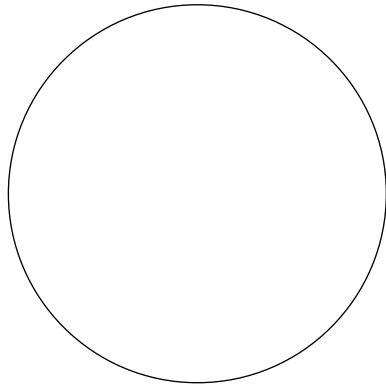
PRAKTIČNI RAD

Zadatak 10. Prikazati pozitivan imunokromatografski test za otkrivanje legionele u urinu.

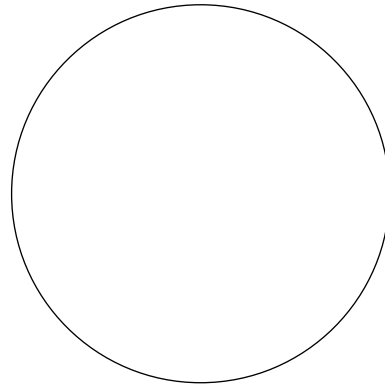
Opis slike:



Zadatak 11. Očitati na prethodnoj vježbi nasađene ploče (bris ždrijela i nosa).



bris ždrijela



bris vestibuluma nosa

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva

1. Koje su razlike u građi *N. meningitidis* i *N. gonorrhoeae*?
2. Koje su najznačajnije infekcije koje uzrokuju najserije?
3. Koje su značajke parvobakterija?
4. Nabrojite najznačajnije bakterije koje vole vodu i vlagu.
5. Navedite značaj legionele u stomatologiji.

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 5

Identifikacija i serotipizacija enterobakterija. *Pseudomonas aeruginosa*.

Anita Novak

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti poglavlje o navedenim mikroorganizmima (udžbenik L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Treći dio: Mikroorganizmi od značaja u stomatologiji, poglavlje 15).

UVOD

Porodica *Enterobacteriaceae* obuhvaća heterogenu grupu gram-negativnih bacila koji su dio fiziološke flore probavnog sustava ljudi i životinja. Neki od njih, kao *Escherichia coli*, mogu uzrokovati oboljenja ljudi samo u određenih okolnostima, dok su drugi, kao *Salmonella* spp., obligatni patogeni.

Enterobakterije su aerobi ili fakultativni anaerobi, fermentiraju različite šećere te posjeduju različite čimbenike virulencije (npr. toksine).

Pseudomonas aeruginosa se može naći u tlu i vodi, ali često i na vlažnim bolničkim površinama. Kolonizira kožu ljudi gdje se nalazi kao saprofit. Uzrokuje teške infekcije imunokompromitiranih pacijenata i značajni je bolnički patogen.

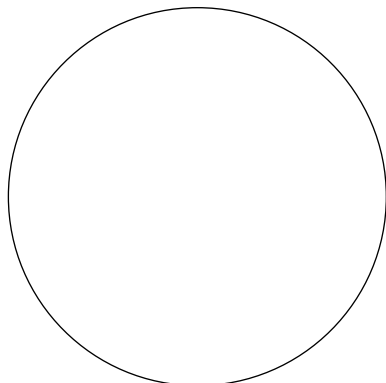
PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1. Izrada i mikroskopiranje preparata čistih kultura *E. coli* i *P. mirabilis* s KA (složeno bojenje po Gramu) – rad u paru.

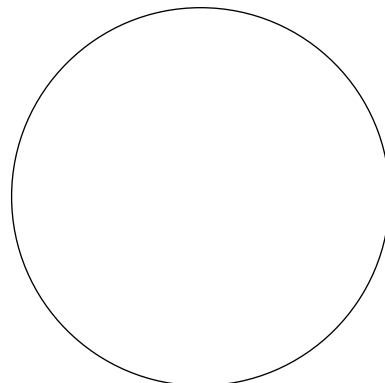
Cilj: uočiti da se različite vrste bakterija unutar porodice enterobakterija jednako boje po Gramu i nema morfoloških razlika značajnih za pojedinu vrstu

Postupak: Jedan student radi preparat od kulture *E. coli*, a drugi od kulture *P. mirabilis*.

Na predmetno staklo kapnuti kap fiziološke otopine (f.o.). Mikrobiološkom ušicom dotaknuti poraslu koloniju (otprilike pola kolonije) i napraviti homogenu suspenziju u pripremljenoj kapi f.o. Suspenziju jednoliko, u tankom sloju, razmazati po predmetnom staklu. Preparat osušiti na zraku, fiksirati na plameniku i obojiti po Gramu. Mikroskopirati osušeni preparat pod velikim povećanjem (100x) mikroskopa, imerzionim objektivom te nacrtati viđeno (svaki student treba pogledati oba preparata).



E. coli – bojenje po Gramu

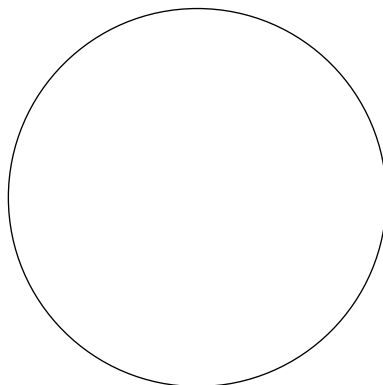


P. mirabilis – bojenje po Gramu

Zadatak 2. Mikroskopiranje pripremljenog tuš preparata (prethodno bojenog složenim bojenjem po Gramu) *Klebsiella* sp.

Cilj: uočiti kapsulu (halo) oko bakterijske stanice.

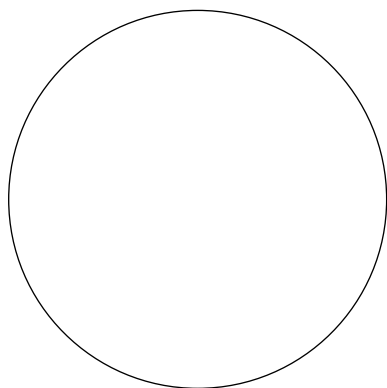
Postupak: mikroskopirati pripremljeni preparat pod velikim povećanjem (100x) mikroskopa, imerzionim objektivom te nacrtati viđeno.



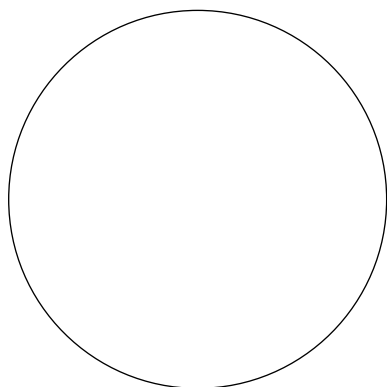
Klebsiella sp. – tuš preparat

Zadatak 3. Opisati i nacrtati porasle kolonije (rad u paru).

3.1. selektivna podloga: SS (*Salmonella/Shigella* agar) – uočiti razliku između bakterija koje razgrađuju laktozu i onih koje to ne mogu te bakterija koje stvaraju H₂S od onih koje ga ne stvaraju.



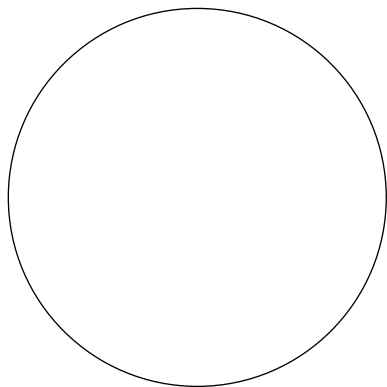
SS – *E. coli*



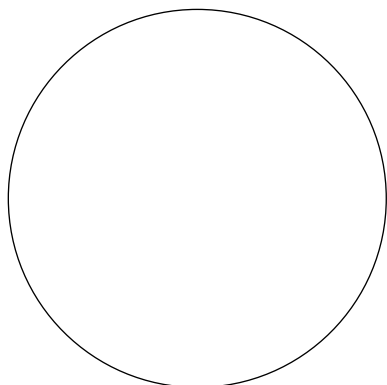
SS – *Salmonella* sp.

| KOLONIJE | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella</i> sp. |
|---------------------|----------------|-----------------------|
| VELIČINA | | |
| OBLIK | | |
| RUB | | |
| POVRŠINA | | |
| L, H ₂ S | | |

3.2. selektivna podloga CLED – razlikovati bakterije po sposobnosti razgradnje laktoze



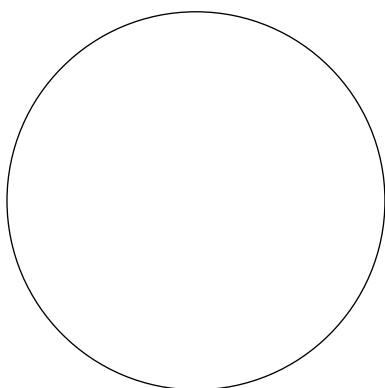
CLED – *Proteus* sp.



CLED – *K. pneumoniae*

| | | |
|----------|--------------------|----------------------|
| KOLONIJE | <i>Proteus</i> sp. | <i>K. pneumoniae</i> |
| VELIČINA | | |
| OBLIK | | |
| RUB | | |
| POVRŠINA | | |
| L | | |

3.3. neselektivna podloga HA (hranjivi agar)



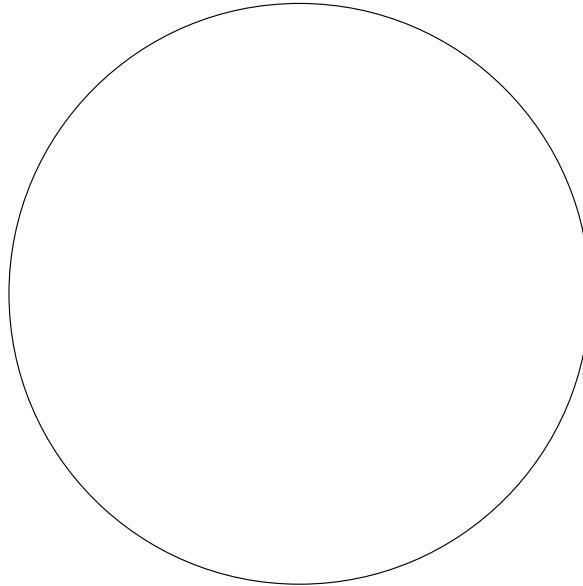
HA – *Pseudomonas aeruginosa*

| | |
|----------|----------------------|
| KOLONIJE | <i>P. aeruginosa</i> |
| VELIČINA | |
| OBLIK | |
| RUB | |
| POVRŠINA | |
| PIGMENT | |

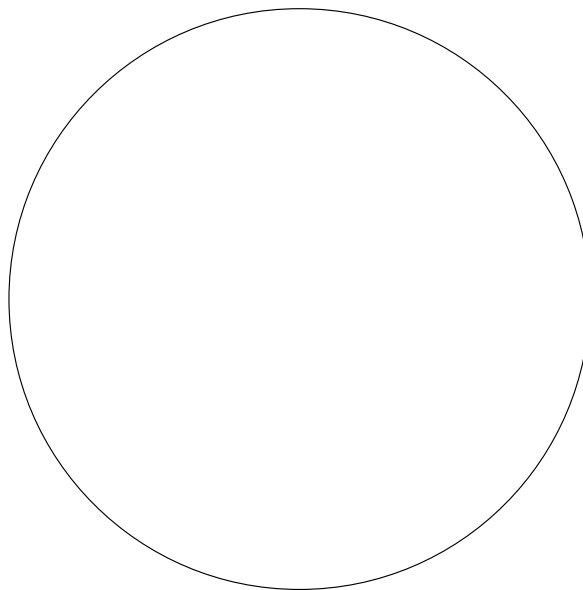
Zadatak 4. Očitati i ispisati zone inhibicije rasta za svaki navedeni antibiotik te interpretirati antibiogram (rad u paru).

4.1. Podloga: MH-agar (Müller-Hinton), antibiogrami *E. coli* (divlji soj) i ESBL+ soja *E. coli*

Cilj: uočiti razliku u antibiogramima dobro osjetljivog, divljeg soja *E. coli* od multirezistentnog, bolničkog soja koji stvara ESBL (β -laktamaze proširenog spektra).



E. coli – osjetljivi soj

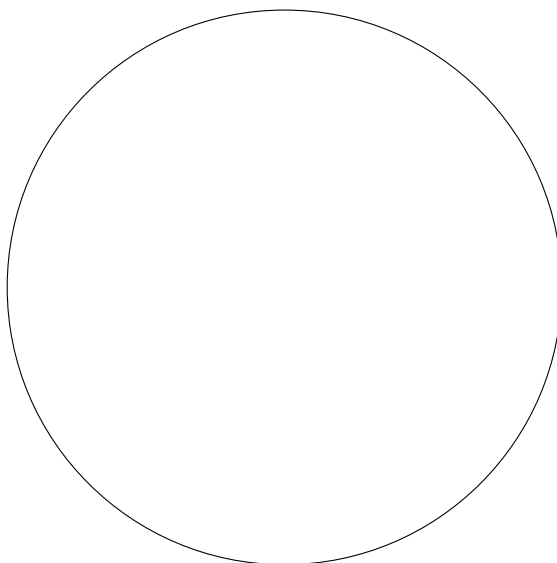


E. coli – ESBL +

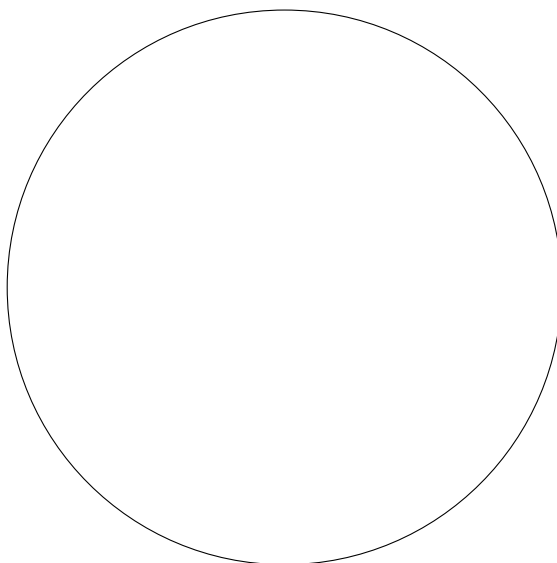
| | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> ESBL+ | <i>E. coli</i> ESBL+ |
|------------|----------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Antibiotik | (mm) | interpretacija | (mm) | interpretacija |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

4.2. Podloga: MH- agar (Müller-Hinton), antibiogrami *P. aeruginosa* (divlji soj) i *P. aeruginosa*, bolnički, na karbapeneme rezistentan soj

Cilj: uočiti razliku u antibiogramima dobro osjetljivog, divljeg soja *P. aeruginosa* od karbapenem-rezistentnog, bolničkog soja.



P. aeruginosa – osjetljiv na karbapeneme

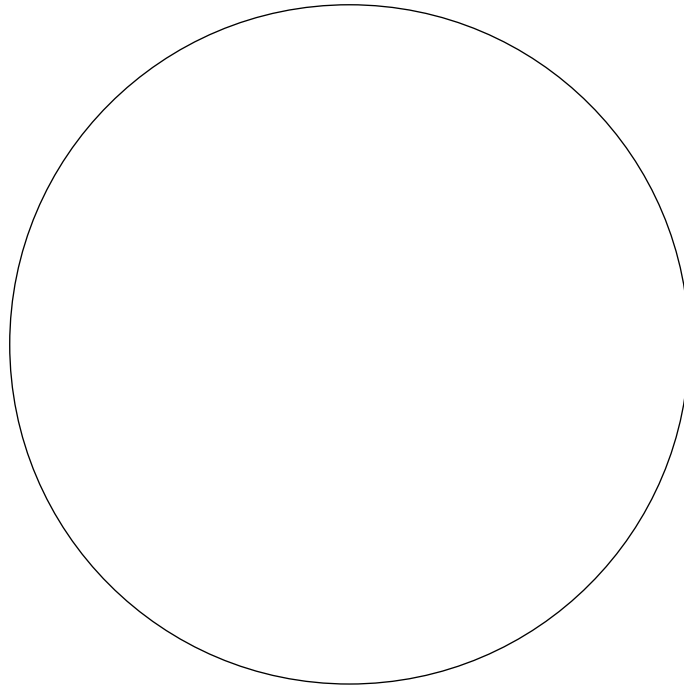


P. aeruginosa – rezistentan na karbapeneme

| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. aeruginosa</i> , karbapenem rezistentan | <i>P. aeruginosa</i> , karbapenem rezistentan |
|------------|----------------------|----------------------|--|--|
| Antibiotik | (mm) | interpretacija | (mm) | interpretacija |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

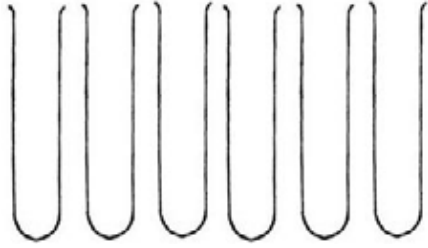
Zadatak 5. Nacrtati E-test *P. aeruginosa* i očitati MIK ($\mu\text{g/mL}$).

Podloga: MH- agar (Müller-Hinton)



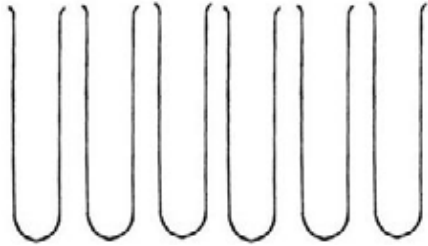
MIK = $\mu\text{g/ml}$

Zadatak 6. Očitati serološku reakciju aglutinacije u epruveti (Widal) – rad u skupini po 3 studenta.



Početno razrjeđenje:

Titar prvog seruma:



Početno razrjeđenje:

Titar drugog seruma:

Interpretacija serološke reakcije:

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva

1. Zašto uzorke stolice i urina nasijavamo na selektivne podloge?

2. Kako identificiramo enterobakterije?

3. Zašto *K. pneumoniae* stvara izrazito sluzave kolonije na podlogama?

4. Što znači kratica ESBL i kako temeljem antibiograma možemo utvrditi da bakterijski soj luči ESBL?

5. Koje antibiotike koristimo u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama koje luče ESBL?

6. Po kojem obilježju možemo prepoznati kolonije *P. aeruginosa* na neselektivnim hranilištima?

7. Koji su bolesnici osobito podložni kolonizaciji i infekciji oportunističkom bakterijom *P. aeruginosa*?

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 6

Uzimanje i transport uzoraka za izolaciju anaerobnih bakterija. Principi anaerobne kultivacije. Mikromorfologija – rodovi *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*.

Žana Rubić

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti principe anaerobne kultivacije i najčešće anaerobne patogene u udžbeniku. (L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Prvi dio: Opća mikrobiologija, poglavlje 3. str. 18 i Treći dio: Mikroorganizmi od značaja u stomatologiji, poglavlja 12, 13, 14, 17, 18).

UVOD

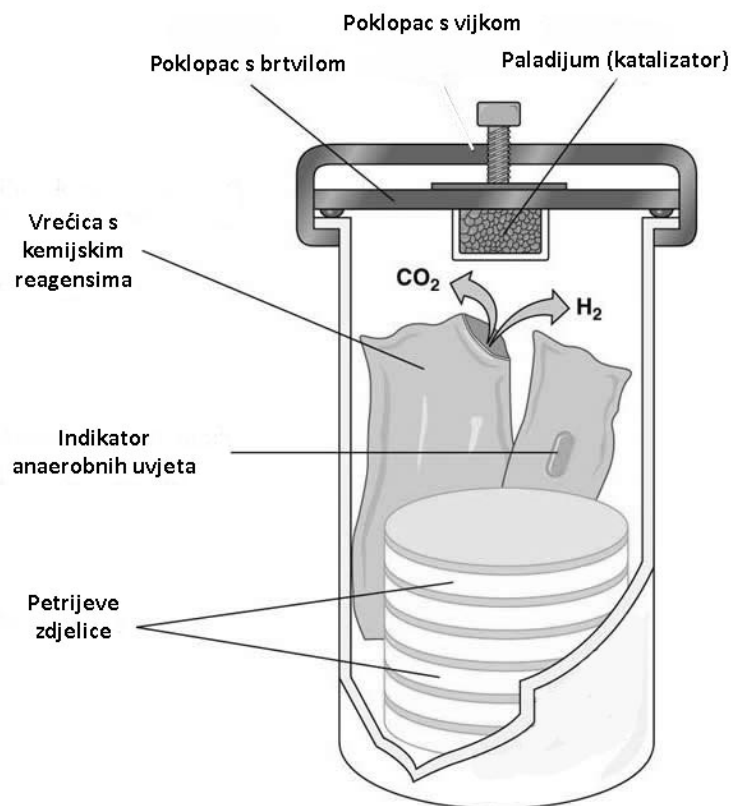
Mikroorganizmi se razlikuju prema sposobnosti korištenja _____ za stanično disanje. Za razliku od _____ mikroorganizama, koji koriste O₂ kao konačni akceptor elektrona, anaerobni mikroorganizmi koriste druge molekule, te imaju različitu toleranciju prema kisiku. U striktnih ili obvezatnih anaeroba, prisutnost atmosferskog kisika dovodi do stvaranja, _____ pa pri izlaganju atmosferskom kisiku oni ugibaju. Aerotolerantni anaerobi stvaraju _____ i/ili _____ koji neutraliziraju toksične radikale, pa tako mogu tolerirati manje količine kisika.

Pri uzimanju materijala za izolaciju anaerobnih uzročnika, treba voditi računa da se uzorak ne izlaže atmosferskom kisiku. Stoga bris rane ili bris izlazišta fistule nisu pogodni uzorci za izolaciju anaerobnih patogena. Adekvatni uzorci su aspirat, punktat ili bioptat s mjesta infekcije. Mjesto uzorkovanja se prethodno dezinficira, a potom se sadržaj ili tkivo uzima na način da se što bolje očuvaju anaerobni uvjeti i transportira u laboratorij unutar 15 minuta. Ako transport traje duže (do 24 h), uzorke treba aseptično prebaciti u transportnu podlogu za anaerobe, i čuvati na sobnoj temperaturi.

Za anaerobnu kultivaciju su potrebni postupci kojima će se stvoriti anaerobni uvjeti, te podloge u kojima su kemijski spojevi s niskim redoks potencijalom. Primjeri takvih reducirajućih podloga su tekući tioglikolat i kruti Columbia agar.

DEMONSTRACIJA

| Naziv postupka | Način postizanja anaerobnih uvjeta | Princip postupka | Bilješke |
|----------------------------|------------------------------------|---|----------|
| Fortnerova ploča | biološki | Na polovicu krute hranjive podloge nasije se fakultativni anaerob, a na drugu polovicu striktni anaerob, te se poklopac podloge čvrsto začepi parafinom. Kad fakultativni anaerob potroši kisik, stvaraju se uvjeti za rast striktnog anaeroba. Postupak odgovara uvjetima koji su prisutni u miješanim aerobno-anaerobnim infekcijama. | |
| Tarozzi bujon | kemijski | Komad skuhanog mesa uronjen u bujon stvara reducirajući medij pogodan za uzgoj anaeroba. Slično zbivanje se događa u dubokim džepovima rana prilikom razaranja tkiva zbog traume. | |
| McIntosh lonac | fizikalni | Iz posude za uzgoj anaerobnih mikroorganizama, snažnom vakuom pumpom se izvlači O_2 i zamjenjuje smjesom drugih plinova. | |
| Tioglikolatni bujon | kemijski | Tekuća podloga sadrži natrij-tioglikolat, koji ima sposobnost vezanja s O_2 pri čemu se stvara reducirani spoj. | |
| GasPak sustav | kemijski | U posudu se stavlja otvorena vrećica s kemijskim agensima, koja se navlaži s nekoliko mL vode. Posuda se hermetički zatvori. U kemijskim reakcijama koje slijede, u kratkom vremenskom razdoblju se uklanja kisik iz posude.* | |

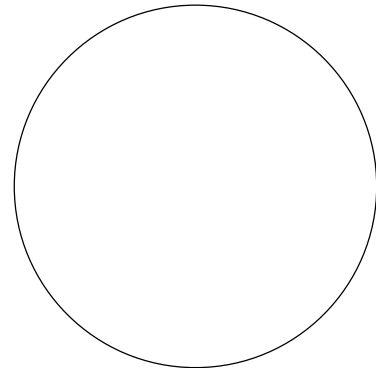


*Posuda za uzgoj anaerobnih bakterija GasPak postupkom. Kad se sadržaj vrećice pomiješa s vodom, stvaraju se H_2 i CO_2 , a potom, uz pomoć katalizatora paladijuma, iz stvorenog H_2 i atmosferskog O_2 nastaje voda.

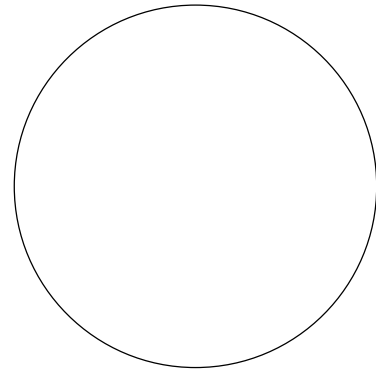
PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1. Izrada i mikroskopiranje preparata bojenih po Gramu te uočavanje mikromorfološke osobitosti bakterijskih vrsta.

a) *Actinomyces* iz kulture na krvnom agaru

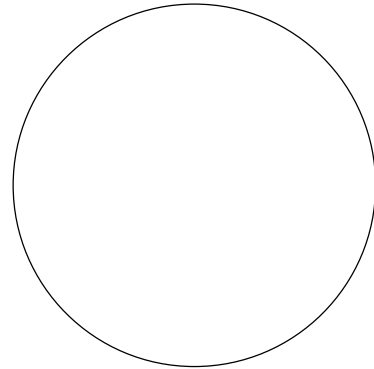


b) Laktobacili iz jogurta

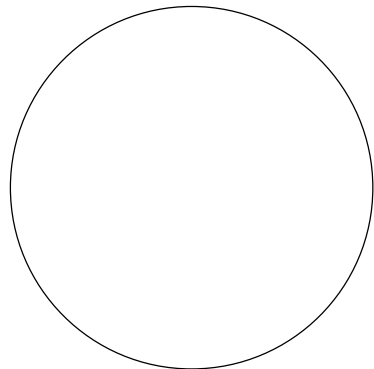


Zadatak 2. Mikroskopiranje pripremljenih preparata bojenih po Gramu, uočavanje razlike u bojenju i mikromorfologiji.

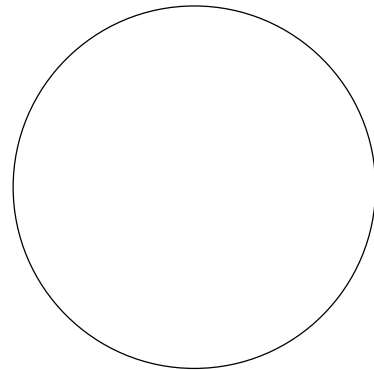
a) *Clostridium* sp. (spore)



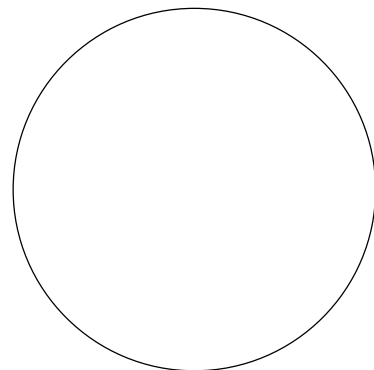
b) *Clostridium tetani*



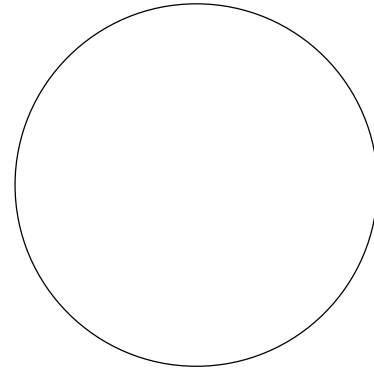
c) *Actinomyces odontolyticus* iz hemokulture (apsces zuba)



d) *Bacteroides*

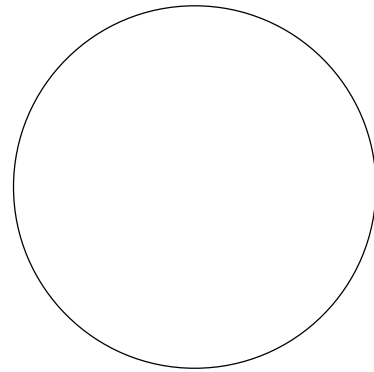


e) *Fusobacterium*



Zadatak 3. Opis kolonija i uočavanje makromorfoloških osobitosti kulture.

| | <i>Actinomyces</i> |
|----------|--------------------|
| Veličina | |
| Oblik | |
| Rub | |
| Površina | |
| Hemoliza | |
| Pigment | |



Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva

1. Aspirat rane i uzorak tkiva _____ dobri uzorci za bakteriološku pretragu pri sumnji na infekciju uzrokovanu anaerobnim bakterijama.
2. Ako prijenos uzorka u laboratorij traje dulje od 15 minuta, uzorak je potrebno staviti u _____ za anaerobe.
3. Striktni anaerobi _____ izlaganje manjim količinama kisika.
4. Anaerobni mikroorganizmi uglavnom rastu _____, pa je potrebno _____ h za njihovu inkubaciju.
5. Kod anaerobnih mikroorganizama, osjetljivost na antimikrobne lijekove određuje se _____

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 7

Obrada uzoraka za dokazivanje mikobakterija. *Corynebacterium*-uzgoj, bojenje i mikroskopija.

Ivana Goić-Barišić

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti navedena poglavlja u udžbeniku. (L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Treći dio: Mikroorganizmi od značaja u stomatologiji, poglavlja 12 i 19, str. 129-131, 165-167).

UVOD

Mikobakterije

Mikobakterije su aerobne bakterije u obliku štapića koje ne stvaraju spore. Zbog specifičnosti građe stanične stijenke ne mogu se prikazati običnim tehnikama bojenja po Gramu ili metilenu, ali nakon primjene posebne tehnike bojenja po Ziehl-Neelsenu, otporni su na odbojavanje kiselinom ili alkoholom te se nazivaju acidorezistentnim bacilima. *Mycobacterium tuberculosis* uzrokuje tuberkulozu i važan je patogen ljudi. *Mycobacterium leprae* uzrokuje lepru (guba). *Mycobacterium avium-intracellulare* (*M. avium* kompleks ili MAC), kao i druge netuberkulozne (NTM) mikobakterije, često uzrokuju infekcije u bolesnika koji boluju od AIDS-a i predstavljaju oportunistične patogene u imunokompromitiranih osoba.

Mikobakterije u pravilu uzrokuju respiratornu infekciju (tuberkuloza pluća) te se dijagnostika tuberkuloze radi iz respiratornih uzoraka, iskašljaja (sputuma) ili respiratornih aspirata i lavata. Za postavljanje dijagnoze potrebno je takve uzorke obraditi u biozaštitnom kabinetu i nasijati na posebnu podlogu po Löwenstein-Jensenu. Iz respiratornih uzoraka radi se mikroskopski preparat koji se boja po Ziehl-Neelsenu i mikroskopira pod imerzijom za dokaz prisustva acidorezistentnih bacila.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1. Navesti sastav stanične stijenke mikobakterija i istaknuti razliku u odnosu na ostale bakterije.

Zadatak 2. Izrada preparata iskašljaja i bojenje po Ziehl-Neelsenu.

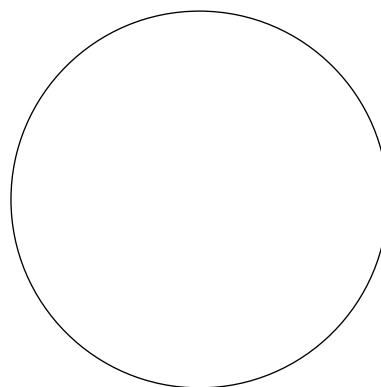
Priprema razmaza se radi u biozaštitnom kabinetu!

Sterilnom ezom uzeti malu količinu iskašljaja iz posudice za uzorkovanje, razmazati na predmetno stakalce, osušiti i fiksirati na plamenu.

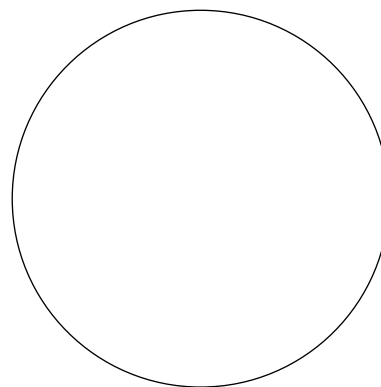
- na razmaz nanijeti karbol fuksin i zagrijavati da boja polagano isparava kroz 5 minuta
- isprati vodovodnom vodom
- preparat isprati u 3% sumpornoj kiselini pomiješanoj s 95% alkoholom
- isprati vodovodnom vodom
- nanijeti metilensko modri i ostaviti 5 minuta
- isprati vodovodnom vodom
- osušiti i mikroskopirati

Zadatak 3. Izraditi, mikroskopirati i nacrtati preparat iskašljaja bojenog po Ziehl-Neelsenu. Treba uočiti acidorezistentne bakterije.

Opis slike:



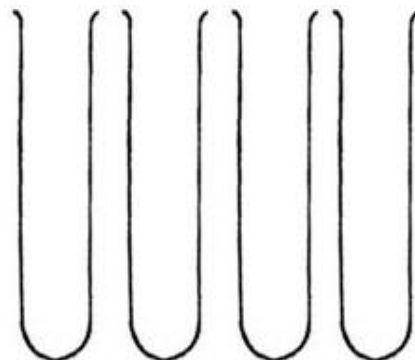
Zadatak 5. Opisati izgled acidorezistentnih bacila iz tekuće podloge MGIT. Bojenje po Ziehl- Neelsenu. Uočiti karakterističan oblik "serpentine cord".



Zadatak 4. Opisati izgled kolonija *Mycobacterium tuberculosis* na Löwenstein-Jensen podlozi.

Opis slike:

Zadatak 6. Očitati prethodno pripremljen test rezistencije *M. tuberculosis* na antituberkulotike. Potrebno je uočiti razliku u broju kolonija na podlogama s antituberkuloticima. Testirani antituberkulotici su izoniazid, rifampicin, etambutol i streptomycin.

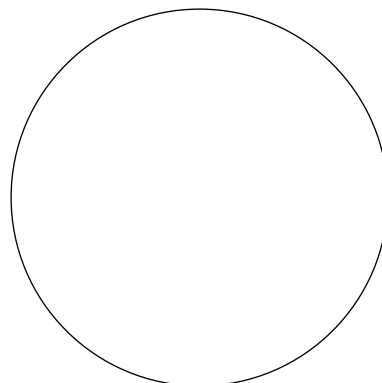


KORINEBAKTERIJE

Korinebakterije su gram-pozitivni štapići, aerobi ili fakultativni anaerobi, nisu pokretni, ne stvaraju spore. Najveći broj vrsta iz ovog reda ne uzrokuje bolesti i dio je fiziološke kožne bakterijske flore čovjeka. *Corynebacterium diphtheriae* u čovjeka uzrokuje bolest difteriju. Korinebakterije koje ne uzrokuju difteriju se nazivaju i difteroidi.

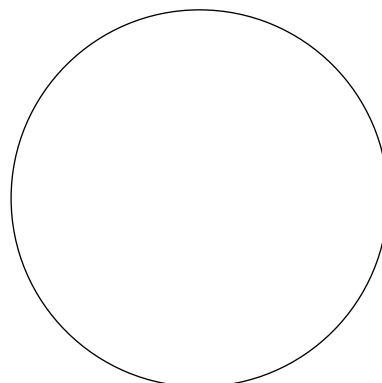
PRAKTIČNI RAD

Zadatak 7. Opisati kulturu korinebakterija na KA.

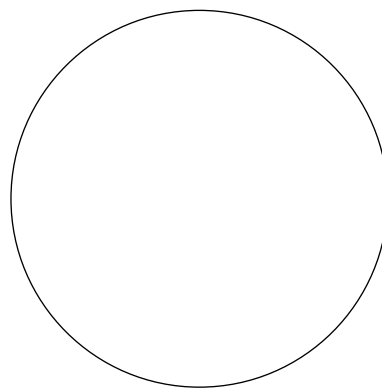


Zadatak 8. Napraviti gram preparat s porasle kulture a) difteroidi sa KA, b) bacilus sa KA.

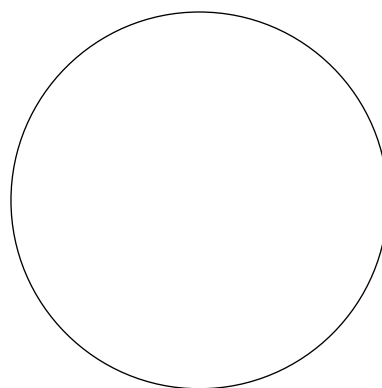
a) Difteroidi sa KA



b) Bacillus sa KA



Zadatak 9. Mikroskopirati gotov preparat obojen posebnom metodom (bojenje po Albertu). Što se uočava unutar bacila?



Zadatak 10. Je li za dokaz difterije potrebna samo izolacija korinebakterija? Zašto?

Zadatak 11. Kako se ispituje toksigenost izolata korinebakterija?

Zadatak 12. Biološka kontrola sterilizacije.

Proces sterilizacije biološki se kontrolira sporama bakterija iz roda *Bacillus* (različite vrste bacilusa za pojedine vrste sterilizacije). Spora na nosaču (papir, konac) stavlja se u sterilizator tijekom postupka sterilizacije, a nakon završenog procesa sterilizacije nasađuje se na glukozni bujon. Bujon se inkubira u termostatu na 36°C, 7-10 dana, kako bi se ispitala sterilnost nosača. Ukoliko nakon inkubacije nema razvoja vegetativnih oblika bakterija iz spora, smatra se da je postupak sterilizacije bio uspješan. Ukoliko tijekom inkubacije dođe do zamućenja bujona, postupak sterilizacije nije proveden na potreban način.

Očitati kontrolu sterilizacije za kirurški sterilizator:

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Što sadržava cjepivo protiv tuberkuloze?

2. Kako se testira osjetljivost mikobakterija na antituberkulotike?

3. Koji su principi dijagnostike difterije?

4. Što je biološka kontrola sterilnosti?

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 8

Kultivacija i identifikacija gljiva

Anita Novak

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti navedena poglavlja u udžbeniku. (L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Prvi dio: Opća mikrobiologija, poglavlje 6, str 65-67; Treći dio: Mikroorganizmi od značaja u stomatologiji, poglavlje 22)

UVOD

Gljive su, za razliku od bakterija, eukariotski organizmi. Obligatni su ili fakultativni aerobi.

Općenito gledano, gljive dijelimo po obliku u dvije osnovne forme - kvasce i plijesni.

Infekcije uzrokovane gljivama nazivamo mikoza.

Prirodno stanište većine patogenih gljiva su voda i zemlja. Ipak, najčešće gljivične infekcije ljudi, kandidijaza i dermatofitoza, su endogenog porijekla, tj. uzrokuju ih gljive koje su dio fiziološke flore različitih organskih sustava ljudi. Smatramo ih oportunističkim patogenima jer uzrokuju infekcije imunokompromitiranih i kronično oboljelih ljudi.

PRAKTIČNI RAD

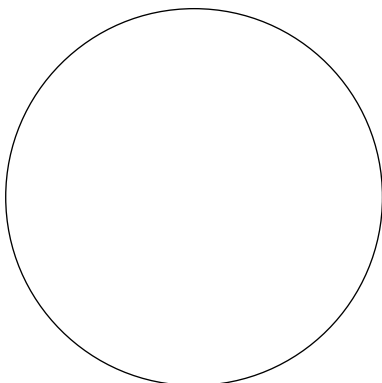
Zadatak 1. Izrada i mikroskopiranje nativnih preparata *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Candida glabrata* s KA.

Cilj: uočiti razliku u veličini između bakterijske stanice i blastokonidija kvasaca.

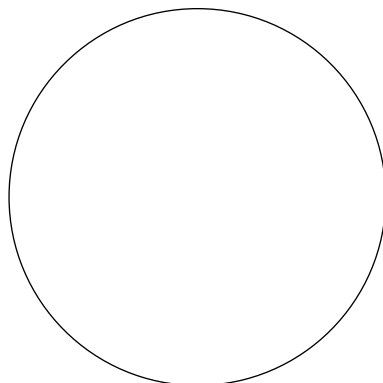
Postupak: Na predmetno staklo kapnuti kap fiziološke otopine (f.o.). Ušicom dotaknuti poraslu koloniju (otprilike pola kolonije) i napraviti homogenu suspenziju u pripremljenoj kapi f.o. Pokriti pokrovnim staklom.

Postupak ponoviti sa sve tri pripremljene kulture.

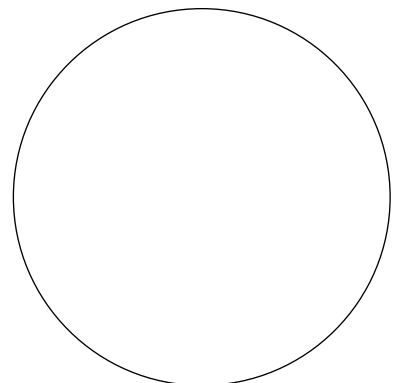
Mikroskopirati pod malim (10x) i srednjim (40x) povećanjem te nacrtati bakterijske stanice i blastokonidije.



Staphylococcus aureus



Candida albicans

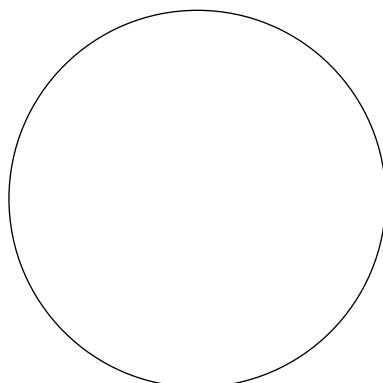


Candida glabrata

Zadatak 2. Mikroskopiranje pripremljenog nativnog preparata testa klijanja *C. albicans*.

Cilj: naučiti prepoznati germinativni tubul na blastokonidiji.

Postupak: mikroskopirati već pripremljeni preparat pod malim (10x) i srednjim (40x) povećanjem mikroskopa, uočiti germinativne tubule i nacrtati viđeno.

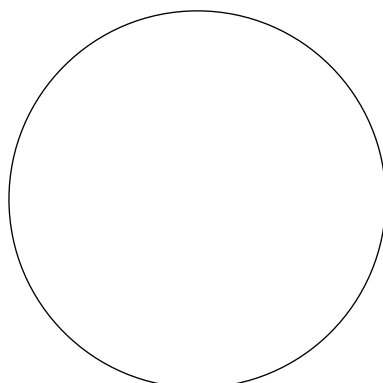


C. albicans – pozitivan test klijanja (germinacije)

Zadatak 3. Mikroskopiranje pripremljenog preparata miješane kulture (*Candida albicans* i *Staphylococcus aureus*) bojenog složenim bojenjem po Gramu.

Cilj: uočiti razliku u morfologiji i veličini gram-pozitivnih koka i blastokonidija.

Postupak: mikroskopirati pripremljeni preparat pod velikim povećanjem (100x) mikroskopa, imerzionim objektivom te nacrtati viđeno.

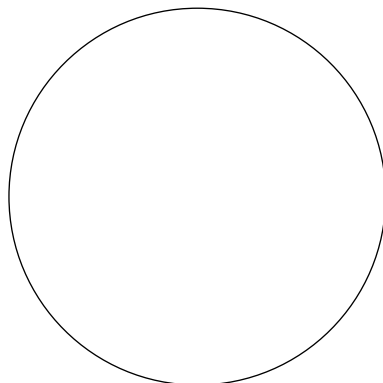


Gram preparat miješane kulture *S. aureus* i *C. albicans*

Zadatak 4. Mikroskopiranje pripremljenog nativnog preparata s laktofenolom plijesni *Penicillium* sp.

Cilj: naučiti prepoznati plodnu strukturu karakterističnu za ovaj rod plijesni.

Postupak: mikroskopirati pripremljeni preparat pod malim (10x) i srednjim (40x) povećanjem mikroskopa te nacrtati viđeno.

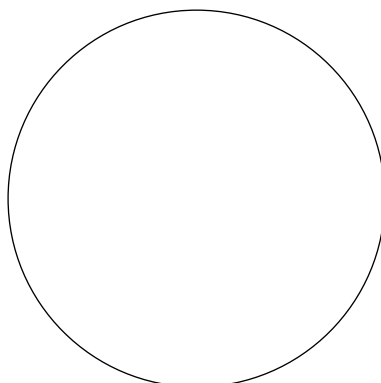


Penicillium sp.

Zadatak 5. Mikroskopiranje pripremljenog izravnog preparata iskašljaja, bojenog po Gramu, na demonstracionom mikroskopu.

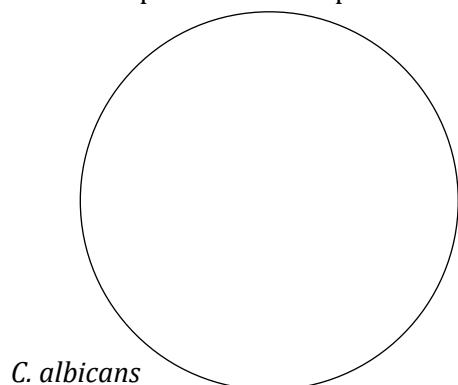
Cilj: prepoznati blastokonidije, pseudohife i hife kvasaca u direktnom mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu.

Postupak: mikroskopirati i nacrtati viđeno

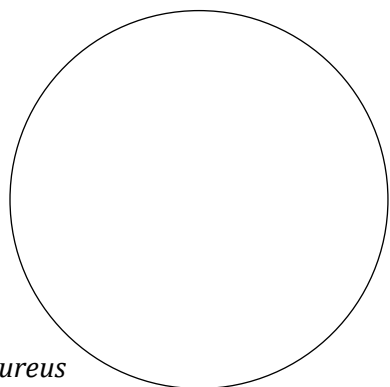


C. albicans, iskašljaj, Gram preparat

Zadatak 6. Opisati i nacrtati porasle kolonije *C. albicans* i *S. aureus* na KA.



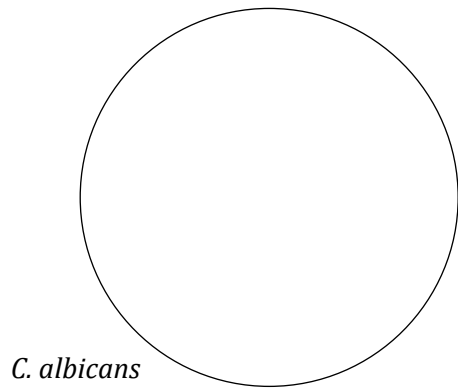
C. albicans



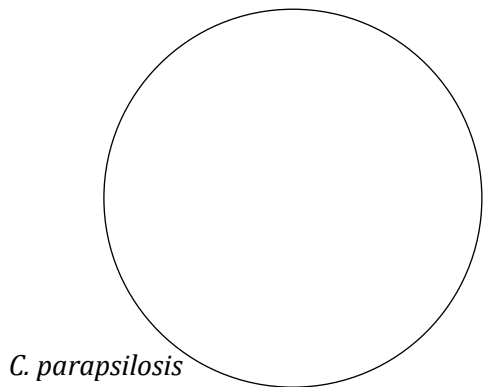
S. aureus

| KOLONIJE | <i>C. albicans</i> | <i>S. aureus</i> |
|----------|--------------------|------------------|
| VELIČINA | | |
| OBLIK | | |
| RUB | | |
| POVRŠINA | | |
| PIGMENT | | |

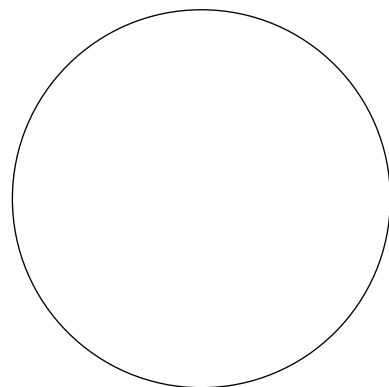
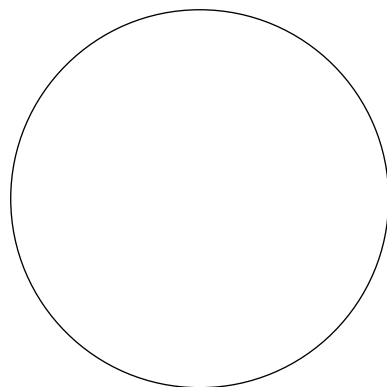
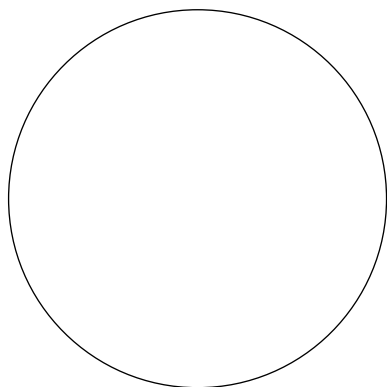
Zadatak 7. Opisati i nacrtati porasle kolonije *C. albicans* i *C. parapsilosis* na Sabouraudovom agaru



| KOLONIJE | <i>C. albicans</i> | <i>C. parapsilosis</i> |
|----------|--------------------|------------------------|
| VELIČINA | | |
| OBLIK | | |
| RUB | | |
| POVRŠINA | | |



Zadatak 8. Pogledati kolonije *Penicillium* sp. na Sabouraud agaru te *C. albicans* (zelene) i *C. parapsilosis* (roze) na kromogenoj podlozi.



Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva

1. Opiši osnovnu građu kvasaca i plijesni.

2. Koji su klinički uzorci prikladni za mikološku dijagnostiku?

3. Na kojim hranjivim podlogama i pri kojim uvjetima (atmosfera, temperatura, vrijeme) kultiviramo gljive?

4. Koje testove koristimo u identifikaciji kvasaca?

5. Kako identificiramo plijesni?

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 9

Metode izravne dijagnostike virusnih bolesti. Uzimanje kliničkog materijala za izravnu virološku dijagnostiku, transport i pohrana. Sustavi za izolaciju virusa.

Katarina Šiško-Kraljević

UVOD

Ponoviti teoretsko znanje o postupcima za otkrivanje i identifikaciju virusa (L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Prvi dio: Opća mikrobiologija, poglavlje 6, str 63-64).

Potrebno predznanje: Izravna mikroskopija kliničkog materijala, izolacija virusa, otkrivanje virusa u staničnoj kulturi.

PRAKTIČNI RAD

1. Metode izravne dijagnostike virusnih bolesti

Koja je osnovna razlika između izravne i neizravne dijagnostike zaraznih bolesti?

Koja svojstva virusa otežavaju izravnu virološku dijagnostiku?

Nabrojiti najčešće korištene metode izravne virološke dijagnostike.

Navesti bar dva virusa koja stvaraju citološkim pregledom uočljiva karakteristična inkluzijska tjelešca u inficiranim stanicama.

2. Uzimanje kliničkog materijala za izravnu virološku dijagnostiku, prijenos i pohrana

Pokraj sljedećih tvrdnji o pravilnom uzimanju uzoraka za virološku dijagnostiku navesti jesu li točne (T) ili netočne (N):

- Za izravnu virološku dijagnostiku i izolaciju virusa kliničke uzorke treba uzeti u prvim danima bolesti.
- Većina se kliničkih uzoraka može pohraniti nekoliko dana u hladnjaku (4- 8°C).
- Virusi se dugotrajno čuvaju na temperaturi od -15 do -20°C.
- Višekратно odmrzavanje i zamrzavanje ne utječe na infektivnost virusa u uzorku.
- Zamrzavanjem uzoraka pri -70°C uništava se infektivnost virusa.
- Tekuće uzorke (urin, likvor, ispirak sluznica) nije potrebno stavljati u transportni medij.
- Suhi obrisci su prikladni uzorci za izolaciju virusa.
- Pri uzimanju različitih obrisaka sluznice treba koristiti posebne briseve te energičnim uzorkovanjem prikupiti što više zaraženih stanica.
- Uzorci tkiva (biopati) obavezno se stavljaju u transportni medij i transportiraju u prijenosnom hladnjaku na temperaturi +4°C.
- Za izolaciju respiratornih virusa najčešće se uzimaju ispirci sluznica gornjih dijelova dišnih puteva.

3. Sustavi za izolaciju virusa

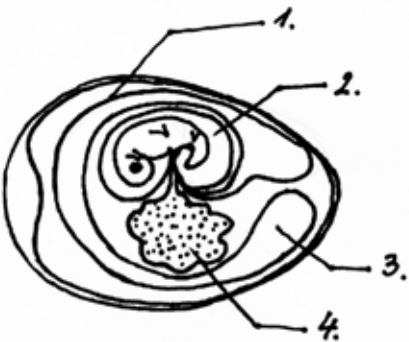
Koji se sustavi mogu koristiti za izolaciju virusa?

1. _____
2. _____
3. _____

Zašto se pokusne životinje danas iznimno rijetko koriste u kliničkoj virološkoj dijagnostici?

Koje opasnosti krije rad s pokusnim životinjama?

Zadatak 1. Na shemi (Slika 8. 1.) upisati dijelove pilećeg embrija koji se koriste za izolaciju i umnožavanje virusa.

| | |
|---|---|
|  | <ol style="list-style-type: none">1. _____2. _____3. _____4. _____ |
|---|---|

Slika 8. 1. Oplodeno kokošje jaje s razvijenim embrijem

Nabrojiti tri vrste sustava stanica:

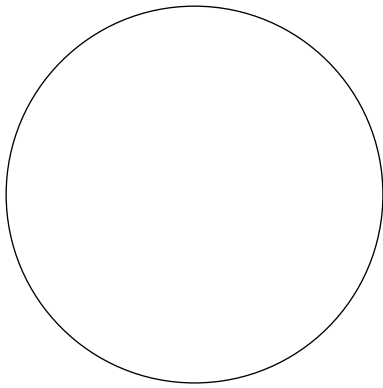
1. _____
2. _____
3. _____

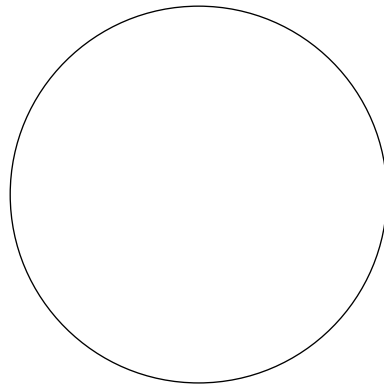
Koje stanične kulture imaju kromosomske nepravilnosti (broj i građu), neograničen broj supkultivacija te se mogu koristiti tijekom mnogo godina? _____

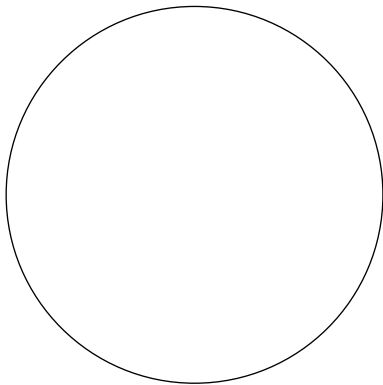
Ograničen broj pasaža (30-50 supkultivacija), kontaktna inhibicija i očuvani kariotip izvornih stanica karakteristični su za _____ stanice.

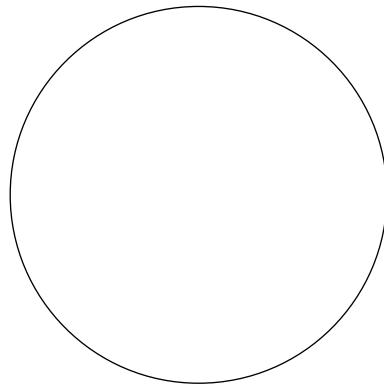
Kako se otkriva prisutnost virusa u staničnim kulturama?

Zadatak 2. Mikroskopirati i nacrtati karakteristični CPU.









Zadatak 3. Očitati i interpretirati Rota-Adeno kromatografski test.

Zadatak 4. Očitati i interpretirati lateks-aglutinaciju.

Datum:

Potpis asistenta:

VJEŽBA 10

Serološke metode u dijagnostici virusnih bolesti

Marija Tonkić

UVOD

Ponoviti teoretsko znanje o detekciji specifičnih protutijela ili antigena u serumu bolesnika (L. Samaranayake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Prvi dio: Opća mikrobiologija, poglavlje 6, str 64-65. Treći dio, poglavlje 21. Četvrti dio, poglavlja 29 i 30).

Potrebno predznanje:

-upotreba seroloških testova, način uzimanja seruma, pohrana, transport seruma, parni serumi, vrste imunoglobulina, serokonverzija, serološki profil, vrste postupaka u serološkoj dijagnostici virusnih infekcija, serološke metode u dijagnostici EBV, CMV, HBV, HCV i HIV infekcije, RVK, ELISA, Mason test.

PRAKTIČNI RAD

1. REAKCIJA VEZANJA KOMPLEMENTA (RVK)

Dopuniti rečenice:

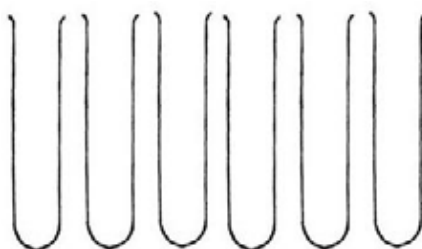
1. RVK je serološka metoda kojom se određuje _____ titar protutijela.
2. Pozitivna reakcija u RVK se očituje kao _____ .
3. Negativna reakcija u RVK se očituje kao _____ .
4. RVK zahtijeva testiranje _____ seruma da se može pratiti _____ titra protutijela.

Zadatak 1. Očitati RVK u parnim serumima pacijenta i odrediti dinamiku titra protutijela na virus mumpsa. Rezultat prikazati shematski u epruvetama prikazanim dolje..

1. serum

Početno razrjeđenje seruma:

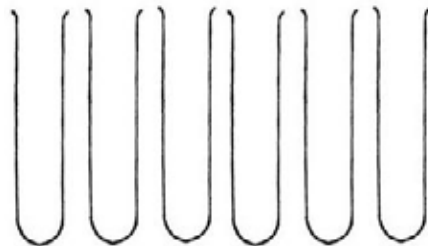
Titar protutijela u serumu:



2. serum

Početno razrjeđenje seruma:

Titar protutijela u serumu:



Interpretacija dinamike titra protutijela: _____.

2. ELISA TEST

Dopuniti rečenice:

1. ELISA testom se mogu određivati pojedine _____ imunoglobulina.
2. U ELISA testu su protuljudska protutijela obilježena _____.
3. U ELISA testu se mjeri boja _____ koji je promijenjen djelovanjem _____.
4. ELISA test može biti kvalitativan ili _____.

Zadatak 2.1. Protumačiti stadij EBV infekcije temeljem zadanih vrijednosti.

| Rezultat ELISA testa | | | Tumačenje nalaza |
|----------------------|--------|----------|------------------|
| EA-IgM | EA-IgG | EBNA-IgG | |
| - | - | - | |
| + | + | - | |
| - | + | - | |
| + | +/- | + | |
| - | + | + | |

Zadatak 2.2. Očitati ELISA test u mikrotitar pločici i temeljem rezultata protumačiti stadij EBV infekcije.

| Serum | EA-IgM | EA-IgG | EBNA-IgG | Tumačenje nalaza |
|-------|--------|--------|----------|------------------|
| 1. | | | | |
| 2. | | | | |
| 3. | | | | |
| 4. | | | | |
| 5. | | | | |

Zadatak 2.3. Očitati ELISA test za CMV i napisati tumačenje rezultata.

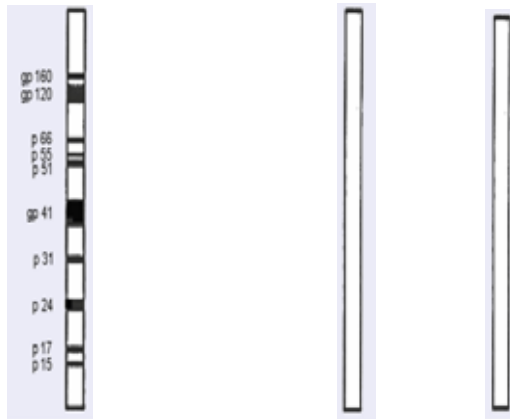
| Serum | CMV-IgM | CMV-IgG | Tumačenje nalaza |
|-------|---------|---------|------------------|
| 1. | | | |
| 2. | | | |
| 3. | | | |
| 4. | | | |
| 5. | | | |

3. WESTERN BLOT (WB)

Dopuniti rečenice:

1. Serološka metoda Western blot služi za određivanje_____.
2. WB služi kao _____ test u dijagnostici HIV infekcije.

Zadatak 3.1. Prema priloženoj shemi očitati i nacrtati WB test za dva bolesnika koji su zadani na vježbi i interpretirati nalaz.



Pac. 1.

Pac. 2.

4. MASONOV TEST

Dopuniti rečenice:

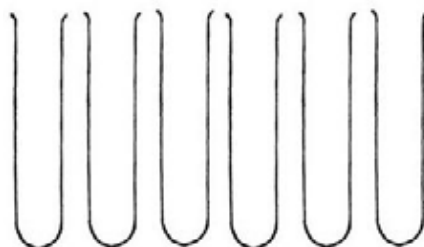
1. Masonov test služi u dijagnostici _____.
2. U osoba koje boluju od _____ nalaze se _____ za _____ eritrocite.
3. Masonov test se naziva i hemoliza_____eritrocita.

Zadatak 4.1. Očitati test po Masonu.

1. serum

Početno razrjeđenje seruma:

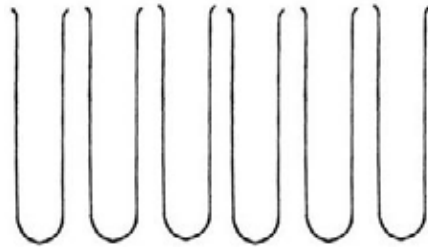
Titar protutijela u serumu:



2. serum

Početno razrjeđenje seruma:

Titar protutijela u serumu:



Interpretacija dinamike titra protutijela: _____.

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva

1. Titar protutijela je _____ .
2. Serokonverzija je _____ .
3. Serološke reakcije kojima se mogu odrediti titrovi pojedinih klasa imunoglobulina su _____ .
4. Koja je prednost ELISA testa u odnosu na RVK? _____ .
5. Kako se serološki očituje reinfekcija? _____ .

Datum:

Potpis asistenta:

11. VJEŽBA

Fiziološka flora čovjeka. Mikrobiološka dijagnostika parodontalne bolesti.

Marija Tonkić

UVOD

Ponoviti teoretsko znanje o fiziološkoj flori čovjeka, posebno fiziološkoj flori usne šupljine i ždrijela. Ponoviti patofiziologiju nastanka parodontalne bolesti i mikrobiološke značajke najvažnijih uzročnika. (L. Samaranyake: Osnove mikrobiologije za dentalnu medicinu, Placebo, Split, 2022.; Peti dio: Mikrobiologija usne šupljine, poglavlja 31- 33.)

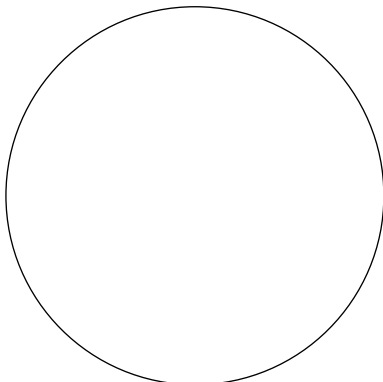
Potrebno predznanje:

-najvažnije bakterije usne šupljine i ždrijela čovjeka, uzročnici karijesa, najvažniji uzročnici parodontalne bolesti, mikrobiološka dijagnostika parodontalne bolesti

PRAKTIČNI RAD

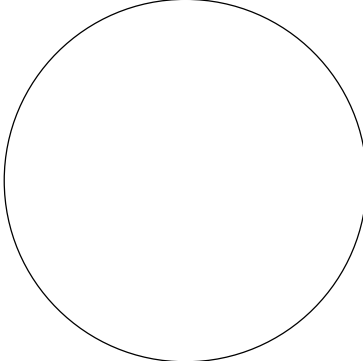
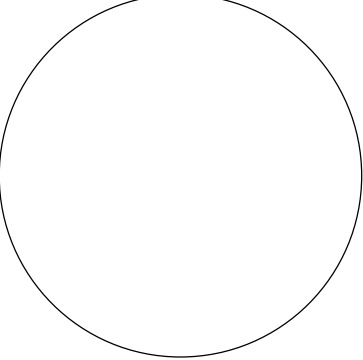
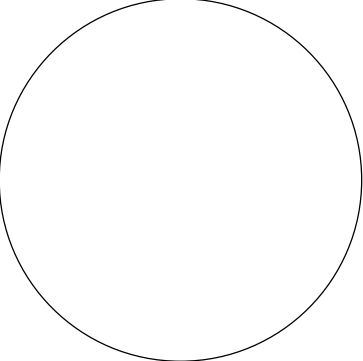
1. Fiziološka flora usne šupljine i ždrijela

Zadatak 1. Shematski prikazati i opisati nekoliko kolonija bakterija koje prepoznajete na ploči krvnog agara s nasijanim obriskom ždrijela. Pokušati zaključiti o kojim izolatima se radi..



| | IZOLATI | | |
|----------|---------|--|--|
| KOLONIJE | | | |
| VELIČINA | | | |
| HEMOLIZA | | | |
| OBLIK | | | |
| RUB | | | |
| POVRŠINA | | | |
| PIGMENT | | | |

Zadatak 2. Od pojedinačnih kolonija s ploče krvog agara iz prethodnog zadatka, odabrati nekoliko kolonija s različitom morfologijom i hemolizom te od pojedinačnih kolonija napraviti gram preparat. Nakon toga, viđene oblike nacrtati i pokušati identificirati. Usporediti zaključke iz ovog i prethodnog zadatka.

| | |
|-------|--|
| _____ |  |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ |  |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ |  |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ | |
| _____ | |

Zadatak 3. Sterilnim obriskom energično obrisati tkivo vlastite gingive i izraditi razmaz koji ćete obojiti bojenjem po Gramu. Nacrtati uočene oblike i zaključiti o kojoj vrsti mikroorganizama se radi (npr. streptokoki, stafilokoki, najserije,...).

| Mikroorganizam | Bojenje po Gramu | Morfologija | Zaključak |
|----------------|------------------|-------------|-----------|
| 1. | | | |
| 2. | | | |
| 3. | | | |
| 4. | | | |
| 5. | | | |
| 6. | | | |

2. Mikrobiološka dijagnostika parodontalne bolesti

Zadatak 4. Navesti bakterije koje su najvažniji uzročnici parodontalne bolesti i njihove mikrobiološke značajke.

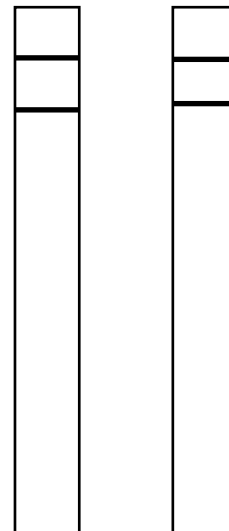
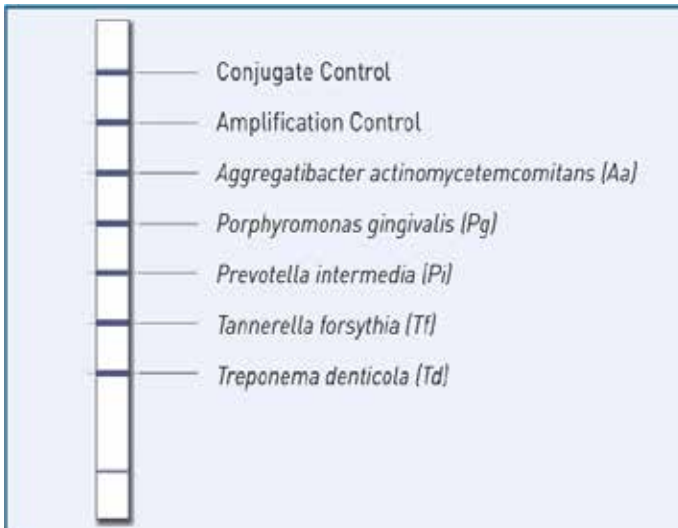
| Mikroorganizam | Bojenje po Gramu | Morfologija | Aerob/anaerob |
|----------------|------------------|-------------|---------------|
| 1. | | | |
| 2. | | | |
| 3. | | | |
| 4. | | | |
| 5. | | | |
| 6. | | | |

Zadatak 5. Navesti načine na koje se mikrobiološki može dijagnosticirati parodontalna bolest.

1. _____
2. _____
3. _____

Zadatak 6. Ukratko objasniti princip microDent testa kao metode za molekularnu dijagnostiku parodontalne bolesti.

Zadatak 7. Očitati i shematski prikazati rezultate microDent testa za 2 bolesnika koji su zadani na vježbi. Koji uzročnici parodontalne bolesti su dokazani u 1. i 2. pacijenta?



Pac. 1.

Pac. 2.

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva

Nabrojite najvažnije bakterijske vrste koje čine fiziološku floru usne šupljine čovjeka.

Koje su bakterije najvažnije u nastanku karijesa i zašto?

Koji se uzročnici parodontalne bolesti u čovjeka mogu uzgojiti i na koji način?

Na koji način se uzima obrisak za molekularnu dijagnostiku parodontalne bolesti?

Navedite pojedine faze microDent testa.

Datum:

Potpis asistenta:
