MARIJA TONKIĆ I SURADNICI

MEDICINSKA MIKROBIOLOGIJA
PRAKTIKUM ZA VJEŽBE ZA STUDENTE MEDICINE

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠTE U SPLITU - MEDICINSKI FAKULTET
KATEDRA ZA MEDICINSKU MIKROBIOLOGIJU I PARAZITOLOGIJU

Medicinska mikrobiologija

Praktikum za vježbe za studente Medicine

Marija Tonkić i suradnici

Split, 2026.

SADRŽAJ

VJEŽBA B1 7
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)

VJEŽBA B2 23
Principi kultivacije i identifikacije piogenih koka. Izvedba, očitavanje i interpretacija antibiograma (metoda disk-difuzije, dilucija u bujonu, dilucija u agaru, E-test).
(Žana Rubić, Marina Radić)

VJEŽBA B3 41
Makroskopska i biokemijska identifikacija te serotipizacija enterobakterija. Widalova reakcija aglutinacije. Značajke rodova *Bordetella* i *Brucella*.
(Anita Novak)

VJEŽBA B4 51
Kultivacija i identifikacija rodova *Pseudomonas, Campylobacter, Vibrio, Helicobacter, Neisseria, Haemophilus*. Uzimanje i transport uzoraka za izolaciju anaerobnih bakterija. Principi anaerobne kultivacije.
(Merica Carev)

VJEŽBA B5 69
B. anthracis - prikaz spora i kapsule, *B. subtillis* - nasijavanje spora. *Corynebacterium* – uzgoj, bojenje i mikroskopija. *Listeria* – kultura, mikroskopija. Bojenje po Ziehl-Neelsenu. Uzimanje, slanje i obrada uzoraka za izolaciju mikobakterija. Uzgoj mikobakterija. Test rezistencije na tuberkulostatike. *Legionella* – dijagnostički postupci. Serološki testovi za *T. pallidum*. *Mycoplasma, Ureaplasma* – kultura, *Chlamydia* – dijagnostika.
(Ivana Goić Barišić, Vanja Kaliterna)

VJEŽBA M 79
Kvasci i plijesni – makro i mikromorfologija. Principi kultivacije i identifikacije medicinski značajnih kvasaca i plijesni. Dijagnostika dermatomikoza.
(Anita Novak)

VJEŽBA P1 87
Dijagnostika toksoplazmoze, lišmenioze i malarije. Krvni razmaz, gusta kap i bioptati obojeni po Giemsa-Romanowskom. Serološka dijagnostika. Medicinski značajni artropodi – morfologija.
(Katarina Šiško Kraljević)

VJEŽBA P2 95
Dijagnostika crijevnih parazitoza. Mikroskopiranje nativnih preparata, preparata s Lugolovom otopinom te koncentrata (MIFC). Mikromorfologija cista protozoa, jaja i ličinki helminata. Prepoznavanje adultnih oblika. Analni otisak po Grahamu. Dijagnostika ehinokokoze i trihineloze.
(Katarina Šiško Kraljević)

VJEŽBA V1 ..... **103**
Metode izravne dijagnostike virusnih bolesti. Uzimanje materijala za izravnu virološku dijagnostiku, prijenos i pohrana. Sustavi za izolaciju virusa.
(Irena Tabain)

VJEŽBA V2 ..... **109**
Metode neizravne dijagnostike infektivnih bolesti - serologija.
(Marija Tonkić)

POPIS AUTORA **121**

VJEŽBA B1

Katarina Šiško Kraljević

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

1. Upoznavanje s mikrobiološkim laboratorijem i osnovnim principima sigurnosnog 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 zaštiti 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.

- 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. Mikroskopi u vježbaonici 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), 10x (žuti) i 40x (plavi) te imerzioni objektiv koji povećava 100x, a označen je crnom i bijelom linijom. Suhi objektivi se koriste za mikroskopiranje nativnih, neobojenih preparata. Imerzioni objektiv se koristi za mikroskopiranje bojenih preparata tako da se prvo na preparat kapne kapljica imerzionog sredstva (cedrovo ulje, anisol i sl.) u koju se zatim uroni imerzioni objektiv. Anisol nije potrebno brisati.

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. Makrovijak koristimo za traženje, a mikrovijak za fokusiranje slike.

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 objektiv 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.
- Kondezor 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.

Ako mikrovijkom ne uspijevate naći sliku, treba postupiti na sljedeći 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 objektiv 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:
  - okrugle bakterije (koki), kokobacili, štapićaste bakterije (bacili), filamenti
- U odnosu na središnju os, štapićaste 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 enterobakterijama ili gram-pozitivni sporogeni bacili u lancima, što bi odgovaralo Bacillus spp.*

Zadatak 2. Mikroskopiranje nativnog preparata sedimenta urina (demonstracijski mikroskop)

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

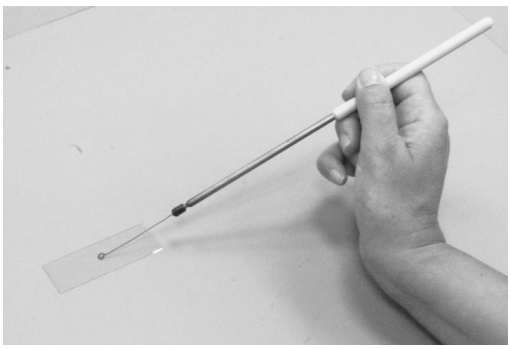
Postupak:

1. Spaljenom i ohlađenom ezom prebaciti kap sedimenta urina na predmetno 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.

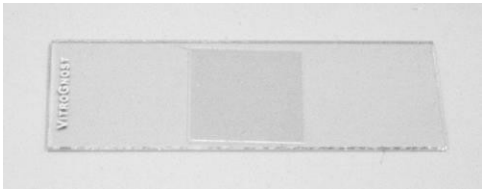
(***S preparatima rukovati oprezno, radi se o zaraznom materijalu!***)

A

B



C



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

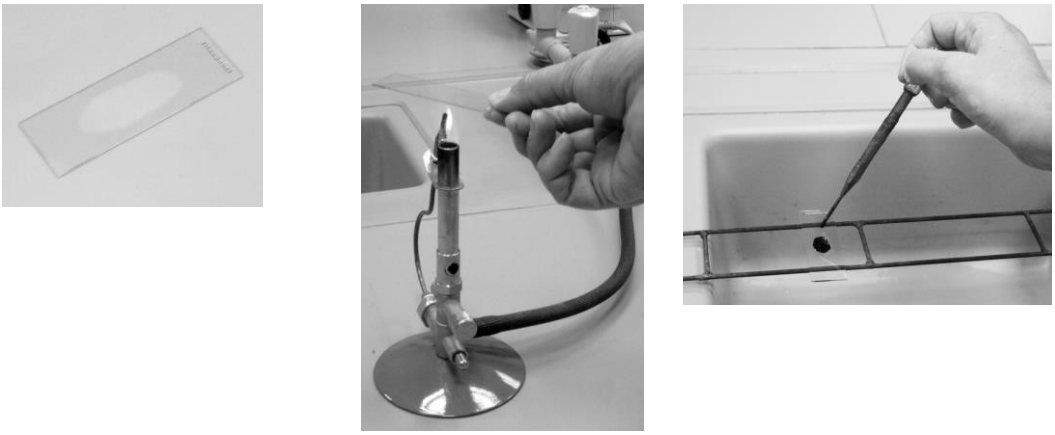
Potreban materijal:

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

Postupak:

1. Sterilnom pipetom prebaciti kap sedimenta urina na predmetno stakalce (Slike 1. 2. A i B).
2. Spaljenom i ohlađenom ezom 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 (povećanje 100x).
12. Opisati i nacrtati sliku oba preparata.
13. Nakon završetka preparat odbaciti u posudu s dezinficijensom.

A B

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 klasifikacije i identifikacije bakterijskih vrsta.

3.1. Vrste podloga

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 (Mueller-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 (briljantno 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 H_2S.

- 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 karakteristike kolonija (VORP):

- **Veličina** (promjer u milimetrima):
  - velike (> 1 mm)
  - srednje (= 1 mm)
  - male (< 1 mm)
- **Oblik:**
  - točkaste
  - okrugle
  - nitaste
  - nepravilne
- **Rub**:
  - ravan
  - valovit
  - nazubljen
- **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 Mueller- Hinton agar (MH) koji se koristi za izradu antibiograma.

Na krvnom agaru se obavezno 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** (cistin, laktoza, elektrolit deficijentni) **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 - H_2S pozitivno (H_2S+)
  - nema crne točke - H_2S negativno (H_2S-).

  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 H_2S+).

Zadatak 5. Opis kolonija

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

Hranjivi agar		
	Pseudomonas aeruginosa	*Serratia marcescens*
Veličina		
Oblik		
Rub		
Površina		
Pigment		

B. Promotriti pojedinačnu izdvojenu koloniju na krvnom agaru, nacrtati je i opisati njezine karakteristike:

Krvni agar		
	Streptococcus pyogenes	*Escherichia coli*
Veličina		
Oblik		
Rub		
Površina		
Hemoliza		
Pigment		

C. Promotriti pojedinačnu izdvojenu koloniju na SS agaru, nacrtati je i opisati njezine karakteristike:

SS agar		
	Escherichia coli	*Salmonella* spp.
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 nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

Bilješke:

VJEŽBA B2

Žana Rubić

Principi kultivacije i identifikacije piogenih koka.

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti 13. i 14. poglavlja udžbenika Tonkić M, Dobec M, Abram M. Medicinska mikrobiologija, 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.

UVOD

Stafilokoki

Stafilokoki su široko rasprostranjeni u prirodi, a njihovo glavno stanište su koža i sluznice sisavaca. Vrste roda *Staphylococcus* su gram-pozitivni koki koji se najčešće pojavljuju u nepravilnim nakupinama. Nepokretni su i nesporogeni. Na krvnom agaru rastu u obliku glatkih, sjajnih i konveksnih kolonija. *Staphylococcus aureus* može imati zlatno-žuti pigment. Nakon 24 sata inkubacije, kolonije imaju promjer 2-3 mm i pokazuju β-hemolizu ili je uopće nemaju (tzv. γ-hemoliza). Uglavnom su fakultativni anaerobi. Imaju fermentativni metabolizam.

Vrste roda *Staphylococcus* su obično **pozitivne na katalazu**, što je razlikovni čimbenik od roda streptokoka, koji su katalaza negativni i imaju drugačiji sastav stanične stijenke.

Među stafilokokima, *Staphylococcus aureus* je češće povezan s teškim infekcijama i važno ga je razlikovati od oportunističkih koagulaza-negativnih stafilokoka. U rutinskoj laboratorijskoj praksi, prisutnost **koagulaze (vezane ili slobodne)** se često koristi kao kriterij za razlikovanje *S. aureus* od ostalih stafilokoka.

Stafilokoki se mogu identificirati i na temelju stvaranja **deoksiribonukleaze (DNA-ze)**. *S. aureus* je DNA-za-pozitivan.

Višestruka rezistencija na antibiotike se najčešće povezuje sa stafilokokom rezistentnim na meticilin (engl. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; **MRSA**).

Koagulaza-negativni stafilokoki (KNS) su normalni komenzali kože i sluznica. Dugo su se smatrali nepatogenima, međutim, zbog povećane uporabe raznih intravaskularnih, protetskih i drugih uređaja, te sve većeg broja imunokompromitiranih bolesnika, KNS su postali važni uzročnici nekih infekcija. *S. epidermidis* i *S. saprophyticus* se najčešće povezuju s infekcijama, ali opisano je više od 30 različitih vrsta i svi mogu biti potencijalni uzročnici.

Streptokoki

Rod *Streptococcus* obuhvaća veliki broj komenzalnih i patogenih vrsta u ljudi i životinja. Do danas je opisano preko 100 vrsta.

U mikroskopskom preparatu streptokoki su gram-pozitivni koki poredani u lančiće i/ili parove. Nepokretni su i nesporogeni. Fakultativni su anaerobi, a neki zahtijevaju CO_2 za rast. Ugljikohidrate metaboliziraju fermentativno.

Katalaza su negativni što ih razlikuje od roda *Staphylococcus*.

Na krvnom agaru različite vrste pokazuju različite vrste hemolize (najčešće **α ili β**), što se može koristiti kao rani korak u identifikaciji kliničkih izolata. Nadalje, β-hemolitički streptokoki se karakteriziraju **serotipizacijom po R. Lancefield**, na temelju ugljikohidratnih antigena specifičnih za grupu koji su prisutni na bakterijskoj staničnoj stijenci. Klinički značajne grupe su A, B, C, D, F i G.

Streptococcus pyogenes ili **β-hemolitički streptokok grupe A (BHS-A)** je jedna od najvirulentnijih vrsta roda *Streptococcus*. To su gram-pozitivni koki u lancima.

Nakon 24 sata inkubacije na krvnom agaru raste u vidu malih, glatkih i konveksnih kolonija promjera 0,5 do 1 mm, s velikom zonom β-hemolize. Neki sojevi mogu stvarati mukoidne kolonije. Razlikuje se od drugih β-hemolitičkih streptokoka prema osjetljivosti na **bacitracin** i prisutnosti enzima pirolidonil arilamidaze (PYR).

Streptococcus agalactiae **(β-hemolitički streptokok grupe B; BHS-B)** ima sličan mikroskopski i makroskopski izgled kao *S. pyogenes*. Uzročnik je različitih infekcija, među kojima posebnu važnost imaju pneumonija, sepsa i meningitis u novorođenčadi.

Jedan od načina za razlikovanje *S. agalactiae* od *S. pyogenes* je **CAMP test** (Christie, Atkinson, Munch, Peterson), koji se temelji na sinergističkoj lizi eritrocita hemolizinom kojeg stvara *S. aureus* i ekstracelularnim CAMP faktorom kojeg stvara *S. agalactiae* (trokutasto proširenje hemolize).

Streptococcus pneumoniae **(„pneumokok“)** je gram-pozitivni izduženi kok u parovima ili lancima, katkad s vidljivom kapsulom. Ponekad se oboji gram-varijabilno. Na krvnom agaru kolonije su male, plosnate, promjera 1 do 2 mm i okružene α-hemolizom. Ako je kapsula jače izražena, kolonije su mukoidne. S vremenom dolazi do autolize pa kolonija propada u središnjem dijelu.

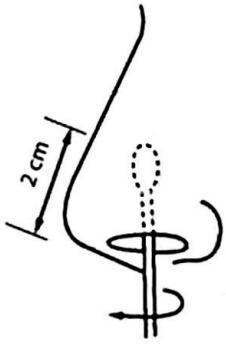
S. pneumoniae se može razlikovati od drugih viridans streptokoka prema osjetljivosti na **optohin** i topljivosti u žuči.

Viridans streptokoki su gram-pozitivni koki u lancima. Riječ „viridans“ znači „zeleno“ i odnosi se na boju α-hemolize. Ovi mikroorganizmi su dio komenzalne flore sluznica ljudi i životinja, ali u određenim uvjetima mogu uzrokovati endokarditis ili druge infekcije.

Rezistentni su na optohin.

PRAKTIČNI RAD

Uzimanje i nasijavanje obriska 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 uvući bris u nosnicu do otprilike 2 cm dubine i nježno zarotirati nekoliko puta po sluznici nosa.
4. Oprezno vratiti obrisak u epruvetu i začepiti je.

Uzorak bi trebalo dostaviti u mikrobiološki laboratorij pri sobnoj temperaturi u roku od 2 sata od uzorkovanja. Uzorak se može pohraniti najdulje do 24 sata, također pri sobnoj temperaturi. Nasijava se na krvni agar koji se inkubira pri 35-37°C/24 sata uz povišenu koncentraciju CO_2.

Uzimanje i nasijavanje obriska ždrijela

1. Na naljepnicu epruvete s brisom napisati ime i prezime pacijenta, datum i vrstu uzorka.
2. Sterilnim štapićem (špatulom) se potisne jezik prema dolje, a bolesnik istovremeno izgovara samoglasnik 'A' da bi se podigla uvula.
3. Sterilnim brisom se čvrsto obrišu tonzile, nepčani lukovi i stražnja stijenka ždrijela. Pri tome treba izbjegavati dodir s jezikom, bukalnom sluznicom i slinom.
4. Oprezno vratiti obrisak u epruvetu i začepiti je.

Uzorak bi trebalo dostaviti u mikrobiološki laboratorij pri sobnoj temperaturi u roku od 2 sata od uzorkovanja. Može se pohraniti najdulje do 24 sata, također na sobnoj temperaturi. Nasijava se na krvni agar koji se inkubira pri 35-37°C/24 sata uz povišenu koncentraciju CO_2.

DEMONSTRACIJA

Hemoliza

Gram-pozitivni koki na krvnom agaru mogu stvarati različite vrste hemolize,

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

Test katalaze

Ovim testom određuje se sposobnost mikroorganizma da pomoću enzima katalaze razgradi vodikov peroksid na vodu i kisik.

Pomoću eze se prenese uzorak kulture na predmetnicu i doda 1-2 kapi 3%-tnog H_2O_2. Pozitivna reakcija se očituje pjenušanjem, odnosno stvaranjem mjehurića kisika u ispitivanoj kapi.

Stafilokoki su katalaza _____ , dok su streptokoki katalaza _____ .

Test koagulaze

Ovim testom određuje se sposobnost bakterija da sintetiziraju enzime koji koaguliraju krvnu plazmu. Može se dokazivati prisutnost vezane ili slobodne koagulaze.

a) **Vezana 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 pojavit 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 pri 37°C, stvorit će se ugrušak na dnu epruvete.

Staphylococcus aureus je u oba testa koagulaza _____ , te se po tome razlikuje od ostalih stafilokoka, koji se, zbog svojstva da ne stvaraju koagulazu, jednim imenom nazivaju ____ _____ (KNS).

Test DNA-ze

Ovim testom određuje se sposobnost bakterije da sintetizira enzim koji razgrađuje DNA. Soj se kultivira na krutoj podlozi koja sadrži polimeriziranu DNA.

Nakon inkubacije pri 35-37°C/24 sata , na podlogu se dodaje razrijeđena klorovodična kiselina koja izaziva precipitaciju nerazgrađene DNA što izaziva zamućenje podloge, dok oko sojeva koji stvaraju DNA-zu ostaje prozračna zona.

S. aureus je DNA-za _____ .

Test osjetljivosti na bacitracin

Ovaj test se koristi za razlikovanje vrste *Streptococcus pyogenes* od drugih vrsta beta-hemolitičkih streptokoka.

Na krvni agar se, nakon nasijavanja ispitivanog soja, postavi disk bacitracina. Nakon inkubacije od 18-24 h pri 35-37 °C, očitava se zona inhibicije oko diska.

Ako postoji bilo kakva zona inhibicije oko diska, soj se smatra osjetljivim na bacitracin, što znači da je to _____. Ako je soj rezistentan na bacitracin, onda je neka druga vrsta _____ streptokoka.

CAMP test

Ovaj test se koristi za razlikovanje vrste *Streptococcus agalactiae* od drugih vrsta beta-hemolitičkih streptokoka. CAMP je akronim stvoren od imena autora testa (Christie, Atkinson, Munch i Peterson).

Na sredinu krvnog agara se nasije linija soja *Staphylococcus aureus*, a okomito na tu liniju se nasiju linije s ispitivanim sojevima, s tim da se linije približavaju jedna drugoj do otprilike 2 mm. Nakon inkubacije od 18-24 h pri 35-37 °C, *Streptococcus agalactiae* će u blizini stafilokoka izazvati trokutasto pojačanje beta-hemolize.

Test osjetljivosti na optohin

Ovaj test se koristi za razlikovanje vrste *Streptococcus pneumoniae* od drugih vrsta alfa-hemolitičkih streptokoka.

Na krvni agar na koji se nasije ispitivani soj, postavi se disk optohina. Nakon inkubacije od 18-24 h na 35-37 °C, očitava se zona inhibicije oko diska. Ako je zona promjera 14 mm ili veća, soj se smatra osjetljivim na optohin, što znači da je to _____. Ako je soj rezistentan na optohin, pripada nekoj drugoj vrsti _____ streptokoka.

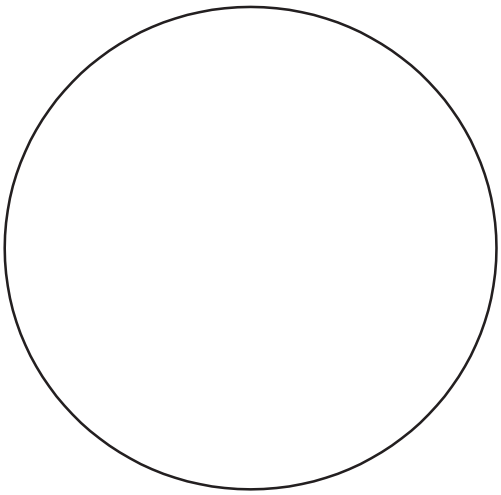
PRAKTIČNI RAD:

Postupak bojenja po Gramu:

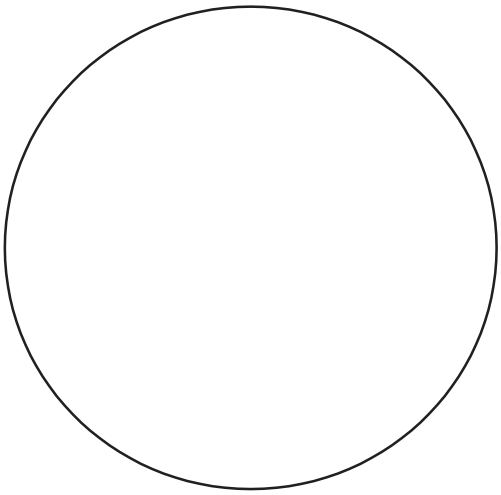
1. Na predmetnici napraviti tanki razmaz kulture (ili nekog biološkog uzorka) i ostaviti da se osuši na zraku.
2. Fiksirati nad plamenom 3-4 puta.
3. Predmetnicu staviti na rešetku za bojenje.
4. Razmaz preliti otopinom kristal-violeta, ostaviti 1 min.
5. Odliti višak otopine kristal-violeta.
6. Razmaz preliti Lugolovom otopinom, ostaviti 1 min.
7. Isprati vodom.
8. Držeći predmetnicu u kosom položaju između palca i kažiprsta, razmaz pokapati aceton-alkoholom, dok se višak boje ne ispere.
9. Isprati vodom.
10. Predmetnicu staviti na rešetku za bojenje i preliti otopinom karbol-fuksina, ostaviti 1 min.
11. Isprati vodom.
12. Postaviti predmetnicu u položaj za sušenje na zraku.
13. Na potpuno suhi razmaz staviti kap anisola i gledati imerzionim objektivom, pod velikim povećanjem (objektiv 100x).

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

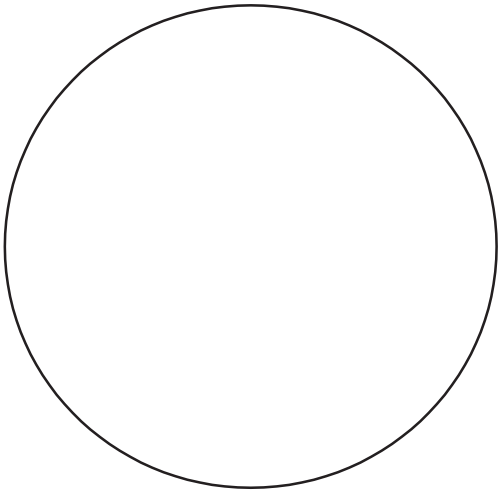
a) *Staphylococcus aureus* iz kulture na krvnom agaru



b) *Streptococcus pneumoniae* iz kulture na krvnom agaru



c) *Streptococcus pyogenes* iz bujona



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

a) *Streptococcus pneumoniae* iz krvi miša; bojenje metilenskim modrilom

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

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

	Staphylococcus aureus	*Staphylococcus epidermidis*
Veličina		
Oblik		
Rub		
Površina		
Hemoliza		
Pigment		

	Streptococcus pyogenes	*Streptococcus agalactiae*
Veličina		
Oblik		
Rub		
Površina		
Hemoliza		
Pigment		
Bacitracin test		

	Streptococcus pneumoniae	Streptokok skupine „viridans“
Veličina		
Oblik		
Rub		
Površina		
Hemoliza		
Pigment		
Optohin test		

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Bris nosa i ždrijela transportiraju se na _____ temperaturi.
2. Hemoliza nastaje zbog _____.
3. Beta-hemolitički streptokok skupine B je _____.
4. Testom slobodne ili vezane koagulaze dokazuje se _____.
5. *Streptococcus pneumoniae* se dokazuje testom osjetljivosti na _____.
6. U antibiogramu, meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* se prepoznaje po rezistenciji na disk _____.

Bilješke:

Marina Radić Skelin

Izvedba, očitavanje i interpretacija antibiograma (metoda disk-difuzije, dilucija u bujonu, dilucija u agaru, E-test)

Uvod

Antibiotik je kemijski spoj koji inhibira rast bakterija (bakteriostatsko djelovanje) ili ih ubija (baktericidno djelovanje) 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 mikrobiološkom laboratoriju se rutinski može ispitivati osjetljivost bakterija na antimikrobne lijekove, 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 osjetljivost na samo jednog predstavnika iz određene skupine antimikrobnih lijekova (primjerice, eritromicin iz skupine makrolida) jer rezultat ukazuje na osjetljivost na cijelu skupinu.

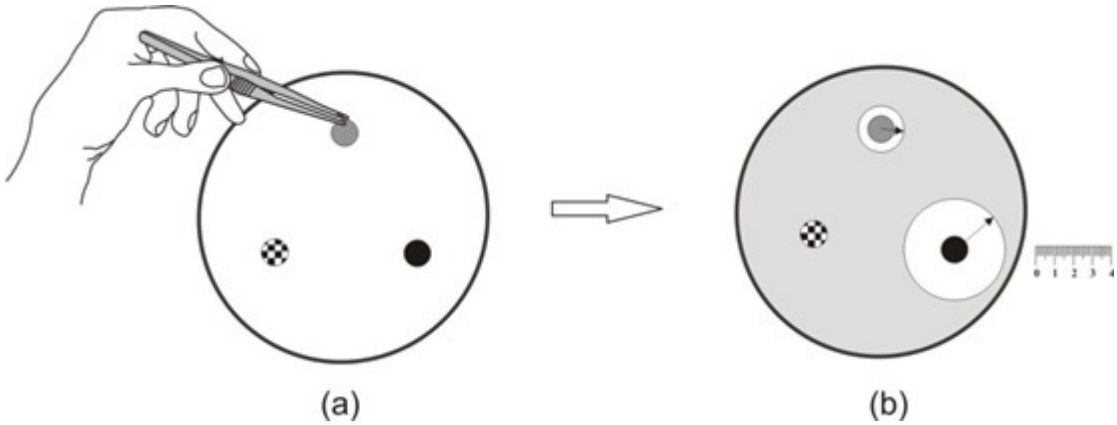
Testovi za određivanje antimikrobne osjetljivosti (antibiogram) utvrđuju sposobnost antimikrobnih tvari da inhibiraju bakterijski rast *in vitro.* Testiranje se može izvesti difuzijskim, odnosno dilucijskim metodama. Pri tome je važno naglasiti značaj pravilnog postupka izvođenja antibiograma i interpretacije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

Disk-difuzija (Kirby-Bauer metoda)

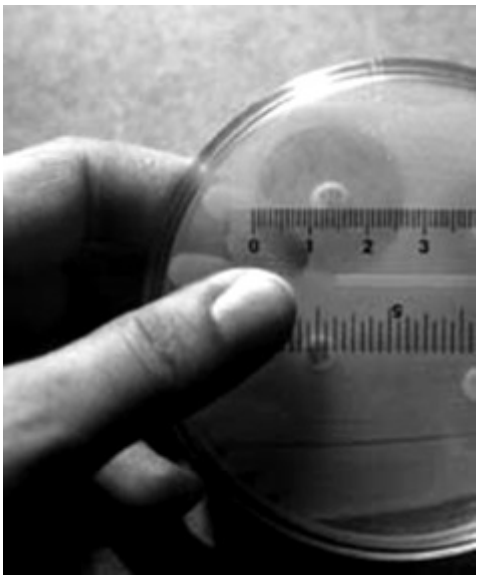
Ova metoda predstavlja najčešći rutinski način testiranja antimikrobne osjetljivosti bakterija.

Komercijalno dostupni papirnati diskovi, natopljeni određenom količinom antibiotika, postavljaju se na površinu čvrste standardizirane podloge za izradu antibiograma (Mueller-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 dispenzora (ili sterilnom pincetom) na površinu podloge nanose diskovi antibiotika, pri čemu je najmanja udaljenost među njima 20 mm. Podloga s postavljenim diskovima se zatim inkubira u termostatu 18-24 sata, pri 35-37°C.

Tijekom inkubacije, antibiotik iz diska difundira u podlogu i, 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**. Nakon toga se mjeri **promjer** zone inhibicije 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 (engl. *susceptible*; oznaka **S**) → soj je podložan terapijskom učinku antibiotika u srednjim ili prosječnim dozama u svim područjima organizma;
- umjereno (intermedijarno) osjetljiv (engl. *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 (engl. *resistant*; oznaka **R**) → antibiotik primijenjen u maksimalno dopuštenim dozama ne djeluje na soj.

Dilucija u bujonu

Dilucija u bujonu je postupak u kojem se u epruvete (makrodilucija) ili bazenčiće (jažice) mikrotitarske ploče; mikrodilucija) s Mueller-Hinton bujonom doda jednaka količina suspenzije ispitivanog soja (gustoće 0,5 McF), te testirani antibiotik čija se koncentracija dvostruko serijski razrjeđuje u svakoj sljedećoj epruveti ili bazenčiću. Nakon inkubacije (18-24 h, 35-37°C) promatra se porast bakterija koji se očituje zamućenjem tekuće podloge (bujona). 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 µg/ml, odnosno mg/l) koja *in vitro* sprječava rast bakterija. Koncentracija antibiotika u prvoj bistroj epruveti u nizu, dakle onoj bez bakterijskog porasta (tj. bez zamućenja), je MIK.

Ako korištenjem dilucijske metode, nakon inkubacije, nije uočeno zamućenje bujona, tada se taj nezamućeni bujon presije (supkultivira) na krutu podlogu bez antibiotika (najčešće na krvni agar). Podloge se zatim inkubiraju, pri čemu se određuje koja je prva koncentracija antibiotika koja u potpunosti onemogućava porast bakterija na podlozi te se izražava kao minimalna baktericidna koncentracija (MBK). Ta vrijednost označava najnižu koncentraciju antibiotika (izraženu u µg/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.

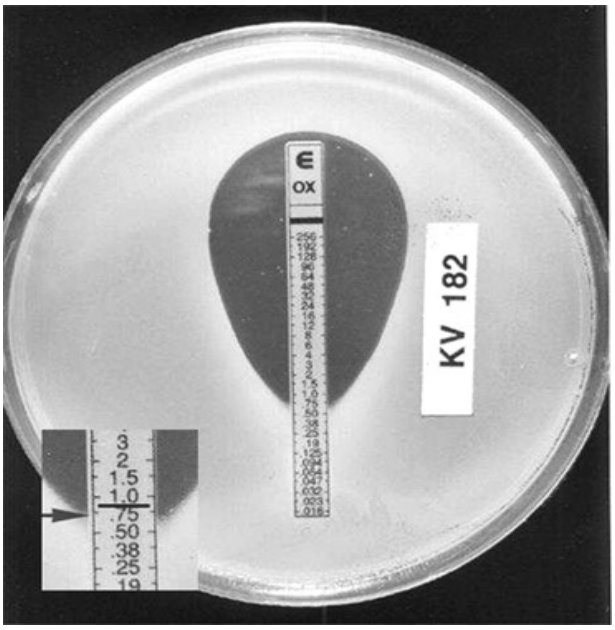
Dilucija u agaru

Dilucija u agaru je postupak analogan diluciji u bujonu, ali se umjesto epruveta ili jažica s bujonom za izvođenje testa koristi niz krutih podloga (Mueller-Hinton agar), u koji je dodana određena koncentracija antimikrobnog sredstva. Nakon nasijavanja ispitivanog soja i inkubacije kroz 18-24 sata pri 35-37°C, očitava se porast kolonija na agaru, a koncentracija antimikrobnog sredstva u prvom agaru u nizu na kojem je inhibiran porast bakerijskih kolonija je MIK.

Gradijent-test (Epsilometer test)

Gradijent-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 Mueller-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 µg/ml ili mg/l (Slika 3.).



Slika 3. Interpretacija gradijent-testa. MIK iznosi 0,75 µg/ml.

Dodatni testovi pri određivanju antimikrobne osjetljivosti bakterija

Dokazivanje lučenja ESBL

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

Test cefinaze

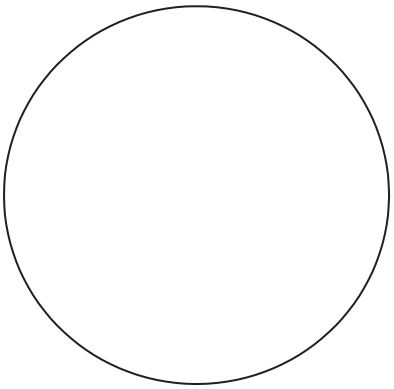
Disk cefinaze koristi se za brzu detekciju beta-laktamaza koje luče neke bakterije, npr., *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, te neke anaerobne bakterije. Disk cefinaze je impregniran kromogenim cefalosporinom, nitrocefinom, koji vrlo brzo mijenja boju od osnovne žute u crvenu nakon što beta-laktamaza ispitivanog bakterijskog soja koji se nanese na disk, 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.

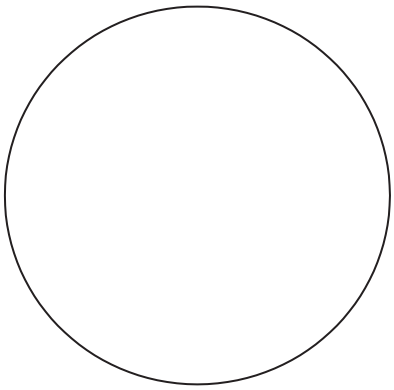
PRAKTIČNI RAD

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

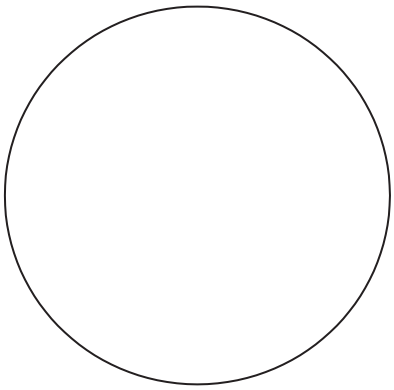
Meticilin osjetljivi *Staphylococcus aureus* (MSSA)		
Antibiotik	Zona (mm)	Interpretacija (S, I, R)



Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA)		
Antibiotik	Zona (mm)	Interpretacija (S, I, R)



Streptococcus pneumoniae		
Antibiotik	Zona (mm)	Interpretacija (S, I, R)



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

MIK:_____ µg/ml

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. _____ je standardizirana podloga za izradu antibiograma.
2. Koja je najčešća metoda testiranja antimikrobne osjetljivosti bakterija? _____
   _____
3. Metoda koja predstavlja kombinaciju dilucijske i difuzijske metode je:
   a) disk dilucija
   b) Kirby-Bauer metoda
   c) dilucija u bujonu
   d) gradijent-test
   e) dilucija u agaru

4. Prilikom očitavanja antibiograma mjeri se polumjer zone inhibicije i izražava u milimetrima.

   Točno Netočno

5. Fenomen ESBL-a se može dokazati u svih bakterija.

   Točno Netočno

Datum: Potpis nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

Bilješke:

VJEŽBA B3

Anita Novak

Makroskopska i biokemijska identifikacija te serotipizacija enterobakterija.

Widalova reakcija aglutinacije. Značajke rodova *Bordetella* i *Brucella.*

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti 15. i 18. poglavlja udžbenika Tonkić M, Dobec M, Abram M. Medicinska mikrobiologija, 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.

UVOD

Porodica ***Enterobacteriaceae* (*Enterobacteriales*)** obuhvaća heterogenu skupinu gram-negativnih bacila koji su, većinom, dio mikrobiote probavnog sustava ljudi i životinja.

Enterobakterije su aerobi ili fakultativni anaerobi, fermentiraju glukozu i neke druge šećere te posjeduju mnogobrojne čimbenike virulencije. Mogu uzrokovati različite infekcije, od lokaliziranih (npr. infekcije probavnog i mokraćnog sustava) do teških diseminiranih infekcija (sepsa).

U dijagnostici infekcija koje uzrokuju se najčešće koriste klasične metode **direktne** mikrobiološke dijagnostike, mikroskopiranje **svjetlosnim mikroskopom** i **kultivacija**, a mogu se koristiti i novije metode, kao što su **PCR** i **MALDI** -TOF MS.

Ukoliko želimo prikazati bakterijsku kapsulu, radimo tzv. **tuš preparat**, odnosno bojenje po Gramu kombiniramo s tušem.

Enterobakterije mogu porasti na različitim **neselektivnim** (npr. KA) te **selektivnim i diferencijalnim podlogama** (npr. SS agar, CLED agar, Selenit F bujon, MacConkey agar). Porasle kolonije možemo **identificirati** kombinacijom nekoliko metoda; opisom njihove **morfologije** na hranjivim podlogama, očitavanjem rezultata biokemijskih testova (makrometodom u epruvetama, tzv. **biokemijskom serijom** (BKS) ili poluautomatskim i automatskim sustavima kao što su Vitek®, BD Phoenix™ i sl.) i na kraju **serotipizacijom** (aglutinacijom sa specifičnim serumima).

Serotipizacijom određujemo postojanje specifičnih somatskih ili O antigena u bakterijskom staničnom zidu te, ukoliko je bakterija pokretna, postojanje flagelarnih ili H antigena. Inkapsulirane bakterije posjeduju i treću vrstu antigena, tzv. kapsularne ili K antigene (*Salmonella* Typhi ima tzv. antigen virulencije ili Vi antigen).

Uz direktne metode, u dijagnostici trbušnog tifusa, može se koristiti **indirektna** mikrobiološka dijagnostika i to **specifična** reakcija **aglutinacije po Widalu**.

Serumski aglutinini naglo rastu tijekom drugog i trećeg tjedna infekcije uzrokovane bakterijom *Salmonella* Typhi. Serijska razrjeđenja dva uzorka seruma uzeta istom bolesniku u razmaku 7-10 dana se testiraju korištenjem antigena *S.* Typhi te se utvrđuje postoji li dijagnostički značajan porast / pad titra protutijela.

Reakcija aglutinacije se koristi i u dijagnostici bruceloze (**Wright** aglutinacija) te rikecioze (**Weil-Felix** aglutinacija).

***Bordetella* spp.** su sitni gram-negativni kokobacili. Za ljude je najznačajnija *B. pertussis* koja se može kultivirati na posebnim hranilištima, Bordet-Gengou i Regan Lowe.

***Brucella* spp.** su gram-negativni kokobacili, obligatno unutarstanične bakterije ljudi i životinja. Mogu se kultivirati na obogaćenim hranilištima, kao što su triptikaza-soja agar, moždano-srčani bujon (engl. *brain heart infusion*, BHI) i čokoladni agar (ČA).

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1.

Izrada i mikroskopiranje preparata čistih kultura *E. coli* i *P. mirabilis* s KA (složeno bojenje po Gramu) – studenti rade 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 kulture *E. coli,* a drugi 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 (1000 x) mikroskopa, imerzionim objektivom (100 x) te nacrtati viđeno (svaki student treba pogledati, nacrtati i opisati 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 (1000 x) mikroskopa, imerzionim objektivom (100 x) te nacrtati viđeno.

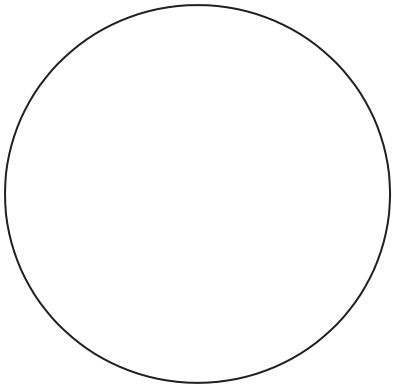
Klebsiella sp. – tuš preparat

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 H_2S od onih koje ga ne stvaraju.

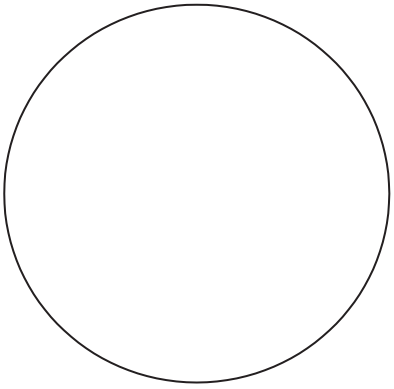
SS – *E. coli*



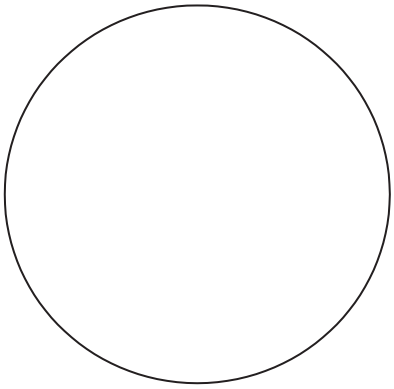
SS – *Salmonella* sp.

KOLONIJE	*E. coli*	*Salmonella sp.*
VELIČINA		
OBLIK		
RUB		
POVRŠINA		
L, H_2S		

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

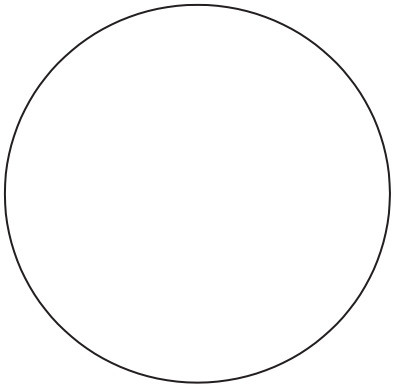


CLED – *E. coli*



CLED – *K. pneumoniae*

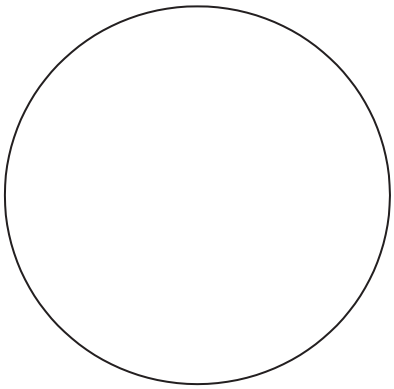
KOLONIJE	*E. coli*	*K. pneumoniae*
VELIČINA		
OBLIK		
RUB		
POVRŠINA		
L		



CLED – *Proteus* sp.

KOLONIJE	*Proteus* sp.
VELIČINA	
OBLIK	
RUB	
POVRŠINA	
L	

3.3. KA - Proteus sp. - puzanje



KA - *Proteus* sp.

KOLONIJE	*Proteus* sp.
VELIČINA	
OBLIK	
RUB	
POVRŠINA	
HEMOLIZA	

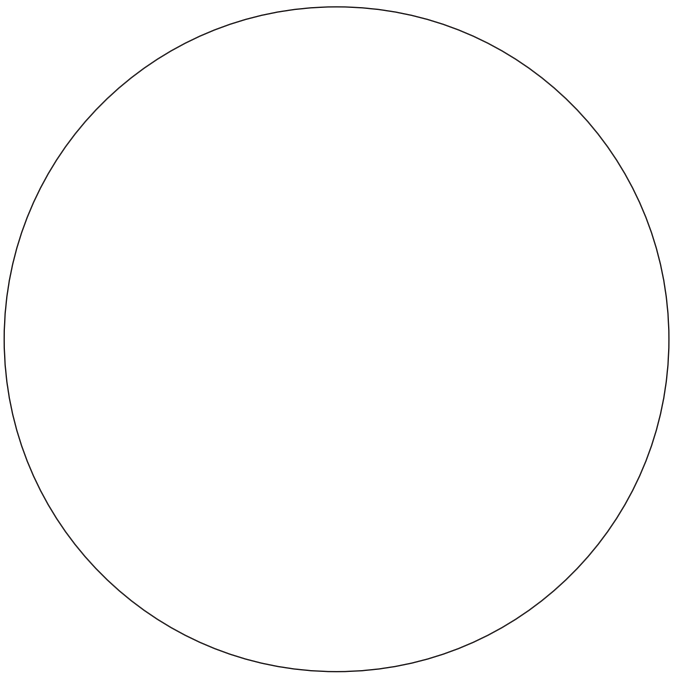
Zadatak 4.

Potrebno je očitati i ispisati zone inhibicije rasta za svaki navedeni antibiotik (u mm) te rezultate interpretirati prema EUCAST standardu (studenti rade u paru).

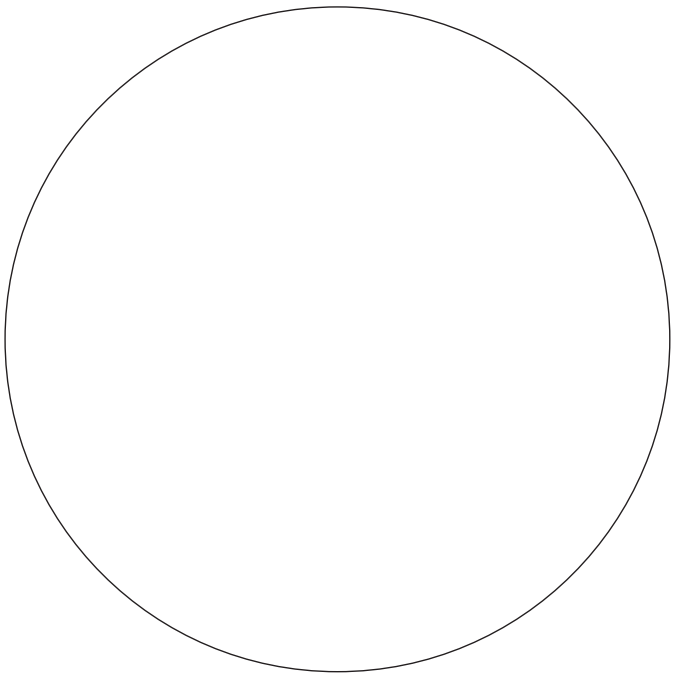
Antibiogrami za gram negativne bakterije su izrađeni na MH-agaru (Mueller-Hinton), metodom disk difuzije.

Potrebno je odrediti antimikrobnu osjetljivost dva različita soja *E. coli*, jednog koji je dobro osjetljiv na većinu testiranih antibiotika (ESBL -) i drugog, koji stvara beta laktamaze proširenog spektra (ESBL+ soj); pogledati str. 36 - Dokazivanje lučenja ESBL.

Cilj: uočiti razliku u antibiogramima dobro osjetljivog soja *E. coli* od multirezistentnog, bolničkog soja koji stvara ESBL (β-laktamazu proširenog spektra). Prepoznati proširenu zonu inhibicije rasta između diska amoksicilina s klavulanskom kiselinom i diskova cefalosporina.



E. coli – osjetljivi soj

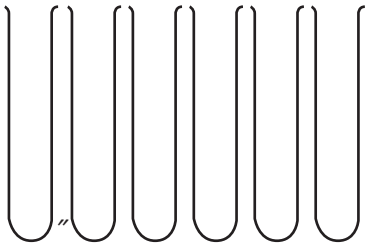


E. coli – ESBL +

E. coli			*E. coli* ESBL+	
Antibiotik	(mm)	interpretacija	(mm)	interpretacija

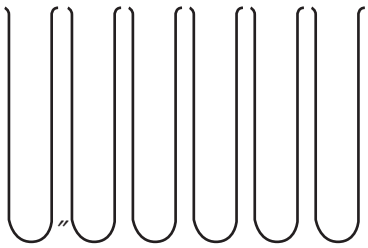
Zadatak 5.

Očitati serološku reakciju aglutinacije u epruveti (Widal) – studenti rade u paru.



Početno razrjeđenje:

Titar prvog seruma:



Početno razrjeđenje:

Titar drugog seruma:

Interpretacija serološke reakcije:

Zadatak 6.

Opisati kolonije *Bordetella* i *Brucella* porasle na selektivnim podlogama.

KOLONIJE	*Bordetella*	*Brucella*
VELIČINA		
OBLIK		
RUB		
POVRŠINA		
PODLOGA	Bordet-Gengou agar	Triptikaza soja agar

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Zašto se uzorci stolice i urina nasijavaju na selektivne podloge?
2. Kako se identificiraju enterobakterije?
3. Zašto *K. pneumoniae* stvara izrazito sluzave kolonije na podlogama?
4. Što znači kratica ESBL i kako na temelju antibiograma možemo utvrditi lučenje ESBL?
5. Koje antibiotike koristimo u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama koje luče ESBL?
6. Navedite najznačajnije karakteristike bordetela.
7. Opišite laboratorijsku dijagnostiku bruceloze.

Datum: Potpis nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

VJEŽBA B4

Merica Carev

Kultivacija i identifikacija rodova *Pseudomonas, Campylobacter, Vibrio, Helicobacter, Neisseria, Haemophilus*. Uzimanje i transport uzoraka za izolaciju anaerobnih bakterija. Principi anaerobne kultivacije.

Za pripremu vježbe potrebno je proučiti 16.,17., 20. i 21. poglavlje udžbenika Tonkić M, Dobec M, Abram M. Medicinska mikrobiologija, 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.

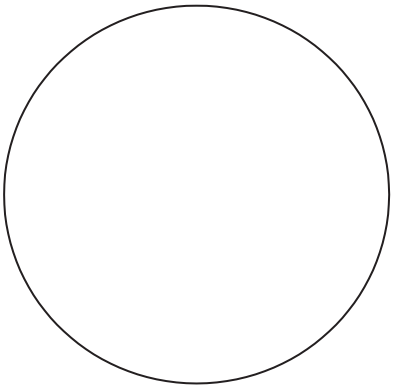
Rod *Pseudomonas*

Bakterije roda *Pseudomonas* su aerobni, pokretni gram-negativni štapići koji imaju enzime citokrom-oksidazu i katalazu te stvaraju pigmente. Test dokazivanja oksidaze je važan za razlikovanje pseudomonasa od enterobakterija koje ne posjeduju ovaj enzim. Pseudomonasi su ubikvitarno prisutni u okolišu, ali često i na vlažnim bolničkim površinama s izrazitom sposobnošću stvaranja biofilma koji im omogućuje preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i veliku otpornost. *Pseudomonas aeruginosa* uzrokuje teške infekcije u bolesnika s oslabljenom imunošću i jedan je od najvažnijih uzročnika infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1.

Cilj: opisati kolonije *P. aeruginosa* na hranjivom agaru (HA).



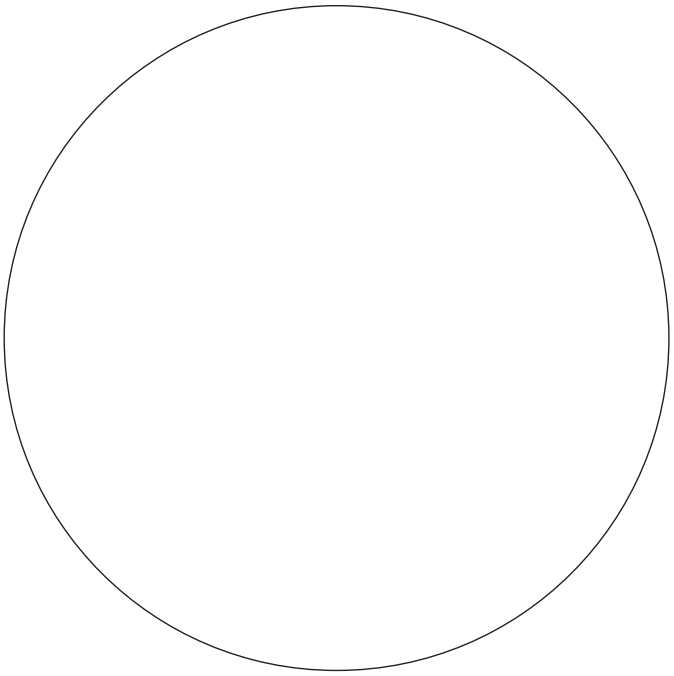
KOLONIJE	*P. aeruginosa*
VELIČINA	
OBLIK	
RUB	
POVRŠINA	
PIGMENT	

HA – *Pseudomonas aeruginosa*

Zadatak 2.

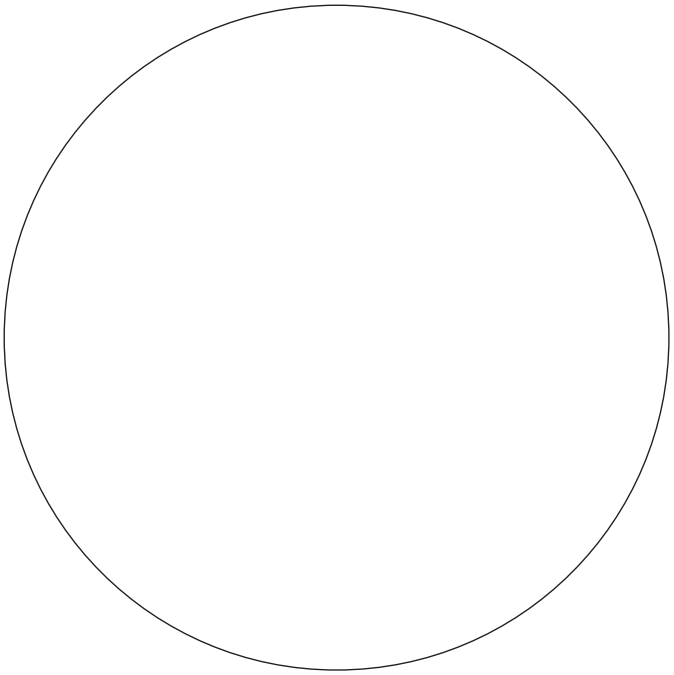
Cilj: uočiti razliku u antibiogramima dobro osjetljivog, divljeg soja *P. aeruginosa* od karbapenem-rezistentnog, bolničkog soja.

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



P. aeruginosa – osjetljiv na karbapeneme

P. aeruginosa – rezistentan na karbapeneme



	P. aeruginosa osjetljivi soj	*P. aeruginosa* osjetljivi soj	*P. aeruginosa,* karbapenem rezistentan	*P. aeruginosa,* karbapenem rezistentan
Antibiotik	(mm)	interpretacija	(mm)	interpretacija

Zadatak 3.

Nacrtati E-test za *P. aeruginosa* i očitati MIK (µg/ml).

Podloga: MH agar (Mueller-Hinton)

MIK = _____ µg/ml

Rodovi *Campylobacter, Helicobacter* i *Vibrio*

Bakterije koje pripadaju rodovima *Campylobacter, Helicobacter* i *Vibrio* su sitni, zavinuti, pokretni, gram-negativni štapići. Svi su oksidaza-pozitivni , zahtijevaju posebnije uvjete kultivacije, a uzrokuju infekcije probavnog sustava.

Campylobacter spp. je najčešći bakterijski uzročnik proljeva u razvijenim zemljama. Za kultivaciju kampilobaktera iz uzoraka stolice se upotrebljavaju selektivne hranjive podloge (Campylobacter Selective Agar, CSA ili Karmali agar) koje se inkubiraju u mikroaerofilnoj atmosferi pri 42°C tijekom 48 h. Nakon inkubacije se iz karakterističnih mliječno-sivih, razljevenih kolonija napravi mikroskopski preparat u kojem se uočavaju sitni gram-negativni štapići savijeni u obliku slova S ili galebovih krila.

Helicobacter pylori je zavinuti, gram-negativni štapić koji se može izolirati iz bioptata želučane sluznice. Povezuje se s gastritisom, peptičkim vrijedom, želučanim karcinomom i MALT B-staničnim limfomom. Može se dokazati i detekcijom antigena u stolici.

Vibrio spp. je gram-negativni štapić zavijen u obliku zareza. Rasprostranjen je u vodenom okolišu i organizmima, a najznačajniji predstavnik je *V. cholerae*, uzročnik kolere. Za kultivaciju stolice se koristi alkalna peptonska voda i TCBS (tiosulfat, citrat, žučne soli, saharoza) podloga na kojoj se, nakon inkubacije pri 37°C tijekom 24h, uočavaju glatke, saharoza-pozitivne (žute) kolonije.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 4.

Nacrtati mikroskopski izgled kulture kampilobaktera.

Opisati sliku:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 5.

Nacrtati izgled kulture kampilobaktera na CSA podlozi.

	Campylobacter
Veličina	
Oblik	
Rub	
Površina	

Zadatak 6.

Nacrtati izgled kulture *Vibrio cholerae* na TCBS podlozi.

	Vibrio cholerae
Veličina	
Oblik	
Rub	
Površina	
Saharoza	

Zadatak 7.

Očitati i nacrtati brzi test detekcije antigena *Helicobacter pylori* u stolici.

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Rod *Neisseria*

Bakterije roda *Neisseria* su gram-negativni diplokoki oblika zrna kave. Brojne vrste ovog roda su apatogene i dio su fiziološke mikrobiote gornjeg dišnog sustava. Patogene vrste su *N. meningitidis,* uzročnik meningitisa i sepse i *N. gonorrhoeae,* uzročnik gonoreje. Za uzgoj patogenih vrsta su potrebna obogaćena hranilišta (čokoladni agar) i prisutnost CO_2 te inkubacija pri 37°C tijekom 24 – 72 h. U identifikaciji najserija koristi se, uz karakterističnu mikromorfologiju, i test katalaze i oksidaze te testovi fermentacije šećera.

Test oksidaze: služi za dokaz enzima citokrom-oksidaze. Supstrat je tzv. oksidaza reagens koji se nakapa na filter papir. Na to se ezom doda bakterijska kultura koja se ispituje. Pozitivnu reakciju predstavlja pojava tamnoljubičaste do crne boje tijekom 5-10 sekundi.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 8.

Navedite neke apatogene vrste roda *Neisseria:*

_____

Navedite patogene vrste roda *Neisseria:*

_____

Testovi koji se koriste u identifikaciji najserija su:

_____

Zadatak 9.

Očitati test oksidaze s pripremljenom kulturom najserija.

Zadatak 10.

Napraviti test katalaze za najserije.

Test katalaze je

Zadatak 11.

Testovi razgradnje šećera (glukoza, maltoza, laktoza).

Očitajte test razgradnje šećera za pripremljenu bakterijsku kulturu najserija (+/-). 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 12.
Od pripremljene bakterijske kulture napraviti gram-preparat.

Mikroskopirati i nacrtati sliku. Osnovna mikromorfologija Neisseria sp. je:

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 13.

Mikroskopiranje pripremljenih preparata.

N. meningitidis – likvor – Gram preparat

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

N. gonorrhoeae - bris uretre – Gram preparat ili Metilensko modrilo

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Rod *Haemophilus*

Hemofilusi su pleomorfni, gram-negativni kokobacili s posebnim zahtjevima za rast i kultivaciju. Dijelom pripadaju mikrobioti sluznica u ljudi, ali mogu biti i uzročnici meningitisa, epiglotitisa i pneumonije, osobito u djece i imunokompromitiranih bolesnika. Da bi se osigurali posebni uvjeti kultivacije ovog mikroorganizma (hemin; X čimbenik i NAD; V čimbenik), respiratorni uzorci se nasijavaju na KA uz dodatak kulture *Staphylococcus aureus* (tzv. stafilokokna crta) ili na čokoladni agar te inkubiraju u atmosferi obogaćenoj s CO_2. U testiranju osjetljivosti hemofilusa na antibiotike izvodi se test cefinaze (nitrocefinski test). Testom se dokazuje prisutnost 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 14.

Od pripremljene bakterijske kulture napraviti gram-preparat.

Mikroskopirati i nacrtati sliku. Osnovna mikromorfologija hemofilusa je:

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 15.

Kultivacija hemofilusa na krvnom agaru zahtijeva dodatne čimbenike rasta. Navesti potrebne čimbenike za rast kulture hemofilusa.Prikazati fenomen satelitskog porasta na krvnom agaru.

	Haemophilus influenzae
Veličina	
Oblik	
Rub	
Površina	

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Anaerobne bakterije

Mikroorganizmi se razlikuju prema sposobnosti korištenja _____za stanično disanje. Za razliku od _____ mikroorganizama, koji koriste O_2 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.

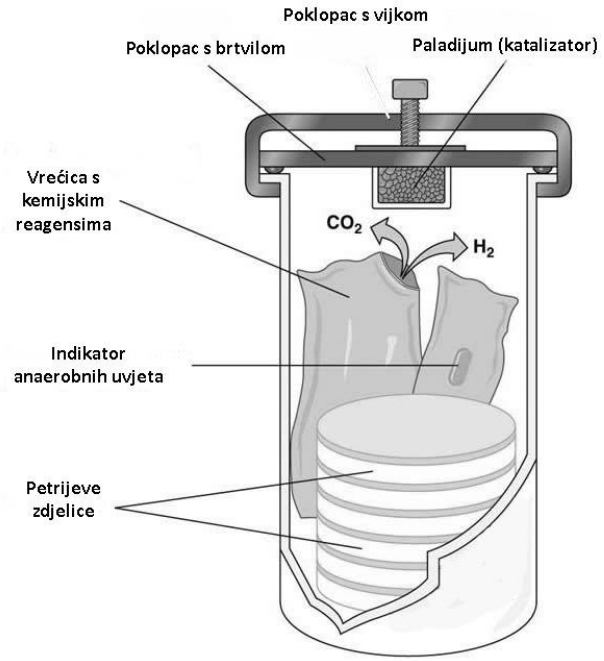
Pri uzimanju materijala za izolaciju anaerobnih uzročnika, treba voditi računa da se uzorak ne izlaže atmosferskom kisiku. Stoga bris rane ili bris izlazišta fistule nisu pogodni uzorci za izolaciju anaerobnih patogena. Prikladni uzorci za anaerobnu kultivaciju su aspirat, punktat ili bioptat s mjesta 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 pri 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 tioglikolatni bujon i 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 vakuum 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.**

Zadatak 16.

Mikroskopiranje pripremljenih preparata bojenih po Gramu, uočavanje razlike u bojenju i mikromorfologiji; očitavanje brzog testa defekcije antigena i toksigena.

a) *Clostridium* sp. (bez spora)

b) *GDH i TOXA, TOXB*

c) *Bacteroides* sp.

Zadatak 17.

a) *Clostridium* sp. (spore)

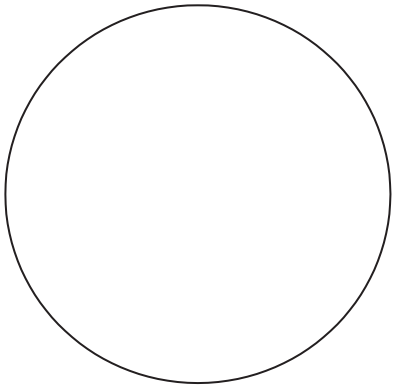
b) *Fusobacterium* sp.

c) *Actinomyces* sp.

Zadatak 18.

Opis kolonija i uočavanje makromorfoloških osobitosti kulture.

	Actinomyces
Veličina	
Oblik	
Rub	
Površina	
Hemoliza	



Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Kampilobakteri, pseudomonasi i najserije su u testu oksidaze _____ .
2. *Helicobacter pylori* se može izolirati iz _____ .
3. Podloge za kultivaciju *Vibrio* spp. su _____ .
4. Patogene najserije su uzročnici_____ .
5. Aspirat rane i uzorak tkiva _____ dobri uzorci za bakteriološku pretragu pri sumnji na infekciju uzrokovanu anaerobnim bakterijama.
6. Ako transport uzorka u laboratorij traje dulje od 15 minuta, uzorak je potrebno staviti u _____za anaerobe.
7. Striktni anaerobi _____ izlaganje manjim količinama kisika.
8. Anaerobni mikroorganizmi uglavnom rastu _____, pa je potrebno _____ h za njihovu inkubaciju.
9. Osjetljivost anaerobnih mikroorganizama na antimikrobne lijekove određuje se _____.

Datum: Potpis nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

VJEŽBA B5

Ivana Goić Barišić, Vanja Kaliterna

***B. anthracis* - prikaz spora i kapsule, *B. subtilis* - nasijavanje spora. *Corynebacterium* – uzgoj, bojenje i mikroskopija. *Listeria* – kultura, mikroskopija. Bojenje po Ziehl-Neelsenu. Uzimanje, slanje i obrada uzoraka za izolaciju mikobakterija. Uzgoj mikobakterija. Test rezistencije na tuberkulostatike. *Legionella* – dijagnostički postupci. Serološki testovi za *T. pallidum*. *Mycoplasma, Ureaplasma* – kultura, *Chlamydia* – dijagnostika.**

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti 11.,12., 22., 23., 24., 25. i 27. poglavlje udžbenika Tonkić M, Dobec M, Abram M. Medicinska mikrobiologija, 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.

Rod *Bacillus*

Bakterije roda *Bacillus s*u gram - pozitivni štapići koji formiraju duge lance. Imaju sporu smještenu u sredini stanice. Prisutni su u zraku, vodi i tlu. Ne izazivaju infekcije, osim *B. cereus* koji izaziva trovanje hranom i *B. anthracis* koji izaziva bolest antraks.

Antraks je u prvom redu bolest životinja. Čovjek se zarazi slučajno u kontaktu s inficiranim životinjama i njihovim produktima ili sporama (vunom i prašinom). Bolest se može očitovati kao kožni, plućni ili crijevni oblik antraksa.

Spore bakterija iz roda *Bacillus* (*B. subtilis*) koriste se kao biološka kontrola postupaka sterilizacije.

PRAKTIČNI RAD:

Zadatak 1.

Napraviti gram preparat porasle kulture - antrakoidi s KA

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 2.

Opis kolonija: KA – antrakoidi

	Antrakoidi
Veličina	
Oblik	
Rub	
Površina	
Hemoliza	
Pigment	

Zadatak 3.

Mikroskopiranje pripremljenih preparata:

a) *B. anthracis* – metilensko modrilo - prikaz kapsule u krvi miša

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

b) *B. anthracis* – gram - prikaz spora

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Rod *Corynebacterium*

Korinebakterije su gram-pozitivni štapići, zadebljani na krajevima, nejednoliko se bojaju zbog toga što sadržavaju tzv. metakromatska zrnca. Najveći broj vrsta iz ovog roda ne uzrokuje bolesti i dio su fiziološke flore čovjeka. *Corynebacterium diphteriae* u čovjeka uzrokuje bolest difteriju. Korinebakterije koje ne uzrokuju difteriju nazivaju se difteroidi.

PRAKTIČNI RAD:

Zadatak 4.

Opisati kulturu korinebakterija na KA.

	Corynebacterium sp.
Veličina	
Oblik	
Rub	
Površina	
Hemoliza	
Pigment	

Zadatak 5.

Napraviti gram preparat porasle kulture - difteroidi s KA.

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 6.

Opisati preparat *Corynebacterium diphteriae* obojan po Albertu.

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 7.

Kako se ispituje toksigenost izolata korinebakterija?

_____

_____

_____

_____

_____

Rod *Listeria*

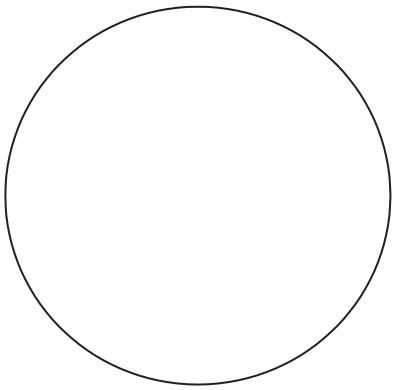
U rodu *Listeria* su gram - pozitivni nesporogeni kratki bacili zaobljenih krajeva. Pokretni su pri temperaturi od 22 - 27 °C. Najvažnija vrsta je *Listeria monocytogenes*. Prenosi se kontaminiranom hranom (mliječni proizvodi, povrće). U rizične skupine za razvoj listerioze spadaju trudnice i novorođenčad (perinatalna listerioza, neonatalna sepsa i meningitis novorođenčadi) te imunokompromitirani bolesnici (bakterijemija i meningitis).

PRAKTIČNI RAD:

Zadatak 8.

Opis kolonija: KA - *Listeria monocytogenes.*

	Listeria monocytogenes.
Veličina	
Oblik	
Rub	
Površina	
Hemoliza	
Pigment	



Mikobakterije

Mikobakterije su aerobni, nesporogeni bacili. Zbog posebnog sastava stanične stijenke nije ih moguće prikazati običnim tehnikama bojenja u mikrobiologiji (npr. bojenje po Gramu ili metilenskim modrilom), već za prikaz mikobakterija koristimo posebne složene metode poput Ziehl-Neelsen (Z-N) bojenja ili bojenja fluorokromnim bojama (auramin). U Z-N bojenju se koristi bazična crvena boja karbol-fuksin, a zbog visokog sadržaja lipida u sastavu staničnog zida, mikobakterije zadržavaju crvenu boju i nakon odbojavanja kiselim alkoholom. Zbog toga se opisuju kao acidoalkoholno rezistentne (acidorezistentne) bakterije. U pravilu rastu sporo, vrijeme replikacije (generacijsko vrijeme) im je od 14-22 sata pa se opisuju kao spororastuće bakterije. *Mycobacterium tuberculosis* uzrokuje tuberkulozu i važan je patogen ljudi. *Mycobacterium leprae* uzrokuje lepru (gubu). *Mycobacterium avium-intracellulare* (*M. avium* kompleks ili MAC) najčešći je predstavnik netuberkuloznih (NTM) mikobakterija. Oportunistički je patogen imunokompromitiranih osoba i često uzokuje infekcije u bolesnika koji boluju od AIDS-a.

Mikobakterije u pravilu uzrokuju respiratorne infekcije (tuberkuloza pluća) te se dijagnostika tuberkuloze radi pretragom respiratornih uzoraka, iskašljaja (sputuma) ili respiratornih aspirata i lavata. Za postavljanje dijagnoze potrebno je takve uzorke obraditi u biozaštitnom kabinetu i nasijati na posebnu krutu podlogu (Löwenstein-Jensen) i tekuću komercijalnu podlogu (MGIT) u kojoj mikobakterije porastu brže nego na krutoj podlozi. Iz respiratornih uzoraka radi se mikroskopski preparat koji se boja po Ziehl-Neelsenu i mikroskopira pod imerzijom za dokaz prisustva acidorezistentnih bacila. U tekućoj podlozi za uzgoj mikobakterija virulentni sojevi stvaraju isprepletene oblike nalik užetu (engl. *serpentine cord*) i lako se uočavaju u mikroskopskom preparatu po Z-N.

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.

1. na razmaz nanijeti karbol fuksin i zagrijavati da boja polagano isparava kroz 5 minuta
2. isprati vodovodnom vodom
3. preparat isprati u 3% HCl ili 3% H_2SO_4 pomiješanoj s 95% alkoholom
4. isprati vodovodnom vodom
5. nanijeti metilensko modrilo i ostaviti 5 minuta
6. isprati vodovodnom vodom
7. osušiti i mikroskopirati pod imerzijom

Testiranje osjetljivosti na antituberkulotike

Test osjetljivosti na antituberkulotike određuje osjetljivost/rezistenciju na najčešće korištene lijekove u liječenju tuberkuloze (rifampicin, izoniazid, etambutol i pirazinamid). Testiranje osjetljivosti *M. tuberculosis* na antituberkulotike izvodi se **metodom proporcije po Canettiju** i molekularnim metodama (dokaz gena rezistencije). Metoda proporcije po Canettiju još uvijek je standardna metoda testiranja osjetljivosti *M. tuberculosis* na najčešće korištene antituberkulotike. Test rezistencije se očitava nakon četiri tjedna inkubacije na krutoj L-J podlozi u koju je dodana točno određene koncentracija antituberkulotika. Ukoliko je prisutan rast mikobakterija na podlozi s lijekom veći od 1% u odnosu na kontrolnu podlogu bez antituberkulotika, izolat je rezistentan na testirani lijek.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 8.

Navesti sastav stanične stijenke mikobakterija i naglasiti razliku u odnosu na ostale bakterije.

_____

_____

_____

_____

_____

Zadatak 9.

Mikroskopirati i nacrtati preparat iskašljaja bojenog po Ziehl-Neelsenu. Treba uočiti acidorezistentne bakterije.

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 10.

Mikroskopirati i nacrtati preparat iz tekuće podloge (MGIT) obojen po Ziehl-Neelsenu. Treba uočiti specifične nakupine ("uže").

Opis slike:

_____

_____

_____

_____

Zadatak 11.

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

Opis slike:

_____

_____

_____

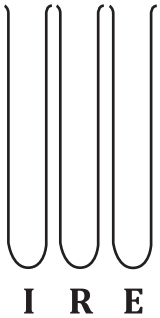
_____

_____

Zadatak 12.

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 i etambutol.

Opis slike:



Rod *Legionella*

Gram - negativni bacili, ubikvitarni u toplom, vlažnom okolišu. Imunokompromitirane osobe se zaraze nakon inhalacije bakterija aerosolom iz kontaminiranih tuševa, klimatizacijskih uređaja i sličnih izvora, te potom razviju plućnu infiltraciju.

Zadatak 13.

Opisati test detekcije antigena legionele u urinu.

Rod *Treponema*

Treponeme su vitke, spiralne bakterije, vrlo pokretne, rotiraju se uzduž svoje osi. Isključivo su patogeni ljudi. Najvažnija vrsta je *Treponema pallidum*. Prenosi se spolnim putem i konatalno. Izaziva stečeni (primarni, sekundarni, tercijarni) i konatalni sifilis.

Dijagnostika se radi korištenjem seroloških testova:

a) netreponemski testovi – probirni nespecifični (netreponemski)testovi za sifilis, reakcija flokulacije nakon miješanja seruma pacijenta s antigenom kardiolipinom (VDRL, *Venereal Disease Research Laboratory*; RPR, *Rapid Plasma Reagin*) i slabo su osjetljivi u ranoj i kasnoj fazi bolesti; postaju negativni nakon terapije.

b) treponemski test - Primjenjuje se za potvrdu pozitivnih netreponemskih testova. Reakcija hemaglutinacije nakon miješanja seruma pacijenta s treponema antigenom koji je adsorbiran na površinu eritrocita (TPHA, *Treponema Pallidum Hemagglutination*). Ostaju pozitivni doživotno nakon prebljenja.

Rod *Mycoplasma*, rod *Ureaplasma*

Mikoplazme su najmanje slobodnoživuće bakterije. Nemaju staničnu stijenku te se ne boje po Gramu. Vrste koje uzrokuju bolesti čovjeka su *Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*.

Uzrokuju bolesti respiratornog i urogenitalnog sustava. Dokazuju se molekularnim metodama (*M. genitalium*), serološkim metodama (*M. pneumoniae*) ili komercijalnim testovima (*M. hominis* i *U. urealyticum*).

Zadatak 14.

Očitavanje komercijalnog testa za *M. hominis* i *U. urealyticum*.

Klamidije

Klamidije su nepokretne gram - negativne bakterije, obvezatni intracelularni patogeni. Najvažnija vrsta je *Chlamydia trachomatis*. Uzrokuje bolesti spolnog sustava i inkluzijski konjunktivitis. Dijagnostika se radi testovima amplifikacije nukleinskih kiselina (NAATs, *nucleic acid amplification tests*).

_____

_____

_____

_____

_____

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Koje vrste spora se koriste tijekom biološke kontrole postupka sterilizacije?
2. Koje su mikrobiološke značajke uzročnika difterije?
3. Za koje je skupine ljudi *Listeria* važna kao uzročnik bolesti?
4. Opiši izgled bacila *M. tuberculosis* nakon bojenja po Ziehl-Neelsenu.
5. Navedi antituberkulotike koji se testiraju i koriste u liječenju infekcije uzrokovane *M. tuberculosis.*
6. Koliko traje kultivacija uzročnika tuberkuloze?
7. Navedi podloge koje se koriste za izolaciju uzročnika tuberkuloze.
8. Kako se prenosi legionela?
9. Koji je potvrdni test za dokaz bakterije *Treponema pallidum*?
10. Zbog čega se urogenitalne mikoplazme ne mogu bojiti po Gramu?
11. Koji test je „zlatni standard“ za dokaz klamidijske infekcije?

Datum: Potpis nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

VJEŽBA M

Anita Novak

Kvasci i plijesni – makro i mikromorfologija. Principi kultivacije i identifikacije medinski značajnih kvasaca i plijesni. Dijagnostika dermatomikoza.

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti 45. poglavlje iz udžbenika Tonkić M, Dobec M, Abram M. Medicinska mikrobiologija, 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.

UVOD

Gljive su, za razliku od bakterija, **eukariotski** organizmi. Obligatni su ili fakultativni aerobi. Općenito, gljive po obliku dijelimo u dvije osnovne skupine – **kvasce** (jednostanične gljive) i **plijesni** (višestanične gljive).

Infekcije uzrokovane gljivama nazivaju se **mikoze.**

Prirodno stanište većine patogenih gljiva su voda i zemlja pa se u tim slučajevima radi o **egzogenim** infekcijama ljudi (npr. kriptokokoza, aspergiloza i dermatofitoza). Ipak, najčešće gljivične infekcije ljudi su **endogenog** porijekla, tj. uzrokuju ih gljive koje su dio mikrobiote različitih organskih sustava ljudi (npr. kvasci roda *Candida*). Smatraju se **oportunističkim** patogenima jer uzrokuju infekcije u rizičnim skupinama ljudi (imunokompromitirani, oboljeli od kroničnih i malignih bolesti, osobe koje primaju antibiotike, kemoterapiju ili imunosupresivnu terapiju).

Endemske mikoze uzrokuju dimorfne gljive, koje su primarni patogeni, a vezane su za određena geografska područja.

Dermatofitoze su kožne mikoze koje uzrokuju gljive (plijesni) koje mogu inficirati isključivo keratinizirana tkiva (kožu, dlake i nokte). Ove gljive su podijeljene u tri roda, ***Microsporum, Trichophyton*** i ***Epidermophyton***. Razlikuju se prema prirodnom staništu (zoofilne, antropofilne i geofilne vrste) te prema izgledu poraslih kolonija na selektivnim hranilištima (makromorfologija) i mikroskopskoj morfologiji.

Većina gljiva koje uzrokuju infekcije u ljudi ne zahtijevaju posebne uvjete kultivacije. Iako mogu porasti i na hranilištima za kultivaciju bakterija (npr. KA), najčešće koristimo selektivna hranilišta za izolaciju gljiva (kruta i tekuća), kako bismo ubrzali vrijeme izolacije i identifikacije. Najčešće korištene hranjive podloge su **Sabouraud agar (SA)** i **Sabouraud bujon** (s ili bez dodatka inhibitora za porast saprofitnih plijesni).

Sve vrste kandida rastu vrlo slično na SA i ne možemo ih međusobno razlikovati. Za identifikaciju vrsta kandida, potrebno je napraviti test klijanja (germinacije), testove asimilacije i fermentacije šećera, supkultivaciju na hranilištu koje nije bogato nutrijentima (npr. kukuruzni agar) ili koristiti novije identifikacijske metode, kao što je MALDI-TOF MS.

Plijesni (uključujući dermatofite) stvaraju karakteristične kolonije na Sabouraud agaru pa se njihova identifikacija temelji na opisu makro (izgled prednje i stražnje strane kolonije) i mikromorfologije (karakteristične strukture, npr. mikro i makro konidije u mikroskopskom preparatu) poraslih kolonija.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1.

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

Cilj: naučiti prepoznati germinativni tubul blastokonidije.

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

C. albicans – pozitivan test klijanja (germinacije)

Zadatak 2.

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

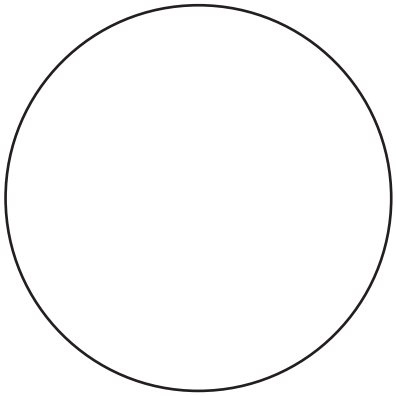
Cilj: uočiti razliku u morfologiji i veličini gram-pozitivnih koka i blastokonidija.

Postupak: mikroskopirati pripremljeni preparat pod velikim povećanjem (1000 x) mikroskopa, imerzionim objektivom (100 x) te nacrtati viđeno.

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

Zadatak 3.

Mikroskopiranje pripremljenog preparata tuš + Gram bojenje *Cryptococcus neoformans.*



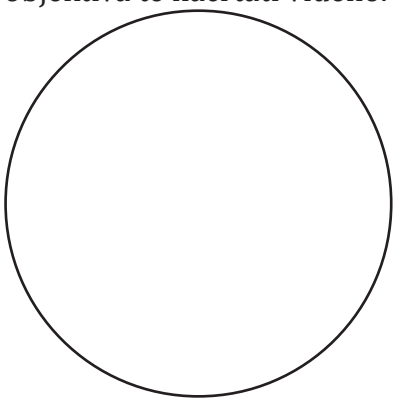
Cryptococcus neoformans

Zadatak 4.

Mikroskopiranje pripremljenih nativnih preparata s laktofenolom plijesni *Penicillium* sp. i *Aspergillus* sp.

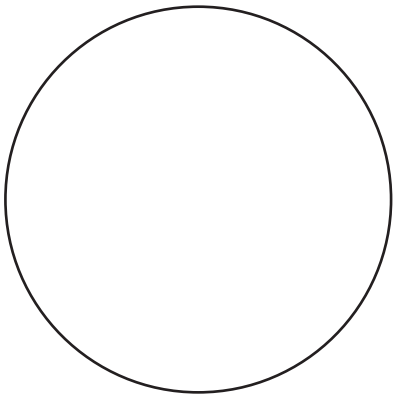
Cilj: naučiti prepoznati plodne strukture karakteristične za ove rodove plijesni.

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



Penicillium sp.

preparat



Aspergillus sp.

Zadatak 5.

Opisati i nacrtati porasle kolonije na Sabouraud agaru

kultura

Penicillium sp.

Aspergillus sp.

Zadatak 6.

Mikroskopiranje pripremljenog direktnog preparata iskašljaja, bojenog po Gramu, na demonstracijskom mikroskopu.

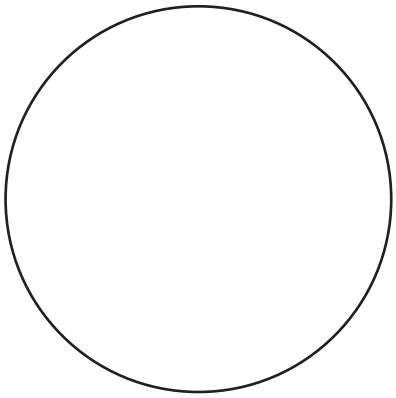
Cilj: prepoznati blastokonidije, pseudohife i hife kvasacu direktnom mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu.

Postupak: mikroskopirati i nacrtati viđeno.

C. albicans, iskašljaj, Gram preparat

Zadatak 7.

Opisati i nacrtati porasle kolonije *C. albicans* na KA.

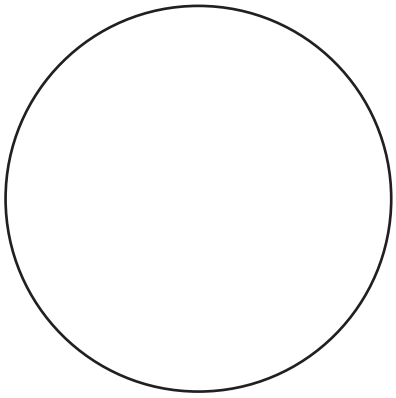


C. albicans

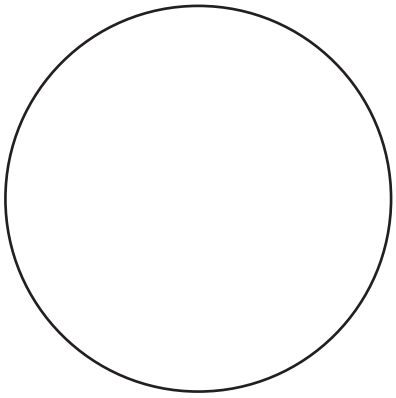
KOLONIJE	*C. albicans*
VELIČINA	
OBLIK	
RUB	
POVRŠINA	
PIGMENT	

Zadatak 8.

Opisati i nacrtati porasle kolonije *C. albicans* i *Cryptococcus neoformans* na Sabouraud agaru



C. albicans



Cryptococcus neoformans

KOLONIJE	*C. albicans*	*Cryptococcus neoformans*
VELIČINA		
OBLIK		
RUB		
POVRŠINA		
PIGMENT		

Zadatak 9.

Pogledati kolonije dermatofita na Sabouraud agaru s cikloheksimidom te *C. albicans* (zelene) i *C. parapsilosis* (roze) na kromogenoj podlozi.

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Opišite 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 nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

Bilješke:

VJEŽBA P1

Katarina Šiško Kraljević

Dijagnostika toksoplazmoze, lišmenioze i malarije. Krvni razmaz, gusta kap i bioptati obojeni po Giemsa-Romanowskom. Serološka dijagnostika. Medicinski značajni artropodi – morfologija.

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti 46. poglavlje udžbenika Tonkić M, Dobec M, Abram M. Medicinska mikrobiologija, 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.

UVOD

Životni ciklus, patogenost i epidemiologija krvno-tkivnih parazita: *Toxoplasma gondii, Plasmodium* spp. i *Leishmania* spp.

Bojenje po Giemsa-Romanowskom: radna otopina boje priprema se neposredno prije upotrebe, tako da se u epruvetu s 2 ml pH neutralne, destilirane vode dodaju 2 kapi tvorničke otopine boje i pusti da u njoj difundiraju. Epruvete se ne smiju treskati jer je boja nestabilna, lako se taloži i pri tome gubi svoja svojstva. Radna otopina se prelije preko pripremljenih preparata i ostavi da djeluje 20 – 25 minuta. Ispiranje, sušenje i mikroskopiranje je jednako kao i u drugim postupcima bojenja. U preparatima obojenim po Giemsa-Romanowskom citoplazma krvnih protozoa se oboji plavo, a kromatinska tvar (jezgre, kinetoplasti) tamnocrveno.

1. Dijagnostika toksoplazmoze

Zadatak 1.1.

Dopuniti rečenice i odgovoriti na pitanja.

Konačni domaćin sporozoe *Toxoplasma gondii* je_____, a _____ prelazni domaćin. U akutnoj fazi bolesti u tijelu cirkuliraju polumjesečaste stanice koje se brzo umnožavaju pa ih zovemo_____. U kasnijim stadijima bolesti u raznim se organima (npr. mozgu, oku, srcu) stvaraju ciste u kojima se toksoplazme sporo dijele. Taj oblik toksoplazme nazivamo_____.

Čovjek se zarazi _____

_____.

Kako se klinički očituje toksoplazmoza i o čemu to ovisi? _____

_____

Kojom metodom najčešće dijagnosticiramo toksoplazmozu? _____

_____

Nabrojite sve metode koje se mogu koristiti u dijagnostici toksoplazmoze: _____

_____

Zadatak 1.2

Nacrtati i opisati tahizoite toksoplazme iz ascitesa miša u preparatu obojenom po Giemsa-Romanowskom.

_____

_____

_____

_____

Zadatak 1.3.

Protumačiti ponuđene rezultate ELISA testa za toksoplazmozu.

IgM	IgG	Tumačenje nalaza
-	-	
+	-	
+	+	
-	+	

Zadatak 1.4.

Očitati i protumačiti rezultate ELISA testa za toksoplazmozu.

Pacijent	Nalaz	Tumačenje nalaza

2. Dijagnostika lišmenioze

Zadatak 2.1.

Dopuniti rečenice i odgovoriti na pitanja.

Obligatne unutarstanične parazite roda *Leishmania* prenose ženke hematofagnih insekata _____.

Na hrvatskom priobalju je endemski prisutna zoofilna vrsta *Leishmania* _____, koja može uzrokovati _____ i _____ lišmeniozu. Rezervoar bolesti su _____.

U mikroskopskim preparatima punktata ruba kožnih lezija ili bioptata koštane srži, slezene, jetre ili limfnih čvorova uočavaju se intracelularne okrugle forme bez biča koje nazivamo _____.

Lišmenije je moguće kultivirati na bogatim, dvofaznim (kruta + tekuća faza) hranjivim podlogama (_____). U tekućem dijelu podloge razvijaju se _____ oblici (s bičem).

Zadatak 2.2. Nacrtati i opisati lišmenije u preparatu koštane srži obojenom po Giemsa-Romanowskom. Uočiti intracelularni smještaj parazita, obratiti pažnju na jezgre i kinetoplaste.

_____

_____

_____

_____

Zadatak 2.3. Gotove, metanolom fiksirane razmaze tekućeg dijela podloge za uzgoj lišmenija obojiti po Giemsa-Romanowskom. Mikroskopirati, nacrtati i opisati.

_____

_____

_____

_____

3. Dijagnostika malarije

Zadatak 3.1.

Dopuniti rečenice i odgovoriti na pitanja.

Rod *Plasmodium* ima više od 150 vrsta koje mogu inficirati kralješnjake. Četiri su vrste koje uzrokuju malariju u ljudi: *Plasmodium*_____, *Plasmodium*_____, *Plasmodium*_____ i *Plasmodium*_____.

Konačni domaćin za plazmodije su _____.

Prva faza razvoja u čovjeku (egzoeritrocitna faza) odvija se u _____. Hipnozoiti, „spavači“ koji zaostanu u _____ osoba koje su inficirane s *P.* _____ ili *P.*_____ izvori su relapsa malarije.

Klinička faza malarije povezana je s umnožavanjem parazita u _____. Plazmodiji se tijekom te faze hrane hemoglobinom, rastu, transformiraju se i umnožavaju u ciklusima koji se ponavljaju svakih ____ h (*P.* _____, *P.* _____, *P.*_____) ili ____h (*P.*_____). Mikroskopski se mogu uočiti stadiji: _____, _____, nezrelog i zrelog _____. Dio merozoita se diferencira u muške i ženske_____.

Koja je metoda „zlatni standard“ u dijagnostici malarije?_____.

Navesti ostale postupke korisne u dijagnostici malarije:_____.

_____

Zadatak 3.2.

Ukratko opisati izradu krvnog razmaza i guste kapi.

_____

_____

_____

_____

_____

Zadatak 3.3.

Popuniti tablicu tekstom i crtežom. Uočiti karakteristične forme u preparatima namještenim na demonstracijskim mikroskopima.

	P. falciparum	*P. vivax*	*P. ovale*	*P. malariae*
Inficirani eritrocit				
Stadij prstena				
Stadij ameboida				
Zreli schizonti				
Gametociti				

Zadatak 3.4.

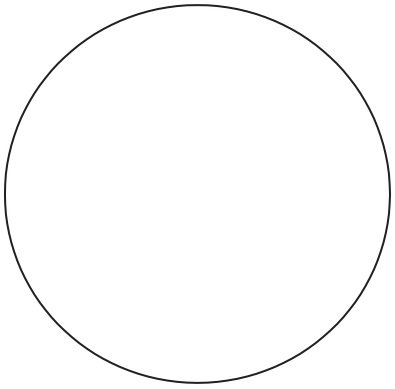
Mikroskopiranje krvnih razmaza. Nacrtati karakteristične oblike parazita i identificirati o kojoj se vrsti plazmodija radi.

_____

_____

_____

_____



4. Medicinski značajni artropodi

Zadatak 4.1.

Pomažući se lupom i mikroskopom proučiti neke medicinski značajne artropode.

- *Sarcoptes scabiei* - adult
- *Demodex folliculorum*
- *Pediculus humanus* var. *capitis* – jaje (gnjida) i adult (odrasla uš)
- *Pediculus humanus* var. *vestimenti* – adult (prtena uš)
- *Phthirius pubis* – adult (stidna uš)
- *Phlebotomus* sp.
- *Anopheles* sp.

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Što znači visok aviditet IgG protutijela na toksoplazmu?
2. Kako se dijagnosticira konatalna toksoplazmoza?
3. Koje metode koristimo za dijagnostiku kožne, a koje za dijagnostiku visceralne lišmenioze?
4. Koja je vrsta plazmodija najopasnija i zašto?
5. Ima li vektora za malariju u Hrvatskoj?

Datum: Potpis nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

Bilješke:

VJEŽBA P2

Katarina Šiško Kraljević

Dijagnostika crijevnih parazitoza. Mikroskopiranje nativnih, preparata s Lugolovom otopinom te koncentrata (MIFC). Mikromorfologija cista protozoa, jaja i ličinki helminata. Prepoznavanje adultnih oblika. Analni otisak po Grahamu. Dijagnostika ehinokokoze i trihineloze.

UVOD:

Za uspješno savladavanje vježbe potrebno je proučiti 46. poglavlje udžbenika Tonkić M, Dobec M, Abram M. Medicinska mikrobiologija, 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.

Potrebno predznanje:

Životni ciklus, patogenost i epidemiologija najčešćih jednostaničnih (*Trichomonas vaginalis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica, Cryptosporidium* spp.) i višestaničnih parazita (*Echinococcus granulosus*, *Trichinella spiralis*, *Enterobius vermicularis, Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Taenia* spp.).

PRAKTIČNI RAD

1. Dijagnostika crijevnih parazitoza

Zadatak 1.1.

Navesti koji se sve uzorci mogu koristiti za dijagnostiku parazitoza probavnoga sustava.

_____

_____

_____

_____

_____

Uzorak stolice

Uzorci stolice se prikupljaju u sterilne posudice s poklopcem na navoj koji dobro brtvi, a na kojeg je učvršćena žličica (slika gore). Optimalno je ispuniti 1/4 – 1/2 posudice uzorkom. Uzorci se ne smiju miješati s prašinom, vodom ili urinom. U vodi i na tlu se mogu naći slobodnoživući organizmi, a urin uništava trofozoite protozoa i može potaknuti oslobađanje ličinki iz jaja helminata. U uzorcima ne bi smjelo biti tragova barija, bizmuta ni lijekova koji sadrže mineralna ulja, antibiotike ili antimalarike. Ako je pacijent bio na pretragama ili uzimao neke od navedenih lijekova, parazitološke pretrage treba odgoditi desetak dana (14 dana nakon liječenja tetraciklinima). Zbog periodičkog izlučivanja parazita pretrage treba ponavljati. Optimalno je dostaviti tri uzorka stolice u razmacima od dva do tri dana. Uzorci se, ovisno o konzistenciji, transportiraju pri sobnoj temperaturi ili pri 4 °C (tekuće uzorke treba hitno dostaviti pri sobnoj temperaturi ili staviti u neki fiksativ prema uputama laboratorija, polukrute treba dostaviti unutar 2 h, a uzorci formirane stolice mogu se pohraniti u hladnjaku jedan dan).

Zadatak 1.2.

Navesti koje postupke koristimo u parazitološkoj pretrazi uzoraka iz probavnog sustava.

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

Prvi korak u pregledu stolice je utvrđivanje njezinog oblika i konzistencije te eventualne prisutnosti patoloških primjesa kao što su krv, sluz i adultni oblici crijevnih crva i proglotida trakavica.

Zadatak 1.3.

Proučiti i ukratko opisati adultne oblike crijevnih crva. Navesti mjesto parazitiranja i infektivni oblik za čovjeka.

Organizam	Opis	Mjesto parazitiranja	Infektivni oblik
1.			
2.			
3.			

Mikroskopski pregled stolice je temeljna pretraga u dijagnostici crijevnih parazitoza. Mikroskopski se mogu pregledavati nativni preparati, preparati s Lugolovom otopinom i preparati dobiveni nekom od metoda nagomilavanja i koncentracije kao što je MIFC (M = mertiolat, I = jod, F = formalin, C = centrifugiranje), FEAS (F = formalin, E = etil , A = acetat, S = sedimentacija) ili flotacija s pomoću 33% otopine cinkova sulfata. Za detaljnije proučavanje i razlikovanje cista i trofozoita crijevnih protozoa mikroskopiraju se preparati obojeni tri-krom metodom ili željeznim hematoksilinom, a za oociste kriptosporidija razmazi stolice se oboje modifikacijom postupka po Ziehl-Neelsenu.

Zadatak 1.4.

Nacrtati dijagnostičke oblike crijevnih parazita u mikroskopskim preparatima. Navesti za identifikaciju ključne morfološke karakteristike.

Ascaris lumbricoides – jaje (MIFC)

Trichuris trichiura – jaje (MIFC)

Taenia spp. – jaje (MIFC)

Giardia duodenalis – ciste (MIFC)

Entamoeba histolytica/dispar, Entamoeba coli – ciste (MIFC)

Cryptosporidium spp. – oociste (Ziehl-Neelsen)

Za ograničeni broj najčešćih crijevnih parazita dostupni su i testovi za detekciju antigena: enzimski imunotestovi (EIA) za razlikovanje *Entamoeba histolytica* od apatogenih ameba, imunokromatografski testovi (ICT) za detekciju antigena *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* i *Entamoeba histolytica/dispar*, izravni imunofluorescentni testovi za detekciju antigena *Cryptosporidium* spp. i *Giardia duodenalis.*

Molekularni postupci osim u istraživačke svrhe koriste se i za rutinsku dijagnostiku nekih parazitoza. Dostupni su *real-time* PCR testovi za detekciju *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis, Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* i *Blastocystis* spp.

Zadatak 1.5.
Navesti prednosti i mane EIA, ICT i PCR-a u odnosu na mikroskopski pregled stolice.

_____

_____

Zadatak 1.6.
Dopuniti rečenice

Perianalni otisak (PAO) je optimalan uzorak za dijagnostiku _____, jer se jajašca _____ u stolici nalaze samo iznimno (5% zaraženih). Uzorak je najbolje uzeti _____. Pacijent se prethodno ne smije prati (48 h). Potrebno je pripremiti: predmetno stakalce, 5-7 cm prozirne ljepljive celulozne vrpce ("selotejpa") i zaštitne rukavice. Ljepljivu stranu selotejpa višekratno se čvrsto priljubi na različita mjesta kože oko _____ bolesnika ulazeći u nabore perianalnog ruba. Traka se potom pažljivo zalijepi na predmetno stakalce tako da joj površina bude što ravnija. Perianalni otisci se pretražuju _____.

Enterobius vermicularis – jaja (PAO)

_____

_____

_____

_____

2. Parazitološka pretraga urogenitalnih uzoraka

Zadatak 2.1.
Dopuniti rečenice

Trichomonas vaginalis je_____ koji _____cistični oblik. Prenosi se _____. Uzorci za dijagnostiku trihomonoze su _____, _____, _____. Uzorke treba transportirati na _____temperaturi. U dijagnostici se koriste _____. *Trichomonas* se _____ kultivirati.

Zadatak 2.2.

Nacrtati i opisati

Trichomonas vaginalis – Giemsa

_____

_____

_____

_____

3. Dijagnostika trihineloze, ehinokokoze i cisticerkoze

Zadatak 3.1.

Dopuniti tablicu

Bolest	Uzročnik	Infektivni oblik	Dijagnostika
Trihineloza			
Ehinokokoza			
Cisticerkoza			

Zadatak 3.2.

Nacrtati i opisati

Hidatidni pijesak - protoskoleksi

_____

_____

_____

_____

Trihinoskopija - larve *T. spiralis*

_____

_____

_____

_____

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Za koju vrstu trakavice čovjek može biti konačni i prijelazni domaćin?
2. Kako se razlikuje *Entamoeba histolytica* od apatogenih ameba?
3. Koja protozoa može uzrokovati hidrične epidemije povezane s vodovodnom vodom?
4. Izolacija na hranjivim podlogama rutinski se koristi u dijagnostici koje parazitoze?
5. Kako je građena hidatidna cista?

Datum: Potpis nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

VJEŽBA V1

Irena Tabain

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

UVOD

Uzorci za izravnu virološku dijagnostiku

Uzorci za izravnu virološku dijagnostiku se uzimaju s mjesta gdje se virus umnožava ili izlučuje, po mogućnosti čim ranije od početka simptoma, a optimalno 3-7 dana od početka bolesti.

Klinički uzorci mogu biti primarno sterilni (npr. cerebrospinalni likvor, krv) ili nesterilni, u kojima je prisutna normalna mikrobiološka flora (npr. bris ili aspirat nazofarinksa, stolica).

Uzorci: stolica, urin, cerebrospinalni likvor, sekret nazofarinksa, obrisci kože ili sluznica koji se dostavljaju u odgovarajućem transportnom mediju za virološku dijagnostiku, bioptat i uzorak krvi. Uzorci se uzimaju u sterilne posudice. Potrebno ih je čim prije pohraniti pri +4 °C i u što kraćem vremenu transportirati u laboratorij na obradu, poželjno unutar 24 sata. Ako obrada nije moguća unutar najviše 48-72 h, pohraniti uzorak treba pohraniti pri -20 °C, odnosno -70 °C.

Metode izravne dijagnostike virusnih bolesti

a. Detekcija virusa

i: Elektronska mikroskopija ili imunoelektronska mikroskopija-metoda koja omogućuje vizualizaciju virusa i analizu njihove strukture. Ova metoda omogućuje detekciju virusa koje je teško uzgojiti u staničnoj kulturi, a moguće ih je dokazati izravno u uzorku bolesnika.

ii. Dokaz antigena

1. imunofluorescencija-dokaz antigena izravno u uzorku pomoću monoklonskih protutijela označenih fluoresceinom
2. imunokromatografija-pojava linije u području na kojem se nalaze specifična protutijela (At), a posljedica je stvaranja Ag-At kompleksa
3. lateks-aglutinacija-pojava aglutinacije specifičnih protutijela vezanih za lateks čestice i antigena ako je prisutan u uzorku
4. imunoenzimski test-EIA- (engl. *Enzyme Immuno Assay)* -protutijela obilježena enzimom uz dodatak odgovarajućeg supstrata dolazi do promjene boje koja se određuje na čitaču.

iii. Dokaz nukleinske kiseline/genoma virusa (RNA ili DNA)

1. Metode amplifikacije nukleinske kiseline (lančana reakcija polimeraze /PCR/ PCR s reverznom transkripcijom/RT-PCR/; petljom posredovana izotermalna amplifikacija-LAMP (od engl. *Loop-mediated isothermal amplification*)
2. Sekvenciranje-metoda kojom se određuje slijed nukleotida u genomu. Moguće je odrediti slijed nukleotida za cijeli genom (engl. *Whole Genome Sequencing*) ili pojedinih gena, odnosno većih dijelova genoma.

Razvijene su brojne metode sekvenciranja DNA koje se razlikuju po svojstvima, poput načela sekvenciranja, propusnosti, točnosti, brzini, duljini čitanja sekvencija DNA, cijeni, te pripremi samih uzoraka za analizu, a dijele se nekoliko generacija: prvu generaciju čine sekvenciranje sintezom (npr. Sangerova metoda) ili cijepanjem, u drugu generaciju koju karakterizira paralelno čitanje više milijuna odsječaka te izravno prepoznavanje ili dokazivanje izlazne sekvencije bez upotrebe elektroforeze (pirosekvenciranje, npr. sustav Illumina) te treću generaciju koju čine metode poput sekvenciranja pojedinačnih molekula u stvarnom vremenu i sekvenciranje pomoću nanopora.

b. Izolacija virusa

i. laboratorijske životinje

ii. oplođeno kokošje jaje-koristi se u dijagnostici i u proizvodnji cjepiva.

Postoji nekoliko načina uzgoja virusa u oplođenom kokošjem jajetu koje uključuje nekoliko različitih lokacija koje je moguće koristiti za uzgoj virusa (amnionska vrećica, alantoisna vrećica, korioalantoisna membrana i žumanjčana vrećica). Prije inokulacije virusa jaja je potrebno pregledati na ovoskopu kako bi se utvrdilo jesu li oplođena te ako jesu da li je embrij živ. Nakon inokulacije i inkubacije slijedi berba virusa i njegova identifikacija. Metode identifikacije mogu biti: hemadsorpcija, hemaglutinacija, inhibicija hemaglutinacije, te dokaz antigena virusa ili molekularne metode.

iii. stanična kultura

To je sustav koji se koristi za uzgoj virusa, a sastoji se od nosača (epruvete ili bočice), hranjivog medija za umnožavanje i održavanje stanica te stanice (npr. epitelne ili fibroblasti).

Prema načinu pripreme stanične kulture mogu biti primarne stanične kulture koje se po prvi put priprema i može održavati kroz nekoliko pasaža te kontinuirana stanična kultura koja može podnijeti velik broj pasaža (npr. He-La stanice) te su pogodne u rutinskoj laboratorijskoj primjeni.

Stanice mogu biti ljudskog ili životinjskog porijekla.

Tijekom umnožavanja virusa u staničnoj kulturi neki virusi uzrokuju karakteristične promjene tzv. citopatski učinak (CPU) ili virusna inkluzijska tjelešca koji ukazuju na prisutnost virusa.

Dokaz virusa i njegova identifikacija u staničnoj kulturi uključuje razne metode kojima se dokazuje virusni antigen ili genom.

PRAKTIČNI RAD

Zadatak 1.

Nacrtajte i opišite citopatski učinak:

1. neinficirane nativne stanične kulture

2. CPU enterovirusa

3. CPU respiratornog sincicijskog virusa

4. CPU adenovirusa

5. CPU herpes simpleks virusa

6. CPU varicella-zoster virusa

7. Virusne inkluzije citomegalovirusa

8. Virusne inkluzije virusa bjesnoće

9. Obojeni preparat obriska grlića maternice

10. Morbili

11. Parotitis

Zadatak 2.

Izvođenje brzog antigenskog testa - dokaz antigena u uzorku.

Uzeti uzorak (obrisak ili stolicu) te promućkati štapić ili uzorak stolice u odgovarajućem puferu. Nakapati dobivenu suspenziju na pločicu te pričekati 15 min za očitanje testa.

Nacrtajte i opišite rezultat testa:

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Kako se čuvaju, a kako transportiraju obrisci za izravnu virološku dijagnostiku?
2. Na koje načine se može izolirati virus?
3. Koje vrste staničnih kultura postoje?
4. Koje promjene se javljaju u staničnoj kulturi tijekom umnožavanja virusa?
5. Opišite karakteristični CPU citomegalovirusa?

Datum: Potpis nastavnika:

Bilješke:

VJEŽBA V2

Marija Tonkić

Metode neizravne dijagnostike infektivnih bolesti- serologija.

UVOD

Primjena seroloških metoda u dijagnostici infektivnih bolesti najčešće podrazumijeva određivanje humoralnog imunosnog odgovora domaćina, tj. stvaranje specifičnih protutijela različitih klasa (IgA, IgM, IgG) na prisustvo određenog infektivnog uzročnika. Dokazivanje protutijela je indirektna dijagnostička metoda, za razliku od npr. kultivacije koja spada u direktne dijagnostičke metode. Međutim, sve uzročnike infektivnih bolesti nije moguće izolirati. Za one koji se mogu uzgojiti, izolacija je obično moguća u akutnoj fazi bolesti, a neuspješna u subakutnoj odnosno konvalescentnoj fazi. Uvjeti za izolaciju uzročnika mogu jako varirati, a sama izolacija i identifikacija uzročnika zahtijeva određeno vrijeme. Rezultat kultivacije uzročnika (osim virusa) može biti lažno negativan nakon uzimanja antibiotske terapije. Kultivacija nije metoda kojom se može retrospektivno postavljati dijagnoza u slučaju komplikacija nastalih nekoliko tjedana ili kasnije od početka bolesti. S druge strane, prednost kultivacije je da omogućuje određivanje antimikrobne osjetljivosti bakterijskih uzročnika.

Serološki testovi su obično negativni u ranoj akutnoj fazi bolesti, a pozitivni u subakutnoj odnosno konvalescentnoj fazi. Većina seroloških testova se može relativno jednostavno izvesti u jednom laboratoriju, rezulat je brzo dostupan, a ne ovisi o prethodnom antibiotskom liječenju. Jedan uzorak seruma se može testirati na više uzročnika, a serološki testovi također omogućavaju i retrospektivnu dijagnostiku.

Na temelju određivanja dinamike stvaranja protutijela u serumu, serološke metode omogućavaju dokazivanje infekcije (akutne, kronične,..). Osim toga, služe za utvrđivanje imunosnog statusa npr. bolesnika kojima treba napraviti transplantaciju ili trudnica te onih osoba koje su su zbog prirode svog posla više izložene riziku da dobiju određenu infekciju (zdravstveni djelatnici).

Uzorak za serološko testiranje je serum izdvojen iz uzorka krvi bolesnika. Uzorak krvi se uzima natašte, venepunkcijom kubitalne vene, u aseptičnim uvjetima, u epruvetu bez dodanog antikoagulansa. Količina krvi za odrasle bolesnike je 8 do 10 ml, a 3 do 4 ml za djecu. Nakon uzimanja, 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. Izdvojeni serum se stavlja u novu epruvetu i pohrani na 2-8°C ako se testiranje radi u roku od par dana. Ako je testiranje odgođeno, serum se zamrzava, tj. pohranjuje pri temp. od -20°C. Serum se ne smije odmrzavati pa ponovno zamrzavati jer to utječe na razinu eventualno prisutnih protutijela. Nije prihvatljivo testirati hemolizirani, ikterični ili lipemični serum.

Pomoću nekih seroloških reakcija mogu se odrediti ukupna protutijela (npr. test neutralizacije, reakcija vezanja komplementa-RVK) dok je pomoću ELISA (engl. *Enzyme Linked Immunnosorbent Assay*) testa ili testa indirektne imunofluorescencije (IFA, engl. *Indirect Fluorecscent Antibody Assay*) moguće odrediti pojedine klase protutijela.

Najčešće korištene serološke reakcije i njihov temeljni princip su:

- **aglutinacija** - antigeni su formirane, netopljive čestice
- **hemaglutinacija** – dolazi do aglutinacije eritrocita
- **precipitacija** – koristi se topljivi antigen
- **reakcija vezanja komplementa** (RVK) - eritrociti služe kao indikator
- **neutralizacija** - inaktivacija toksina ili virusa
- **fluorescentne tehnike** - indikatorska protutijela su obilježena fluorescentnom bojom
- **ELISA** - indikatorska protutijela su obilježena enzimom

Koliko dugo će se moći dokazati protutijela u serumu nakon infekcije ovisi o značajkama samog mikroorganizma, njegovoj mogućoj perzistenciji u organizmu te osjetljivosti serološkog testa koji se koristi. Pravilo je da se, u slučaju primarne infekcije, kada dolazi do prvog kontakta s nekim nepoznatim antigenom, najprije pojavljuju protutijela IgM klase koja su u serumu prisutna do nekoliko mjeseci. IgG protutijela se javljaju nešto kasnije od IgM protutijela, ali ostaju prisutna u niskom titru doživotno. Reinfekcija istim uzročnikom pojačava i ubrzava imunosni odgovor te dovodi do porasta titra IgG protutijela.

Za serološko testiranje bi bilo idealno svakom pacijentu uzorkovati dva seruma, **1.** ili **akutni serum** i **2.** ili **rekonvalescentni (parni) serum.** Prvi serum je potrebno uzeti što ranije u početku bolesti, najkasnije do kraja 1. tjedna. Drugi serum treba uzorkovati 2-3 tjedna nakon uzimanja 1. seruma. Oba seruma treba testirati istodobno, istim serološkim testom te odrediti koliki je titar protutijela u svakom serumu i kakva je dinamika titra kada se usporede titrovi 1. i 2. seruma. Od uzoraka seruma se rade serijska dvostruka razrjeđenja te se na kraju, kao rezultat serološkog testa, dobije tzv. titar protutijela**.**

Titar protutijela je recipročna vrijednost najvećeg razrjeđenja testiranog seruma bolesnika u kojem je serološka reakcija pozitivna, tj. utvrđeno je da je došlo do reakcije (vezivanja) između antigena i protutijela. Važno je usporediti titar prvog i drugog seruma te ustanoviti ima li ta dinamika dijagnostički značaj.

Dinamika nastanka protutijela nije jednaka u svim vrstama infekcija. Ovisi i o vremenu inkubacije, mjestu ulaska uzročnika, radi li se o lokaliziranoj ili generaliziranoj infekciji i sl. Tako se npr. u slučaju pneumonije uzrokovane *M. pneumoniae*, zbog dugog vremena inkubacije, već na počeku bolesti u serumu bolesnika mogu naći značajne količine protutijela. S druge strane, protutijela se stvaraju sporo i u malim količinama u slučaju površinskih infekcija sluznica (npr. akutni gonokokni ili klamidijski uretritis). Ipak, u većini slučajeva, specifična protutijela se stvaraju krajem prvog ili početkom drugog tjedna od početka bolesti. Razina protutijela (titar) će porasti kao odraz odgovora na infekciju. No, svaki porast titra protutijela nije klinički značajan. Kada se rade testovi u kojima se određuju ukupna protutijela, a ne pojedine klase, porast titra protutijela za najmanje 4 ili više puta je karakterističan za akutnu infekciju. Pad titra protutijela je karakterističan za upravo prošlu infekciju (rekonvalescenciju). Na akutnu infekciju ukazuje i tzv. **serokonverzija** kada u prvom serumu bolesnika nisu dokazana protutijela, a u drugom serumu su dokazana u bilo kojem titru. Prednost testova kao što su ELISA i IFA je da se u jednom uzorku seruma mogu odrediti pojedine klase protutijela (Tablica 1.). To su osjetljivi testovi i za njihovo izvođenje su potrebne male količine seruma i drugih reagencija. U ovim testovima primarnu infekciju dokazuje nalaz IgM protutijela u jednom uzorku seruma i četverostruki ili viši porast titra IgG protutijela kada se uspoređuju akutni i rekonvalescentni serum. Na reinfekciju (ponovnu infekciju istim uzročnikom) ukazivat će čeverostruki ili viši porast titra IgG

ili ukupnih protutijela kada se testiraju akutni i rekonvalescentni serum te odsutnost ili blagi porast IgM protutijela.

Tablica 1. Mogući rezultati i tumačenje testova u kojima se određuju IgM i IgG protutijela

IgM	IgG	Stadij infekcije	Opaska
-	-	Nema infekcije	Serum možda prerano uzet, ponoviti pretragu
+	-	Rani stadij akutne infekcije	
+	+	Akutna infekcija, kasniji stadij	
-	+	Prošla infekcija	

Osim dokazivanja prisutnosti pojedinih klasa protutijela u serumu, moguće je serološki dokazivati i avidnost IgG protutijela (npr. za CMV ili T*oxoplasma gondii*). Avidnost predstavlja jačinu afiniteta specifičnih protutijela prema komplementarnom antigenu, tj. kolika je čvrstoća veze između antigena i, za taj antigen, specifičnog protutijela. Pravilo je da je avidnost niska u početku infekcije a visoka nekoliko mjeseci od početka infekcije.

Rezultate seroloških testova treba interpretirati uzevši u obzir informacije o anamnezi i kliničkim nalazima bolesnika, podatke o prethodnoj imunizaciji te radi li se o npr. trudnici, imunosuprimiranoj osobi, primatelju transfuzije te podatke o eventualnoj epidemiji, hospitalnoj infekciji itd. Pri interpretaciji seroloških nalaza važno je uzeti u obzir vrijeme uzimanja seruma jer, npr., u prerano uzetom prvom serumu protutijela nije moguće detektirati. Također, u nekih bolesnika dolazi i do nespecifičnog poticaja imunosnog odgovora (poliklonska aktivacija B limfocita). Serumi nekih bolesnika koji imaju npr. sistemski lupus, reumatoidni artritis i sl. reagiraju (obično u niskim titrovima) s mnogim antigenima koji se koriste u serološkim reakcijama. Mogu se javiti i križne reakcije na određene uzročnike zbog zajedničkih antigenih determinanti.

Serološke metode se koriste u dijagnostici infekcija uzrokovanih različitim vrstama mikroorganizama, najčešće virusnih (virusi hepatitisa, EBV, CMV, HIV). U dijagnostici bakterijskih infekcija serološke metode se koriste najčešće za dokazivanje uzročnika atipičnih pneumonija, sifilisa te infekcijama koje uzrokuje *Streptococcus pyogenes,* a u novije vrijeme i za dokazivanje latentne i aktivne tuberkuloze (Quantiferon test).

Reakcija vezanja komplementa (RVK)

Test se temelji na činjenici da se se komplement veže na kompleks antigena i protutijela te se na taj način uklanja iz reakcijske mješavine. Ovaj test se može koristiti za određivenje antigena ili protutijela, ovisno o tome što je poznato.

Test se odvija u dvije faze.

1. faza:

- u epruveti se pomiješa serum pacijenta s poznatim antigenom, i ako u serumu postoje protutijela za taj antigen, stvaraju se kompleksi antigen-protutijelo koji ireverzibilno vežu komplement (uz inkubaciju preko noći pri 4-8 °C).

  Komplement koji se dodaje mješavini antigena i protutijela je u obliku seruma zamorca. Kako količina komplementa koji se dodaje u testnu mješavinu mora biti točno poznata a serum čovjeka također sadrži komplement, iz seruma pacijenta se komplement uklanja prije testiranja inaktivacijom pri 56 °C kroz 30 minuta (tzv. termoinaktivacija).

2. faza:

1. testnoj mješavini koja je bila inkubirana preko noći dodaje se indikatorski sustav (pri temperaturi od 37 °C, kroz 30 minuta) koji omogućuje očitavanje testa i interpretaciju rezultata. Indikatorski sustav čine ovčji eritrociti koji su prethodno bili senzibilizirani hemolizinima, tj. protutijelima koja liziraju ovčje eritrocite. Liza ovčjih eritrocita će se dogoditi samo u slučaju da u testnoj mješavini ima slobodnog komplementa, tj. ako u serumu pacijenta nije bilo protutijela za antigen, stoga nisu nastali kompleksi antigen-protutijelo i komplement je ostao slobodan. Stoga pojava hemolize u RVK testu znači negativnu reakciju.
2. ako je u serumu pacijenta bilo protutijela za testirani antigen, komplement će se vezati za kompleks antigen-protutijelo te neće doći do hemolize erirocita. Stoga odsustvo hemolize, tj. pojava istaloženih eritrocita na dnu epruvete znači pozitivnu reakciju u RVK testu.

Direktna aglutinacija

Ovaj test se koristi najčešće u dijagnostici bakterijskih infekcija, za dokazivanje protutijela na salmonele (Widalov test), brucele (Wright test) i sl. gdje je antigen cijela bakterijska stanica koja je tretirana formalinom, fenolom, kuhanjem i sličnim postupcima. Test se izvodi u epruveti ili mikrotitar pločici, korištenjem različitih, uvijek dvostrukih, razrjeđenja seruma.

Vezanjem protutijela na antigen dolazi do vidljivog nakupljanja (aglutinacije) bakterija koja je vidljiva golim okom.

Hemaglutinacija (pasivna ili indirektna)

U ovom testu su eritrociti nosači antigena. Kada se eitrociti pomiješaju sa serumom u kojem se nalaze specifična protutijela, dolazi do aglutinacije eritrocita.

Inhibicija hemaglutinacije (IHA)

Ovaj test se temelji na činjenici da brojni virusi aglutiniraju eritrocite čovjeka i različitih životinja. Ta pojava se naziva hemaglutinacija a infekcija nekim od ovih virusa uzrokuje pojavu protutijela u serumu pacijenta koja mogu inhibirati sposobnost virusa da izazove hemaglutinaciju što je temelj za test inhibicije hemaglutinacije.Test se izvodi u mikrotitar pločicama. Antigen je virusni hemaglutinin, tj. supernatant tekućine kulture stanica u kojoj je virus uzgajan.Nakon dodavanja seruma pacijenta i inkubacije, dodaju se eritrociti kao indikator. . Ako je u serumu pacijenta bilo protutijala, neće doći do aglutinacije eritrocita nego će se eritrociti istaložiti na dnu bazenčića mikrotitar pločice. Prema tome, izostanak hemaglutinacije znači pozitivnu reakciju u IHA. Pojava hemaglutinacije znači negativan rezultat testa.

Neutralizacijski test (NT)

Test se temelji na činjenici da virus gubi infektivnost ako se prethodno pomiješa sa odgovarajućim protutijelima, tj. protutijela ga blokiraju („neutraliziraju“).

Test se može koristiti za određivanje protutijela ili za identifikaciju virusa. Izvodi se najčešće na kulturi stanica na kojoj virus uzrokuje tzv. citopatični učinak (CPU). Ako je virus blokiran djelovanjem protutijela, neće uzrokovati citopatični učinak na kulturi stanica. Test se izvodi tako da se određena količina virusa pomiješa sa serijskim, dvostrukim razrjeđenjima seruma pacijenta te se tom mješavinom inokulira kultura stanica. Izostanak CPU znači da u serumu pacijenta postoje protutijela za taj virus.

Ovaj postupak se rijetko koristi za dokazivanje protutijela jer je zahtjevan, dugotrajan i skup.

Paul-Bunnell test

Koristi se za dijagnostiku infekciozne mononukleoze (IM) na temelju dokaza heterofilnih (nespecifičnih) protutijela (nespecifičnih aglutinina) koja nisu specifična za infektivni agens (EBV) ali su karakteristična za IM.

Serum pacijenta koji ima IM aglutinira eritrocite ovna. Kako se aglutinacija može javiti i kada se testira serum zdrave osobe, izvodi se modifikacija testa po Davidshonu., tj. adsorpcija seruma pacijenta bubregom zamorca i eritrocitima goveda.

Serum pacijenta sa IM, nakon adsorpcije s bubregom zamorca će aglutinirati eritrocite ovna a nakon adsorpcije sa eritrocitima goveda ne aglutinira eritrocite ovna.

Test hemolize po Masonu

Serum pacijenta s infekcioznom mononukleozom sadržava hemolizine za eritrocite bika. Serumu se dodaju eritrociti bika i komplement te, u slučaju pozitivne reakcije, dolazi do hemolize.

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Za dokazivanje protutijela IgM, IgG ili IgA klase koristi se indirektni ELISA test.

Test se temelji na činjenici da jedna molekula enzima može razgraditi mnogo molekula supstrata te se količina razgrađenog supstrata može mjeriti.

Princip testa

1. faza: antigen je vezan na nosaču, obično na dnu bazenčića mikrotitar pločice. Dodaje se serum pacijenta i, ako serum sadrži protutijela za taj antigen, stvaraju se kompleksi antigen-protutijelo
2. faza: dodaje se enzimom obilježeno protutijelo za ljudski IgM ili IgG ili IgA koje se veže za prethodno nastali kompleks antigen – protutijelo. Da bi se odredila količina tako stvorenih kompleksa, u bazenčiće se dodaje supstrat za enzim. U slučaju pozitive reakcije, tj. postojanja protutijela u serumu pacijenta, doći će do promjene boje reakcijske mješavine koja je rezultat nakupljanja krajnjih produkata enzimatske razgradnje supstrata. Test se očitava spektrofotometrijski da bi se odredila optička gustoća (engl. *optical density*, OD) koja korelira s količinom protutijela vezanih za antigen.

Indirektni imunofluorescentni test (*Indirect Fluorescent Antibody Test*), IFA

Test se temelji na činjenici da neke boje (fluorokromi) postanu „ekscitirane“ kada se izlože svjetlu kratkih valova iz ljubičasto-plavog dijela spektra.

Ovaj test se koristi za dokazivanje protutijela različitih klasa (IgM, IgG ili IgA).

Antigen (stanice inficirane virusom ili intracelularnim bakterijama, bakterije, gljive ili paraziti) je pričvršćeno za čvrstu površinu, najčešće za predmetno stakalce. Dodaje se serum pacijenta i, ako u njemu ima protutijela, ona će se vezati za antigen. Nakon toga se dodaje protutijelo specifično za ljudski IgM ili IgG ili IgA obilježeno fluorescentnm bojom (fluorokromom) kao što je fluorescein izotiocijanat (FITC). Test se očitava upotrebom fluorescentnog mikroskopa.

Western blot (WB)

Test se koristi za određivanje protutijela za pojedine specifične antigene mikroorganizama. Mikroorganizam se razori kemijskim ili mehaničkom putem i otopljeni antigeni se stavljaju na poliakrilamidni gel te se razdvajaju po veličini elektroforezom (manji proteini putuju brže). Tako dobivene proteinske vrpce se prenose na trake nitroceluloznog papira. Dodaje se serum pacijenta te se tijekom inkubacije protutijela iz seruma pacijenta, ako ih ima, vežu na antigene (proteine na traci). Protutijela se potom dokazuju enzimatskim postupkom sličnim EIA (enzimski imunoesej). Western blot se najčešće koristi za dokazivanje protutijela na HIV.

PRAKTIČNI RAD

1. Reakcija vezanja komplementa (RVK)

Dopuniti rečenice:

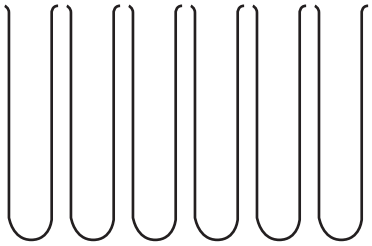
1. RVK je serološka tehnika kojom se određuje _____ titar protutijela.
2. Pozitivna reakcija u RVK se očituje kao _____.
3. Negativna reakcija u RVK se očituje kao_____.
4. RVK zahtijeva testiranje_____ seruma da se može pratiti _____ titra protutijela.

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:

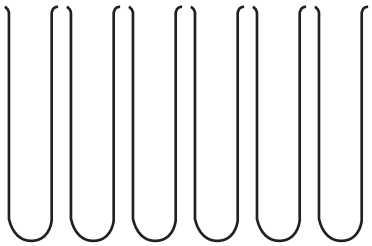
Titar protutijela u serumu:



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 na temelju zadanih vrijednosti.

Rezultat ELISA testa			Tumačenje nalaza
VCA-IgM	VCA-IgG	EBNA-IgG	
-	-	-	
+	+	-	
-	+	-	
+	+/-	+	
-	+	+	

Zadatak 2.2.

Očitati ELISA test u mikrotitar pločici i na temelju rezultata protumačiti stadij EBV infekcije.

Serum	VCA-IgM	VCA-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.			

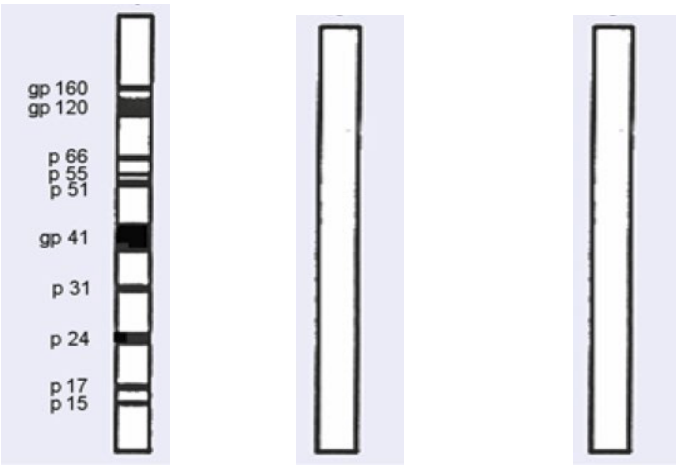
3. Western blot (WB)

Dopuniti rečenice:

1. Serološka tehnika 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 pacijenta koji su zadani na vježbi i interpretirati nalaz.



Pac. 1. Pac. 2.

Zadatak 4.

Upotpunite tumačenje rezultata HBV serologije s navedenim pojmovima:

akutna infekcija , ranija infekcija i imunost, posljedica cijepljenja, davna infekcija ili "dijagnostički prozor", kronična infekcija, rana akutna infekcija, osjetljiv

Rezultat				Tumačenje
HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	
+	-	+	-	
-	-	+	-	
-	-	-	-	
+	-	+	+	
-	+	-	-	
-	+	+	-	
+	-	-	-	

Zaključak

Pitanja za ponavljanje i utvrđivanje gradiva:

1. Titar protutijela je _____
2. Serokonverzija je _____
3. Što serološki ukazuje na primarnu infekciju?_____
4. Serološke reakcije kojima se mogu odrediti titrovi pojedinih klasa imunoglobulina su _____
5. Koja je prednost ELISA testa u odnosu na RVK?_____ _____
6. Opišite način izvođenja RVK_____ _____ _____ _____
7. Kako se serološki očituje reinfekcija?_____
8. Navedite primjere testova aglutinacije._____

Datum: Potpis nastavnika:

_____ _____

Bilješke:

Bilješke:

POPIS AUTORA

CAREV,MERICA, doc.dr.sc.,dr.med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije, Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu

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

KALITERNA, VANJA, doc.dr.sc.,dr.med., specijalist medicinske mikrobiologije i parazitologije, Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu

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

NOVAK, ANITA, doc.dr.sc., 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

TABAIN, IRENA doc.dr.sc.,dr.med., specijalist kliničke mikrobiologije, Služba za mikrobiologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo Zagreb

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