

**PRAKTIČNI DIO PREDMETA MIKROBIOLOGIJA I
ZARAZNE BOLESTI**

**-VJEŽBE -
(ZA INTERNU UPOTREBU)**



ELA RADOVAN, dr. med. vet.

VJEŽBA 1.

LABORATORIJSKI PRIBOR I OPREMA

OPIS RADA:

1. PREDMETNICE S. PREDMETNA STAKALCA

- staklene pločice
- služe za pripremu mikroskopskih preparata ili jednostavnih seroloških reakcija
- d=70mm š=26mm v=1mm
- predmetnice za „viseću kap“

2. POKROVNICE ILI POKROVNA STAKALCA

- tanke, četvrtaste pločice
- služe za pokrivanje mikroskopskih preparata
- 18x18 mm 22x22 mm v=0,17 mm

1. MIKROBIOLOŠKA UŠICA ILI EZA

- služi za uzimanje pretraživanog materijala, izradu razmazaka, naciepljivanje hranjivih podloga, izvođenje seroloških reakcija na predmetnici
- sastoji se od držala i nehrđajuće žice savijene u kružnu ušicu Ø 4mm
- prije i nakon uporabe sterilizirati žarenjem na plamenu
- plastična za jednokratnu primjenu

2. PLAMENIK

- služi za sterilizaciju kovinskog pribora
- plinski Bunsenov p.

3. KOVINSKA LOPATICA

- služi za toplinsku sterilizaciju površine organa za uzimanje uzorka tkiva iz dubljih slojeva

4. PRIBOR ZA BOJENJE MIKROSKOPSKIH PREPARATA

- čine ga bočice s otopinama boja i stalak za predmetnice

5. EPRUVETE

- različitih veličina; najčešće se koriste dužine 16 cm, a Ø 16 mm, nezaobljenih rubova na otvoru

6. PIPETE

- staklene cijevi različite dužine
- na donjem kraju sužene
- služe za odmjeravanje tekućine

- graduirane (od 1, 5, 10, 20 ml i mikropipete)
- trbušasta pipeta
- PROPIPETA

7. KAPILARE

- nalikuju pipetama
- kapilarni dio uzak i dugačak, a gornji dio širok i kratak
- KAPALJKE, PASTEUROVA PIPETA
- služe za prenošenje tekućine u kapima, uzimanje uzorka tkiva iz dubine organa
- plastične

8. PETRIJEVE ZDJELICE

- okrugle, plosnate staklene ili plastične zdjelice
- Ø 5, 10 ili 12 cm.
- koriste se za uzgoj mikrobnih kultura
- u donju manju zdjelicu stavlja se hranjiva podloga
- gornja, veća zdjelica služi kao poklopac

9. PINCETE, ODMJERNE TIKVICE (ERLENMEYEROVA NPR.)

10. INKUBATOR (TERMOSTAT)

- služi za uzgoj mikroba
- ormarić dvostrukih stijenki i vrata
- unutar i. nalaze se mrežaste police na koje se stavljaju nacijepljene hranjive podloge
- ugrađeni grijači i termoregulacijska sklopka koja održava odabranu temperaturu
- najčešća T za inkubiranje je 37°C

11. MIKROSKOP; LUPA

- optička pomagala
- sastoji se od mehaničkog i optičkog dijela
- suhi i imerzijski objektiv
- imerzijska tekućina
- mikroskopiranje-upotreba mikroskopa!!
- postupak nakon mikroskopiranja!!

12. OSTALA LABORATORIJSKA OPREMA

- LABORATORIJSKA CENTRIFUGA
- DIGITALNA VAGA
- BROJAČ KOLONIJA
- VODENA KUPELJ

VJEŽBA 2.

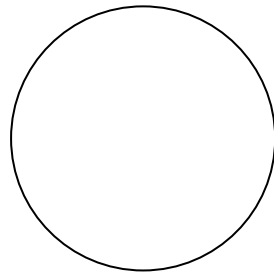
MIKROSKOPIRANJE TRAJNIH PREPARATA

Naučimo mikroskopirati na trajnim histološkim preparatima!

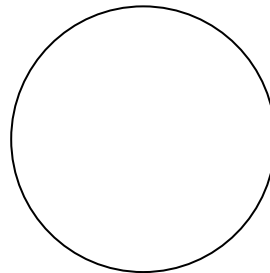
OPIS RADA:

1. uključiti mikroskop u električnu mrežu-svjetlo!!
2. na stolić mikroskopa staviti preparat tako da slika promatranog tkiva bude u sredini vidnog polja
3. gledajući sa strane mikroskopa, objektiv slabog povećanja polako spuštati makrovijkom do površine predmetnice
4. gledajući kroz okular, makrovijkom lagano podizati tubus mikroskopa dok se u vidnom polju ne pojavi slika preparata, koju izoštrimo mikrovijkom
5. po promatranom preparatu možemo „šetati“ pomicanjem stolića mikroskopa uz pomoć vijaka sa strane
6. nacrtati što smo vidjeli (pregled preparata) i ukratko opisati
7. iskopčati napon struje, obrisati mikroskop mekom krpom, optičke dijelove papirom za leće, pokriti vrećicom i spremiti

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 3.

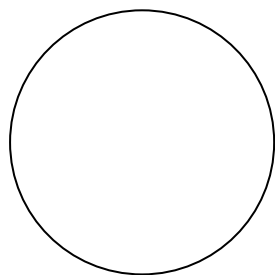
PRAVLJENJE VLAŽNOG MIKROSKOPSKOG PREPARATA

To je najjednostavniji mikroskopski preparat; služi za proučavanje morfologije gljivica i većih bakterija, a može se uočiti i pokretljivost bakterijskih stanica

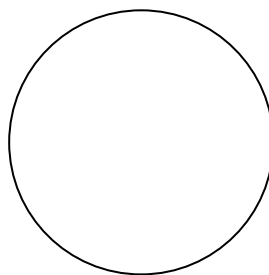
OPIS RADA:

- na vrh noža suhi „digo“ kvas staviti u tikvicu, dodati malo mlake vode i pričekati
 - Pasterovom pipetom ili užarenom ezom nanesimo malo pretraživanog materijala na sredinu čiste predmetnice
 - lagano pokrijemo čistom pokrovnicom
 - mikroskopiramo
- Umjesto kvasca možemo koristiti vodu iz bunara, lokvi...
- nakon mikroskopiranja obrisati i spremi mikroskop

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 4.

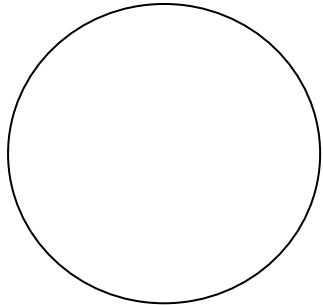
VISEĆA KAP

To je oblik neobojenog preparata koji se koristi kad se želi odrediti pokretljivost bakterija!

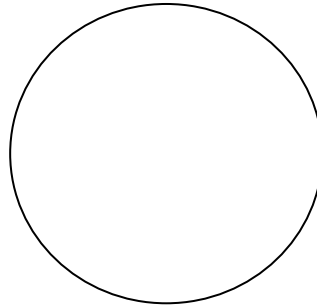
OPIS RADA:

- koristi se posebna predmetnica:
 - deblja od obične
 - s jedne strane površine polukuglasto udubljena
- oko udubine na predmetnicu se na par mjesta staklenim štapićem nanese malo vazelina
- na sredinu pokrovnice stavi se kap pretraživanog materijala (barska, ustajala voda npr.)
- predmetnicu se preokrene i laganim pritiskom prilijepi (vazelin) na pokrovnicu
- lagano preokrenemo predmetnicu s prilijepljenom pokrovnicom
- ako smo pažljivo radili, kap tekućine „visi“ na pokrovnici iznad udubine u predmetnici
- stavimo pokrovnicu na stolić mikroskopa
- pod malim povećanjem najprije treba naći rub viseće kapi
- pomicanjem stolića mikroskopa kap se namjesti u sredinu vidnog polja
- mikroskopirati pod najvećim povećanjem mikroskopa
- mikroskop obrisati i spremi

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 5.

OBOJENI PREPARATI

- u obojenim preparatima mikrobi se vide jasnije
- s dobrim mikroskopima može se promatrati njihova unutrašnja građa
- prilikom bojenja preparata treba paziti da se ne nanese previše ili premalo boje (boja se organska tvar uzorka ili se mikrobi teško pronalaze na vidnom polju)
- na strani predmetnice na kojoj se ne nanosi materijal flomasterom označiti broj pretrage ili ime učenika i zaokružiti mjesto na koje se materijal nanosi

-materijal se može nanositi RAZMAZIVANJEM (RAZMAZAK) ili OTISKOM (OTISAK)

RAZMAZAK IZ TEKUĆINA:

- mikrobiološkom ušicom uzme se kap tekućine i stavi na sredinu predmetnice
- kružnim pokretima jednakomjerno razmazati u tanak razmazak
- staviti predmetnicu na stalak
- sušiti na sobnoj temperaturi

RAZMAZAK IZ KOLONIJA:

- mikrobiološkom ušicom na predmetnicu staviti kap fiziološke otopine NaCl
- ezom „zagrebemo“ po izraslim kolonijama na hranjivoj podlozi
- u kap NaCl suspendiramo ezom uzeti materijal
- kružnim pokretima jednakomjerno razmažemo u tanak razmazak
- predmetnicu s pripremljenim materijalom staviti na stalak za bojanje da se osuši na zraku


RAZMAZAK IZ PARENHIMSKIH ORGANA:

- površinu parenhinskog organa (jetra, bubreg npr.) steriliziramo užarenom kovinskom lopaticom
- Pasterovu pipetu utiskujemo kroz tu steriliziranu površinu da bi uzeli uzorak tkiva
- izvađeno tkivo se suspendira u kapi fiziološke otopine na predmetnici i razmaže ezom kružnim pokretima u tanak razmazak
- predmetnicu staviti na stalak da se osuši na zraku

MIKROBIOLOŠKU UŠICU UVIJEK UŽARITI PLAMENOM!!

OTISAK:

- koristi se ako želimo utvrditi zagađenost površine nekog organa, kože ili sluznice
- jednostavno se čista predmetnica pritisne na mjesto uzimanja otiska bez pomicanja po površini
- predmetnicu staviti na stalak da se suši na zraku

-prije bojenja materijal treba učvrstiti (fiksirati) za predmetnicu  **toplinom (na plamenu)**
hipertoničnom otopinom

toplinom → predmetnicu uhvatimo pincetom tako da je razmazak okrenut prema gore i 3x prevučemo po vršku plamena

ako koristimo **hipertoničnu otopinu** najčešće se koristi metilni ili 96% etilni alkohol tako da preparat ta otopina pokrije po cijeloj površini; nakon 3-5 min. odlije se alkohol, predmetnica stavi u kosi položaj da se suši na sobnoj T

VJEŽBA 6.

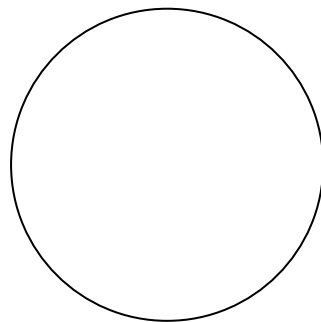
LÖFFLEROVO BOJENJE METILENSKIM MODRILOM

- jednostavno bojenje za otkrivanje bakterija
- pogodno za dokazivanje tzv. bipolarnih bakterija

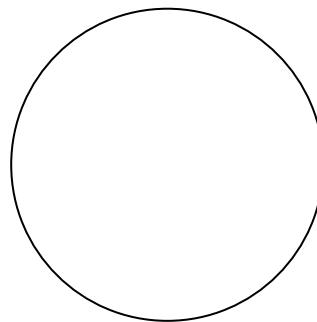
OPIS RADA:

- izraditi preparat (izrasle kolonije s hranjive podloge, otisak s površine sluznice usne šupljine...)
- učvrstiti ga plamenom
- preliti preparat otopinom metilenskog modrila i ostaviti pod bojom 3-5 min.
- odliti boju, preparat isprati vodom i osušiti
- mikroskopirati
- mikroskop obrisati i spremi

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 7.

GIEMSINO BOJENJE

Ubraja se u sastavljena ili diferencijalna bojenja; koristi se za bojenje:

- spiralnih, bipolarnih i kapsularnih bakterija
- rikecija, protozoa i virusnih uklopina
- u hematologiji se koristi za bojenje krvnih razmazaka

OPIS RADA:

- izraditi preparat (razmazak iz bakterijskih kolonija s hranjive podloge, razmazak iz parenhimskih organa...)
- razmazak učvrstiti metilnim alkoholom
- osušiti preparat
- preliti preparat razrijeđenom Giemsinom otopinom i ostaviti stajati 20 min
- odliti boju, preparat isprati vodom (destilirana!)
- osušiti i mikroskopirati

PRIPREMA RAZRIJEĐENE GIEMSINE OTOPINE: Giemšina otopina je mješavina boja i u laboratoriju se čuva u koncentriranom obliku; neposredno prije bojenja preparata priprema se od koncentrirane otopine tzv. radna otopina.

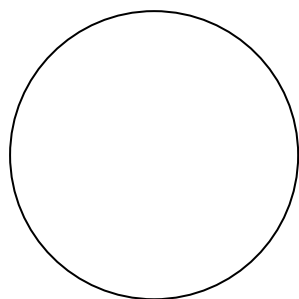
Priprema radne otopine:

- u menzuru na 1 ml destilirane vode doda se 1 kap koncentrirane otopine
- za 1 preparat potrebno je \approx 5 ml radne otopine

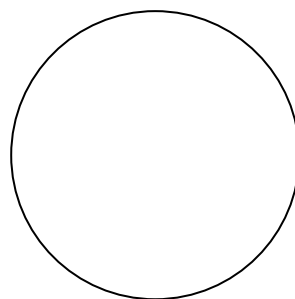
NAPOMENA:

- bazofilni elementi stanice mikroba oboje se plavo
- acidofilni crveno
- neutrofilni ljubičasto

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 8.

GRAMOVO BOJENJE

Osnove ovog bojenja prvi je opisao danski biolog Christian Gram 1884. g. Otada je izvorni postupak više puta mijenjan, ali je zadržao naziv po autoru koji ga je prvi objavio!

Važan u identifikaciji bakterija; u praksi pomaže u pravilnom odabiru djelotvornog antibiotika i dezinficijensa.

Koriste se dvije boje, i to karbolgencijana violet (ljubičastoplava) i karbolfuksin (crvena). Nanose se na preparat jedna nakon druge.

Većinu bakterija možemo podijeliti u 2 skupine:

-gram-negativne (oboje se crveno)

-gram pozitivne (oboje se ljubičastoplavo)

Razlog različitog primanja boje je u sastavu, građi i debljini stanične stijenke bakterija (ponovimo!)

OPIS RADA:

-izraditi preparat (razmazak iz bakterijske kolonije izrasle na hranjivoj podlozi, otisak s površine sluznice ušne šupljine, razmazak iz barske vode...)

-učvrstiti ga plamenom

-preliti bojom karbolgencijana violet i ostaviti 3 min

-odliti boju

-isprati lagano vodom

-preliti Lugolovom otopinom, ostaviti 2 min i odliti

-odbojiti 98%-tnim alkoholom (dvaput naliti uz lagano pokretanje predmetnice sve dok preparat otpušta boju)

-isprati vodovodnom vodom

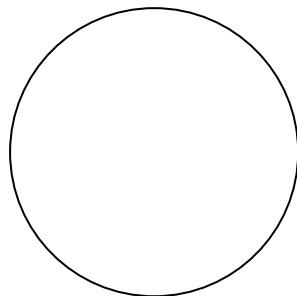
-obojiti otopinom karbolfuksina, ostaviti stajati 15-30 sec

-oprati vodovodnom vodom

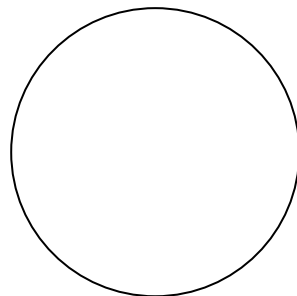
-osušiti i mikroskopirati

-mikroskop obrosati i spremi

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 9.

HRANJIVE PODLOGE ZA UZGOJ BAKTERIJA

Višestruki su razlozi zbog kojih se bakterije uzgajaju u laboratorijskim uvjetima:
-izdvajanje bakterija iz ispitivanog materijala u svrhu postavljanja dijagnoze (etiološka dg.)
-provjera osjetljivosti bakterija prema kemoterapeuticima
-za pripremanje bakterijskih antigena (serološke reakcije; izrada cjepiva)

PODJELA H. PODLOGA PREMA PODRIJETLU I SASTAVU:

1. Prirodne (krv, krvni serum, mlijeko...)
2. Sintetične (proizvode se industrijski po određenoj recepturi)
3. Polusintetične (kombiniraju se sastojci prirodnih i sintetičnih podloga)

PODJELA H. PODLOGA PREMA KONZISTENCIJI:

1. Tekuće
2. Polutekuće (polučvrste)
3. Čvrste

PODJELA H. PODLOGA PREMA NAMJENI:

1. Hranjive podloge za izdvajanje bakterija iz pretraživanog materijala
2. Selektivne h. podloge
3. Diferencijalne h. podloge
4. H. podloge za određivanje biokemijskih svojstava bakterija
5. H. podloge za čuvanje bakterijskih kultura
6. H. podloge za posebne namjene

NAŠE HRANJIVE PODLOGE SU SINTETIČKE, NARUČENE OD PROIZVOĐAČA KOJI IH PROIZVODI ZA POTREBE RAZLIČITIH VRSTA LABORATORIJA. NJIHOV JE KEMIJSKI SASTAV TOČNO ODREĐEN I URAVNOTEŽEN.

NOSE NAZIV AGAR-AGAR I KORISTE SE ZA UZGOJ BAKTERIJA (agar je heteropolisaharid, a proizvodi se iz morskih algi roda Gelidium nastanjenih u Indijskom oceanu, u priobalju Japana i Novog Zelanda; prisutnost agara ne utječe na hranidbenu vrijednost podloge i većina bakterija ga ne može iskoristavati. Važna osobina agara je da se rastali na T između 95-98°C i očvrstne na 40°C i tada prelazi u gel stanje kroz koje mogu u hranilište difundirati različite topljive tvari.)

U DANAŠNJE VRIJEME PROIZVODE SE DEHIDRIRANE HRANJIVE PODLOGE U OBLIKU PRAŠKA. U LABORATORIJU IM SE DODAJE SAMO DESTILIRANA VODA, ZAGRIJAVAJU SE NA 100°C I STERILIZIRAJU SE PREMA UPUTI PROIZVOĐAČA. MOGU IM SE DODAVATI ODREĐENE TVARI.

OPIS RADA:

IZRADIMO SAMI HRANJIVE PODLOGE PO UPUTI PROIZVOĐAČA !!

VJEŽBA 10.

NACJEPLJIVANJE HRANJIVIH PODLOGA

Pretraživani materijal (uzorak organa, obrisak npr.) naciepljuje se na hranjivu podlogu kako bi se iz njega izdvojile bakterije koje su izazvale infekciju.

Naciepljivanje se može izvesti na dva načina: iscrpljivanjem ili razrjeđivanjem materijala.

1. OPIS RADA: METODA ISCRPLJIVANJA

- površinu organa** sterilizirati užarenom kovinskom lopaticom
- kroz sterilizirano mjesto iz dubine uzorak uzimamo Pasteurovom pipetom
- stavimo uzorak na hranjivu podlogu
- sterilnom mikrobiološkom ušicom razmažemo uzorak i to povlačenjem ušice u zavojitim („cik-cak“) potezima po čitavoj površini hranjive podloge
- tako se s ušice iscrpi gotovo sav materijal
- ušicu sterilizirati
- ako se radi o **obrisku uzetom steriliziranim štapićem** →
- štapićem vučemo „cik-cak“ poteze po čitavoj površini Petrijeve ploče
- naciepljena hranjiva podloga stavlja se u termostat na 37°C kroz 24 sata
- očitati i opisati izrasle kolonije na hranjivoj podlozi

OPIS PREPARATA:

2. OPIS RADA: RAZRJEĐIVANJE MATERIJALA

- ovom metodom uzeti materijal se razmaže zavojitim potezom ušice po manjem dijelu podloge
- ušica se sterilizira plamenom
- naciepljivanje se nastavlja povlačenjem ušice po površinim susjednog dijela započinjući preko već naciepljenog područja
- sterilizirati ušicu
- postupak ponoviti nekoliko puta dok se postupno čitava površina hranjive podloge ne naciepi, a materijal ne razrijedi, a ušicu poslije svakog nanošenja sterilizirati

OPIS PREPATATA:

VJEŽBA 11.

UZGOJ I IDENTIFIKACIJA GLJIVICA

Gljivice se uzgajaju u laboratoriju na hranjivim podlogama najčešće da bi se postavila etiološka dijagnoza gljivične bolesti.

Većina hranjivih podloga proizvodi se tvornički.

Koristimo Sabouraudov agar kao gotovu sintetičku podlogu.

Pored hranilišta za uzgoj je potrebno osigurati optimalnu temperaturu, vlagu i Ph za uspješan uzgoj.

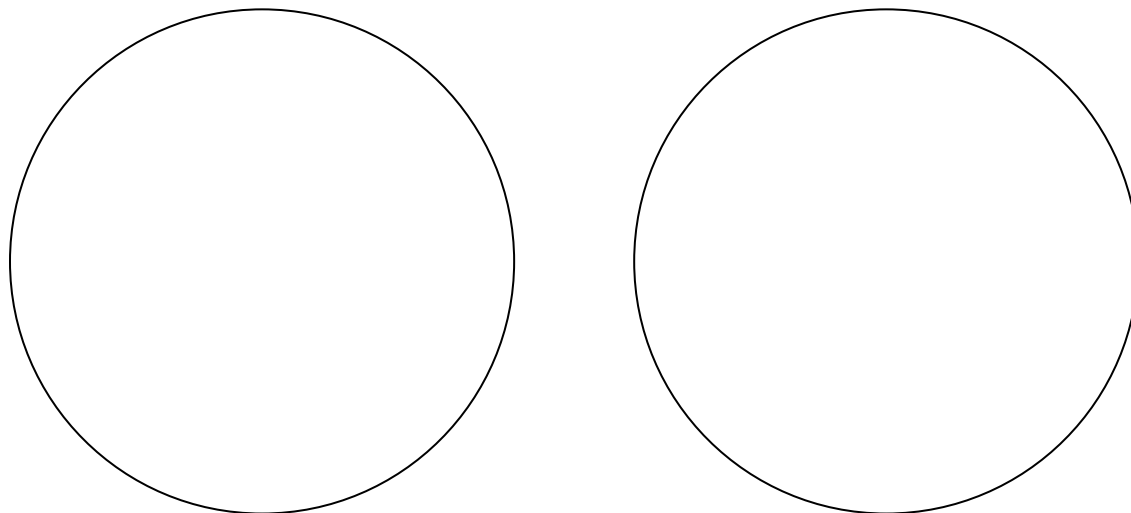
Najčešće se uzgajaju pri T od 37°C (kvasci) ili na sobnoj temperaturi (plijesni, dermatofiti).

Na čvrstim hranjivim podlogama izrastu kolonije specifičnog oblika, boja, izgleda.

OPIS RADA:

-nacijepiti hranjivu podlogu uzorkom npr. jogurta, plijesni s kruha ili po izboru učenika

MAKROSKOPSKI PREGLED IZRASLIH KOLONIJA NA PETRIJEVOJ PLOČI (NACRTATI):



OPIS PREPARATA (IZRASLE KOLONIJE NA HRANJIVOJ PODLOZI):

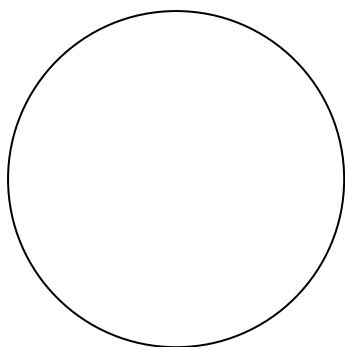
VJEŽBA 12.

IZRADA NEOBOJENOG VLAŽNOG-NATIVNOG PREPARATA GLJIVICA

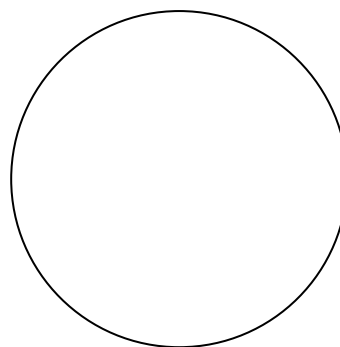
OPIS RADA:

- na predmetnicu nanijeti ezom ili kapljikom malo fiziološke otopine
- sterilnom ezom uzeti uzorak s izraslih kolonija na Sabouraud agaru
- uzorak suspendirati u kapljici NaCl-a
- pokriti pokrovnicom
- promatrati na malom, a potom na velikom povećanju mikroskopa
- po završetku vježbe obrisati i spremiti mikroskop

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 13.

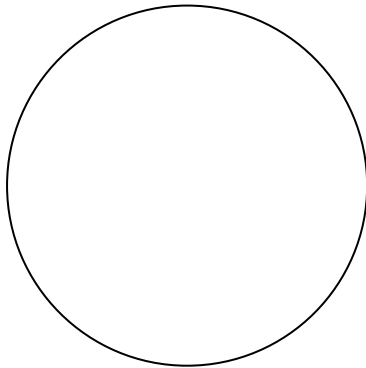
BOJENJE PREPARATA GLJIVICA PO LÖFFLERU

Iako se gljivice u nebojenim preparatima dobro uočavaju, lakše ih je uočiti obojene. Mogu se koristiti različiti postupci bojenja, a mi ćemo pokušati s Löfflerovim bojenjem.

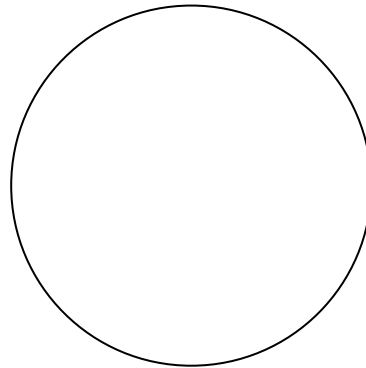
OPIS RADA:

- izraditi vlažni preparat (vježba 12.)
- učvrstiti preparat plamenom
- preliti otopinom metilenskog modrila
- ostaviti stajati pod bojom 3-5 min
- odliti boju
- preparat isprati vodom i osušiti
- mikroskopirati
- obrisati i spremi mikroskop

PREGLED PREPARATA:



10 X



40 X

OPIS PREPARATA:

VJEŽBA 14.

UZGOJ VIRUSA

Budući da se virusi mogu uzgajati samo u živim stanicama, za njihov uzgoj su potrebni:

- pokusne životinje (samo iznimno),
- oplođena kokošja jaja
- stanične kulture

Uzgajaju se radi postavljanja etiološke dijagnoze virusne zarazne bolesti ili infekcije.

Ako se koriste pokusne životinje (bijeli miš, zamorac, hrčak, kunić)

- ispitivani materijal se aplicira i/m, s/c, i/v ili drugdje
- ispitivani materijal mora biti profiltriran kroz bakteriološke filtre ili mu se dodaju antibiotici
- životinje moraju biti iz kontroliranih uzgoja
- važno oprezno i pažljivo postupati!!

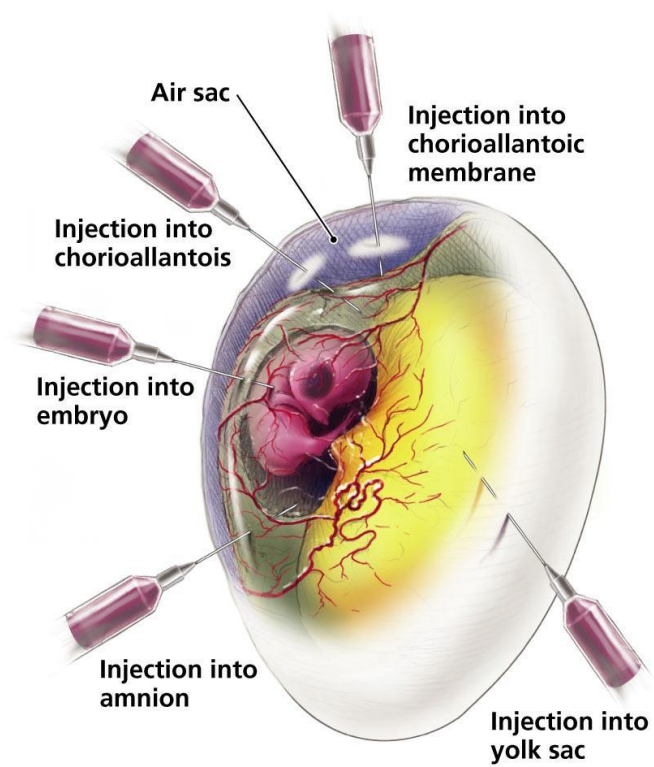
Oplođena kokošja jaja:

- brža, lakša i jeftinija metoda
- koriste se zametci stari 5-14 dana
- prije inokulacije materijala, potrebno je dezinficirati ljusku jajeta
- ljuska se probuši prikladnom iglom, svrdlom i kroz otvor se uštrca virusni materijal
- materijal se može inokulirati u različite dijelove (amnionska, žumanjčana, alantoisna vrećica...)
- nakon inokulacije, otvor treba zatvoriti ljepilom, staviti u inkubator
- nakon inkubacije (nekoliko dana), mogu se dokazati patološke promjene na zametku, serološkim pretragama...

Stanične kulture:

- nazivaju se stanice nekog tkiva uzgojene in vitro u hranjivoj tekućini
- pogodni za uzgoj svih virusa
- koriste se i za proizvodnju virusnih antigena i cjepiva

ODRADIT ĆEMO LAMPIRANJE KOKOŠJEG JAJA U SVRHU ODREĐIVANJA JE LI OPLOĐENO ILI NIJE:



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

DATUM PREGLEDA VJEŽBI I OCJENA:

