

mesni pepton	10 g
mesni ekstrakt	5 g
NaCl	3 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
destilirana voda (pH 7,3)	1000 ml

Ovoj se osnovnoj tekućoj hranjivoj podlozi mogu dodati i drugi sastojci, npr. glukoza, pa se na taj način pripremi glukozni bujon. Doda li se krvni serum (10 %) tada se takva hranjiva podloga naziva serumski bujon.

Hranjivom bujonom slična je po sastavu osnovna čvrsta hranjiva podloga koja se zove hranjivi agar. Jedina je razlika u tome što ona sadrži još i 15 grama agara. I njoj se mogu nakon sterilizacije dodati drugi sastojci. Dodatkom sterilnog krvnog seruma (10 %) pripremi se serumski agar. Često upotrebljavani krvni agar izrađuje se dodavanjem 5 % sterilne defibrinirane krvi nekih životinja ili čovjeka hranjivom agaru.

Neovisno o vrsti hranjive podloge, sve one moraju imati točno određeni pH, i to obično u rasponu od 7,0 do 7,6. Suhe hranjive podloge proizvode se tako da im je pH postojan, ali hranjivim podlogama koje se pripremaju svakog dana u mikrobiološkim laboratorijima potrebno je nakon izrade provjeriti pH i prema potrebi naručati ga na željenu vrijednost.

Sve hranjive podloge moraju biti sterilne, pa se nakon završene pripreme obavezno steriliziraju na jedan od poznatih načina (u autoklavu, u Kochovu loncu, filtracijom). O sterilizaciji hranjivih podloga vidi u poglavlju »Sterilizacija«.

Nakon završene sterilizacije hranjive se podloge aseptički razlijevaju iz većih staklenih posuda u manje (epruvete, Petrijeve zdjelice i dr.). Kao primjer navodimo izradu krvnog agara.

Nakon otapanja određene količine suhog hranjivog agara u destiliranoj vodi pri 100 °C ta se osnovna hranjiva podloga sterilizira u autoklavu. Zatim se podloga izvadi iz autoklava i ohladi do približno 50 °C. Tada joj se aseptički doda 5 % sterilne defibrinirane krvi i nakon miješanja

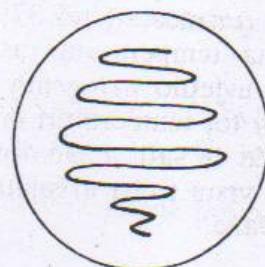
izlije u Petrijeve zdjelice u sloju debljine približno 3 mm. Napunjene zdjelice ostave se poklopljene pri sobnoj temperaturi da se podloga ohladi i agar ščvrsne. Potrebno je još samo osušiti površinu hranjive podloge i krvni agar je gotov za upotrebu.

4.1.2. Naciepljivanje hranjivih podloga

Pretraživani materijal (uzorak organa i sl.) naciepljuje se na hranjivu podlogu kako bi se iz njega izdvojile nazočne bakterije koje su uzrokovaile infekciju.

Površinu uzorka potrebno je prije naciepljivanja sterilizirati opaljivanjem plamenom ili užarenom lopaticom. Za bakteriološku pretragu uzima se nešto materijala iz dubine uzorka kroz sterilizirano mjesto na površini, najčešće Pasteurovom kapilarom, i razmaže mikrobiološkom ušicom po površini podloge u Petrijevoj zdjelici. Naciepljivanje se može izvesti na jedan od ova dva najčešće upotrebljavana načina: iscrpljivanjem ili razrjeđivanjem materijala.

Prvim načinom razmaže se malo materijala povlačenjem ušice u zavojitim (»cik-cak«) potezu po čitavoj površini hranjive podloge. Tako se s ušice iscrpi gotovo sav materijal (sl. 13). Drugim načinom materijal se razmaže također zavojitim potezom ušice po manjem dijelu podloge i zatim se ušica sterilizira u plamenu. Naciepljivanje se nastavi jednakim povlačenjem ušice po površini susjednog dijela podloge započinjući preko već naciepljenog područja i ušica potom



Sl. 13. Naciepljivanje čvrste hranjive podloge postupkom iscrpljivanja materijala

sterilizira. Isu se postupak razmazivanja i steriliziranja ušice ponovi nekoliko puta dok se postupno čitava površina hranjive podloge ne nacijepi, a materijal ne razrijedi (sl. 14).

Opisanim načinima nacijepljivanja materijala nastoji se postići takav rast kulture da kolonije bar na jednom dijelu hranjive podloge porastu odvojeno jedna od druge, da se mogu bolje razlikovati i pojedinačno precjepljivati.



Sl. 14. Nacijepljivanje čvrste hranjive podloge postupkom razrjeđivanja materijala



Sl. 15. Nacijepljivanje tekuće hranjive podloge mikrobiološkom ušicom

Tekuće hranjive podloge nacijepljuju se mikrobiološkom ušicom, Pasteurovom kapilarom ili pipetom tako, da se materijal unese u podlogu ispod površine tekućine (sl. 15).

4.2. Uzgoj bakterija

Nacijepljena hranjiva podloga stavlja se u inkubator (termostat) pri 37°C , jer je to optimalna temperatura rasta većine patogenih i uvjetno patogenih bakterija. Za uzgoj pri toj temperaturi dovoljna su 24 sata, rijede 48 sati, a samo manji broj bakterijskih vrsta treba užgajati nekoliko dana ili tjedana.

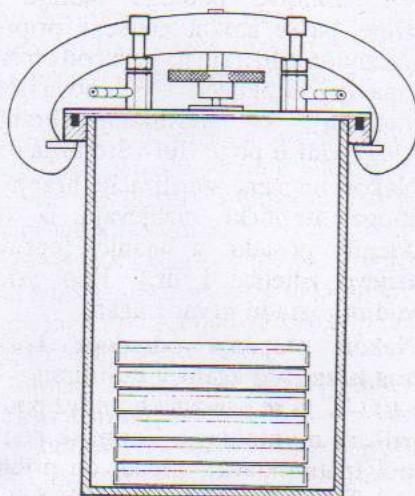
4.2.1. Uzgoj anaerobnih i mikroaerofilnih bakterija

Anaerobne bakterije zahtijevaju za svoj rast i razmnožavanje odsutnost atmosferskog kisika pa se moraju užgajati u tzv. anaerobnim uvjetima. Postoji više skupina postupaka kojima se kisik može ukloniti iz atmosfere u kojoj se užgajaju anaerobne bakterije.

1. Fizikalni postupci:

a) *Istiskivanje kisika grijanjem tekućih hranjivih podloga.* Anaerobni uvjeti u tekućim hranjivim podlogama mogu se postići grijanjem, jer pri tome kisik otopljen u tekućini izlazi iz podloge. Tada se hranjiva podloga naglo ohladi, nacijepi i prelije nepropusnim slojem sterilnog ulja (npr. parafinskog) u debljini od 2 do 3 cm, koje sprečava naknadni prodror zraka u podlogu.

b) *Uspostavljanje vakuma.* Za uzgoj anaerobnih bakterija često se upotrebljava McIntoshev lonac (sl. 16). U njega se stavljuju nacijepljene hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama, i lonac se potom hermetički zatvori poklopcom. Prikљučenom vakuum-sisaljkom isiše se zrak iz lonca i ventil na poklopcu zatvori. Tada se lonac stavi u inkubator, a manometar



Sl. 16. Shematski prikaz McIntosheva lonca

6. Određivanje osjetljivosti bakterija prema antibioticima i kemoterapeuticima

Učestala neosjetljivost ili otpornost bakterija prema antibioticima i kemoterapeuticima stvorila je potrebu da se iznadu laboratorijski postupci kojima bi se mogao točno odrediti odnos bakterija prema antimikrobnim tvarima. Tijekom vremena pronađeno je više postupaka, a od njih se u svagdanjem laboratorijskom radu najčešće upotrebljava difuzijski postupak. To je postupak kojim se u bakteriologiji (u novije vrijeme i u mikologiji) određuje osjetljivost bakterija prema antibioticima i kemoterapeuticima. Na osnovi rezultata koji se naziva antibiogram, odabire se najdjelatniji antimikrobni lijek i propisuje dnevna doza za liječenje bakterijske infekcije.

Difuzijski postupak određivanja osjetljivosti bakterija prema antibioticima i kemoterapeuticima izvodi se, radi ujednačenosti rezultata i njihove točnosti, prema međunarodno prihvaćenim preporukama kojima odgovara ICS postupak (International Collaborative Study) ili prema Bauer-Kirbyjevom postupku (taj je postupak prihvaćen u zemljama Sjeverne Amerike). Među ovim postupcima zapravo nema većih razlika, no kako je u europskim zemljama prihvaćen ICS postupak upoznat ćemo se s njim pobliže.

Difuzijski postupak izvodi se s čistom bakterijskom kulturom na čvrstoj hranjivoj podlozi posebna sastava. Takva podloga mora omogućiti nesmetano razmnožavanje i rast bakterija, a pritom ne smije ometati difundiranje antimikrobnog lijeka ili smanjivati njegovu djelatnost. ICS postupak propisuje upotrebu Mueller-Hintonova agara kojega sloj u Petrijevoj zdjelici mora biti debeo 4 mm ($\pm 0,1$ mm), jer debljina i sastav hranjive podloge mogu utjecati na rezultate postupka. To se posebice odnosi na količinu soli magnezija i kalcija koje djeluju na aktivnost strepto-

micina (i drugih antibiotika aminogliko zidne skupine), na prisutnost peptona kazeinskog hidrolizata koji smanjuju djelatnost sulfonamida i tiamfenikola, dok cistein inhibira aktivnost antibiotika penicilinske skupine. Mueller-Hintonov agar može se dodati krv, što je zapravo nužno određuje li se osjetljivost bakterija koje ne rastu na hranjivim podlogama u kojima nema krvi. Osnovnoj podlozi može se također dodati krvni serum, no velike količine serumskih bjelančevina vežu neke antibiotike i na taj način smanjuju njihovu difuziju.

Kultura bakterijskog soja kojem se određuje osjetljivost nacijepi se tako da se prelije po površini čvrste hranjive podloge. Naravno, prije se napravi suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini NaCl-a, a razrjeđenja se pripreme prema broju stanica u mililitru suspenzije. Broj stanica kojima se nacjepljuje hranjiva podloga također je određen, a ovisi o veličini kolonija i brzini rasta pretraživane bakterijske vrste. Optimalno je ono razrjeđenje pri kojem porastu kolonije toliko gusto da su blizu jedna drugoj ali se ipak ne dodiruju. Suspenzija bakterijskih stanica nanese se sterilnom pipetom na cijelu površinu hranjive podloge, a nakon preplavljanja suvišna se tekućina otpipetira. Zatim se poloutvorena Petrijeva zdjelica ostavi pokraj upaljenog plamenika da se površina hranjive podloge sasvim osuši.

Na suhu površinu hranjive podloge postave se dijagnostički kolutići (diskovi). To su kolutići od posebnog papira (sličnog filter papiru), promjera 5 do 7 milimetara, koji su prožeti određenom količinom neke antimikrobnog tvari. Tako, primjerice, dijagnostički kolutić tetraciklina sadrži 30 mcg, a ampicilina 10 mcg aktivne tvari imenovanog antibiotika. Kolutići s različitim antimikrobnim tvarima nose oznake radi

raspoznavanja (npr. kolutić penicilina G ima oznaku »P«, kolutić gentamicina oznaku »GM«, kolutić sulfonamida (sulfametoksazola) oznaku »SMZ« i slično).

Osim papirnatih dijagnostičkih kolutića postoje i dijagnostičke tablete. One su obično većeg promjera od kolutića, a tablete s različitim antibioticima međusobno se razlikuju bojom.

Dijagnostički kolutići ili tablete stavljuju se na površinu hranjive podloge sterilnom pincetom. Razmak između susjednih kolutića mora biti najmanje 3 cm. Osim toga kolutići moraju biti odmaknuti od ruba Petrijeve zdjelice bar 1,5 cm. Broj dijagnostičkih kolutića koji će se upotrijebiti ograničen je promjerom dna Petrijeve zdjelice, a izbor antibiotika i kemoterapeutika ovisi o rasponu (spektru) njihova djelovanja, osobinama pretraživanog bakterijskog soja i naravi infekcije što ju je uzrokovao.

Nakon stavljanja dijagnostičkih kolutića, koji se ne smiju naknadno premještati po podlozi, zaklopljena Petrijeva zdjelica ostavlja se pri sobnoj temperaturi 15 do 30 minuta i to se vrijeme naziva vrijeme difuzije. U tom vremenskom razmaku antimikrobna tvar iz dijagnostičkog kolutića difundira u hranjivu podlogu (otuda naziv difuzijski postupak).

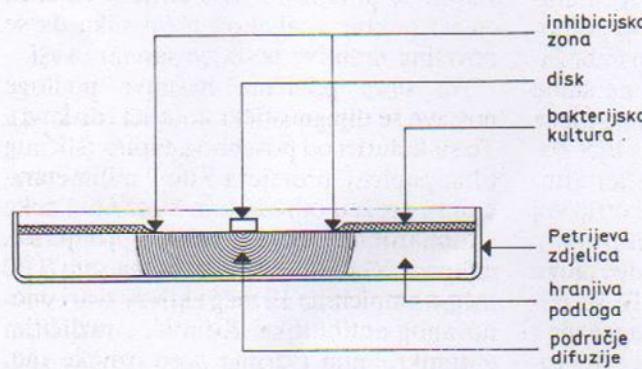
Difuzija teče radikalno u svim smjerovima, a po njezinu završetku količina antimikrobne tvari je najveća ispod kolutića, dok se s udaljenosću od njega postupno smanjuje. Područje u hranjivoj podlozi u koje je difundirala djelatna tvar naziva se područjem difuzije.

Kada istekne vrijeme difuzije, Petrijeva zdjelica se stavlja u inkubator u kojem je 37 °C, a uzgoj se obavlja u atmosferi koja odgovara pretraživanom bakterijskom soju, ovisno o tome da li je soj aeroban, mikroaerofilan ili anaeroban. I trajanje uzgoja ovisi o vrsti bakterije, ali se najčešće prekida nakon 16 do 24 sata.

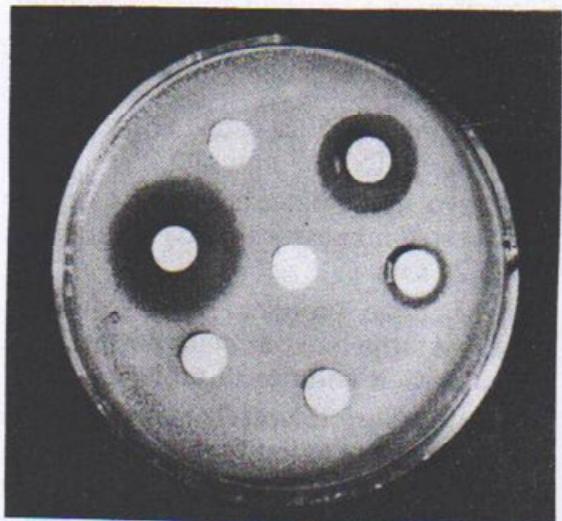
Oko pojedinih dijagnostičkih kolutića zapažaju se nakon uzgoja kružna područja u kojima nisu porasle bakterijske kolonije. Ta se područja nazivaju zone inhibicije rasta bakterija. Veličina inhibicijske zone ovisi o osjetljivosti pretraživanog bakterijskog soja prema određenoj antimikrobnoj tvari. Što je ta zona šira to je bakterija osjetljivija. Shematski i fotografijom to je prikazano na slikama 21. i 22.

S obzirom na činjenicu da se koncentracija antimikrobne tvari smanjuje s udaljenosću od kolutića, pojava široke inhibicijske zone znači da je mala količina kemoterapeutika bila dovoljna da zakoči razmnožavanje bakterijskih stanica. Promjer svake zone mjeri se točno kroz središte dijagnostičkog kolutića. Veličina zone izražava se u milimetrima, a u tu se vrijednost uključuje i promjer odgovarajućeg kolutića.

Ustanovljene vrijednosti uspoređuju se s poznatim kriterijima koji vrijede za svaki pojedini antibiotik ili kemoterapeutik. Veličina inhibicijske zone izražena u milimetrima odgovara određenom stupnju osjetljivosti (ili neosjetljivosti). U prilikama kada se osjetljivost bakterija provjerava pomoću papirnatih kolutića za većinu antibioticika i kemoterapeutika postoje tri stupnja.



Sl. 21. Shematski prikaz difuzijskog postupka



Sl. 22. Inhibicijske zone različita promjera oko tri od sedam upotrebljenih dijagnostičkih kolutića

Najveća osjetljivost označava se s tri križića (+++), brojkom 3 ili velikim slovom S, umjerena s ++, brojkom 2 ili velikim slovom I, a neosjetljivost znakom 0 ili velikim slovom R. Za neke kemoterapeutike postoje samo dva stupnja osjetljivosti (+++, 3 ili S i 0 ili R).

U prilikama kada se osjetljivost bakterijskih sojeva određuje pomoću tableta postoje također tri stupnja osjetljivosti. Najveća osjetljivost označava se velikim slovom S (kratica od sensitive), nešto manja osjetljivost slovom I (kratica od intermediate), a neosjetljivost velikim slovom R (kratica od resistant).

Križićima, brojkama ili slovima označava se osjetljivost pretraživanih bakterijskih sojeva u antibiogramima što ih izdaju bakteriološki laboratorijski. Prema antibiogramu odabire se antimikrobnii lijevi koji će se upotrijebiti za liječenje i određuje njegova doza. O izboru antibiotika ili kemoterapeutika prema podacima antibiograma odlučuje praktičar. Pritom ne smije uzbirati samo ustanovljenu osjetljivost bakterije, nego i farmakološke osobine antimikrobnog lijeka, moguću preosjetljivost pacijenta prema pojedinom antibiotiku ili kemoterapeutiku, narav i lokalizaciju bakterijske infekcije i slično.

Ako je uzročnik infekcije jako osjetljiv prema odabranom lijeku (+++, 3 ili S) propisuju se doze prema preporuci proizvođača antimikrobne tvari. Za liječenje infekcije uzrokovane slabije osjetljivosti bakterijskim sojem (++, 2 ili I) dnevna doza antibiotika ili kemoterapeutika može se povećati ili se takvi antimikrobeni lijekovi upotrebljavaju u liječenju infekcija na kraćim putovima ili infekcija probavnog sustava. Tim se putovima antimikrobne tvari izljučuju iz organizma, pa se baš na tih mjestima postižu znatne koncentracije djelatne tvari. Ako je bakterija neosjetljiva (0 ili R) prema nekom antibiotiku ili kemoterapeutiku, on se ne smije upotrijebiti za liječenje.

6.1. Izvođenje difuzijskog postupka

1. Difuzijski postupak se izvodi na Mueller-Hintonovu agaru kojega je sloj Petrijevoj zdjelici deboj 4 mm.

2. Površina hranjive podloge nacjepljuje se pipetom, prelijevanjem suspenzije čiste kulture pretraživanog bakterijskog soja u sterilnoj fiziološkoj otopini NaCl-a.

Način pripremanja suspenzije:

a) Za bakterije porodice Enterobacteriaceae, roda *Bacillus* i *Pseudomonas* bakteriološkom ušicom dotaknuti desetak kolonija i zahvaćene bakterijske stanicu suspendirati u 5 ml sterilne fiziološke otopine NaCl-a, a zatim jednu kapljicu suspenzije prenijeti u novih 5 ml sterilne fiziološke otopine. Ta se suspenzija upotrebljava za prelijevanje hranjive podloge

b) Za bakterije roda *Staphylococcus*, *Moraxella* bakteriološkom ušicom dotaknuti desetak kolonija i zahvaćene bakterijske stanice suspendirati u 5 ml fiziološke otopine NaCl-a, a zatim 5 kapljica suspenzije prenijeti u novih 5 ml sterilne fiziološke otopine. Tom se suspenzijom prelijeva površina čvrste hranjive podloge.

c) Za bakterije roda *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Pasteurella*, *Bordetella*, *Erysipelothrix*, *Actinobacillus* i *Listeria*

mikrobiološkom ušicom dvaput provući kroz kolonije na čvrstoj hranjivoj podlozi i zahvaćene stanice suspendirati u 5 ml sterilne fiziološke otopine NaCl-a. Ta se suspenzija bakterijskih stanica upotrebljava za prelijevanje hranjive podloge.

3. Suvišna tekućina na površini nacijepljene podloge se otpipetira.

4. Poluotvorena Petrijeva zdjelica ostavlja se uz upaljeni plamenik da se površina hranjive podloge sasvim osuši.

5. Na suhu površinu hranjive podloge stavljuju se sterilnom pincetom dijagnostički kolutići ili tablete s različitim kemoterapeuticima (medusobno udaljeni 3 cm, a od ruba Petrijeve zdjelice 1,5 cm). Prvi dodir kolutića s hranjivom podlogom mora biti istodobno i posljednji, tj. kolutići se ne smiju premještati po površini podloge.

a) Izvodi li se difuzijski postupak u Petrijevoj zdjelici promjera 10 cm najveći broj kolutića je 6.

b) Izvodi li se difuzijski postupak u Petrijevoj zdjelici promjera 12 cm najveći broj kolutića je 12.

6. Petrijeva zdjelica ostavi se pri sobnoj temperaturi 15 do 30 minuta.

7. Uzgoj nacijepljene bakterijske kulture obavlja se u inkubatoru pri 37 °C tijekom 16 do 24 sata.

8. Mjerjenje promjera zona inhibicije rasta bakterija uokolo svih postavljenih dijagnostičkih kolutića ili tableta.

9. Stupanj osjetljivosti bakterijskog soja prema pojedinoj antimikrobnoj tvari određuje se usporedbom veličine inhibicijske zone s odgovarajućim kriterijima. U primjama kada se osjetljivost određuje pomoću papirnatih kolutića što ih u suradnji s tvrtkom Becton Dickinson proizvodi Imunološki zavod u Zagrebu upotrebljavaju se kriteriji izneseni u tablici 2.

Istražuje li se osjetljivost bakterija pomoću dijagnostičkih tableta, stupanj os-

Tablica 2. Kriteriji na osnovi kojih se određuje stupanj osjetljivosti bakterijskog soja prema nekim antibioticima i kemoterapeuticima

Antimikrobnna tvar	Oznaka na kolutiću	Stupanj osjetljivosti		
		promjer inhibicijske zone (u mm)		
		S	I	R
amikacin	AN-30	16	15 – 16	15
ampicilin				
– za Enterobacteriaceae	AM-10	13	12 – 13	12
– za <i>Staphylococcus sp.</i>	AM-10	28	—	29
– za <i>Streptococcus sp.</i>	AM-10	29	22 – 29	22
cefaleksin	CN-30	17	15 – 17	15
cefalonitin	CF-30	17	15 – 17	15
eritromicin	E-15	17	14 – 17	14
gentamicin	GM-10	14	13 – 14	13
karbenicilin				
– za <i>P. aeruginosa</i>	CB-100	16	14 – 16	14
kloksacilin	CX-5	12	11 – 12	11
kloramfenikol	C-30	17	13 – 17	13
linkomicin	L-15	23	19 – 23	19
nalidiksična kiselina	NA-30	18	14 – 18	14
penicilin G				
– za <i>Staphylococcus sp.</i>	P-10	28	—	29
– za <i>Streptococcus sp.</i>	P-10	27	20 – 27	20
– za ostale bakterije	P-10	23	13 – 23	13
sulfametoksazol	SMZ	15	11 – 15	11
tetraciklin	TE-30	18	15 – 18	15

jetljivosti se odreduje upotrebom drugih kriterija. Oni su jednostavniji jer su jednaki za sve antimikrobne tvari. Prema njima najveći stupanj osjetljivosti (S) imaju bakterijski sojevi kojih su inhibicijske zone promjera 28 mm ili veće. Malo manju os-

jetljivost prema nekom antibiotiku ili kemoterapeutiku (I) imaju sojevi kojih je inhibicijska zona promjera 22 do 27 mm, a neosjetljivi (R) su bakterijski sojevi kojima je promjer inhibicijske zone velik 21 mm ili manje.