

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vesna MARČIČ

**VPLIV HOMOGENIZACIJE KUŽNIN IZ SPODNJIH  
DIHAL Z DITIOTREITOLOM NA REZULTATE  
BAKTERIOLOŠKE PREISKAVE NA PATOGENE  
BAKTERIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vesna MARČIČ

**VPLIV HOMOGENIZACIJE KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL Z  
DITIOTREITOLOM NA REZULTATE BAKTERIOLOŠKE  
PREISKAVE NA PATOGENE BAKTERIJE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IMPACT OF HOMOGENIZATION OF LOWER RESPIRATORY  
TRACT SPECIMENS WITH DITHIOTHREITOL ON THE RESULTS  
OF GRAM STAIN AND CULTURE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

S tem diplomskim delom zaključujem univerzitetni študij mikrobiologije. Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij (RSP) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji 29. 5. 2009 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med., in za recenzentko prof. dr. Manico Mueller-Premru, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Manica Mueller-Premru, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Manica MUELLER-PREMRU, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vesna Marčič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.61:616.2-078(043)=163.6
- KG kužnine dihal/sputum/trahealni aspirat/priprava vzorcev/homogenizacija/  
mikrobiološka diagnostika/mukolitiki/ditiotreitol/barvanje po Gramu/*Haemophilus  
influenzae*
- AV MARČIČ, Vesna
- SA SEME, Katja (mentorica)/MUELLER-PREMRU, Manica (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije
- LI 2009
- IN VPLIV HOMOGENIZACIJE KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL Z  
DITIOTREITOLOM NA REZULTATE BAKTERIOLOŠKE PREISKAVE NA  
PATOGENE BAKTERIJE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 45 str., 7 pregl., 15 sl., 19 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Vzorci iz spodnjih dihal so pogosto nehomogeni, viskozni, gnojni ali krvavi in bakterije v njih niso enakomerno porazdeljene. Ker lahko neenakomerna porazdeljenost bakterij v vzorcu bistveno vpliva na rezultat bakteriološke preiskave in tako povzroči lažno negativne rezultate, smo v raziskavi želeli ugotoviti, ali homogenizacija vzorcev iz spodnjih dihal z ditiotreitolom omogoča enostavno izdelavo enakomernih razmazov za barvanje po Gramu in s tem olajša in poveča učinkovitost mikroskopskega pregleda razmazov ter omogoča tudi večjo učinkovitost osamitve patogenih bakterijskih vrst. Želeli smo tudi preveriti v preteklosti opisan protibakterijski učinek ditiotreitola na vrsto *Haemophilus influenzae*. V raziskavo smo vključili 96 kužnin iz spodnjih dihal, ki smo jih najprej obdelali po ustaljenem protokolu bakteriološke preiskave, nato pa homogenizirali z ditiotreitolom in tudi iz homogeniziranih vzorcev naredili razmaze za barvanje po Gramu in jih nacepili na enaka gojišča kot nehomogenizirane. S primerjavo rezultatov mikrobiološkega pregleda kultur homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin smo ugotovili, da obdelava kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom ne poveča učinkovitosti rezultatov pri osamitvi patogenih bakterijskih vrst. Homogenizacija vzorcev z ditiotreitolom je omogočila izdelavo enakomernih razmazov za barvanje po Gramu, lažje in bolj učinkovito mikroskopsko pregledanje ter za 8,3 % povečala občutljivost mikroskopskega pregleda. V 5 vzorcih smo z mikroskopskim pregledom razmazov videli mikroorganizme samo v razmazih homogeniziranih kužnin, ne pa v razmazih nehomogeniziranih kužnin, medtem ko smo v 3 vzorcih v razmazih homogeniziranih kužnin videli več različnih tipov mikroorganizmov kot v razmazih nehomogeniziranih kužnin. V drugem delu raziskave, kjer smo ugotavljali protibakterijsko delovanje ditiotreitola na patogeno bakterijsko vrsto *H. influenzae*, smo ugotovili, da ditiotreitol nima protibakterijskega učinka na to patogeno vrsto.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.61:616.2-078(043)=163.6
- CX respiratory tract samples/sputum/tracheal aspirate/sample preparation/  
microbiological diagnostics/homogenization/mucolytic agents/dithiothreitol/Gram  
stain/*Haemophilus influenzae*
- AU MARČIČ, Vesna
- AA SEME, Katja (supervisor)/MUELLER-PREMRU, Manica (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology
- PY 2009
- TI IMPACT OF HOMOGENIZATION OF LOWER RESPIRATORY  
TRACT SPECIMENS WITH DITHIOTHREITOL ON THE RESULTS OF  
GRAM STAIN AND CULTURE
- DT Graduation Thesis (University Studies)
- NO X, 45 p., 7 tab., 15 fig., 19 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The samples from lower respiratory tract are often non-homogenous, mucoid, purulent or bloody and the bacteria in them are not uniformly distributed. Due to the fact that not uniform distribution of bacteria in the sample can have a great impact on the results of the bacteriological examination and can therefore cause false negative results the aim of the study was to find out whether the homogenization of the samples from lower respiratory tract with dithiothreitol enables accurate, representative cultures and smears for Gram staining. In addition, in the past described antibacterial activity of the dithiothreitol against *Haemophilus influenzae* was verified. 96 lower respiratory tract samples were included in the study. They were at first processed according to the established bacteriological protocol and then homogenized with dithiothreitol. Smears for Gram staining were prepared from all homogenized samples and they were plated at the same culture media as the non-homogenized samples. Comparison of the results of the homogenized and non-homogenized samples showed that homogenization of the lower respiratory tract with dithiothreitol did not increase the efficiency and sensitivity of culture. The homogenization of the samples with dithiothreitol enabled easier preparation of smears for Gram staining. The microscopy was easier and more efficient and the sensitivity of the microscopic examination was increased by 8.3 %. In five samples microorganisms were seen only in the smears prepared from homogenized samples and not in the smears prepared from the non-homogenized samples. On the other hand, in three homogenized samples more different types of microorganisms were seen as in the smears from the non-homogenized samples. The results of the second part of the study didn't confirm previously described antibacterial activity against *H. influenzae*.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VIII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	3
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 BAKTERIOLOŠKA PREISKAVA KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL.....	4
2.1.1 Barvanje po Gramu .....	4
2.1.2 Način odvzema in transport kužnin .....	4
2.1.3 Vrednotenje rezultatov .....	5
2.1.4 Pomanjkljivosti mikroskopskega pregleda kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih po Gramu .....	6
2.2 HOMOGENIZACIJA .....	6
2.3 MUKOLITIKI.....	7
2.3.1 Ditiotreitol.....	7
2.3.2 N-acetilcistein .....	8
2.3.3 Uporaba mukolitikov v mikrobiološki diagnostiki .....	8
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>9</b>
3.1 MATERIALI.....	9
3.2 METODE.....	10
3.2.1 Postopek obdelave kužnin iz spodnjih dihal.....	10
3.2.1.1 Priprava razmazov nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih po Gramu .....	11
3.2.1.2 Nacepitev nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča.....	11
3.2.1.3 Priprava delovne raztopine ditiotreitola.....	12

3.2.1.4	Homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolum .....	12
3.2.1.5	Priprava razmazov homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih po Gramu .....	12
3.2.1.6	Nacepitev homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča .....	13
3.2.1.7	Vrednotenje rezultatov .....	15
3.2.1.8	Občutljivost bakteriološke diagnostične metode .....	15
<b>3.2.2</b>	<b>Protibakterijski učinek ditiotreitola na bakterijsko vrsto <i>H. influenzae</i></b> .....	<b>16</b>
3.2.2.1	Določanje gostote mikrobne suspenzije .....	16
3.2.2.2	Določanje protibakterijskega učinka ditiotreitola na bakterijsko vrsto <i>H. influenzae</i> .....	17
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>19</b>
4.1	OSAMITEV PATOGENIH IN/ALI POTENCIALNO PATOGENIH BAKTERIJ IZ KULTURE IN RAZMAZI KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL, OBARVANI PO GRAMU .....	22
4.2	RAZMAZI KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL, OBARVANI PO GRAMU .....	26
4.3	PROTIBAKTERIJSKI UČINEK DITIOTREITOLA NA BAKTERIJSKO VRSTO <i>H. INFLUENZAE</i> .....	33
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>35</b>
5.1	RAZPRAVA .....	35
5.2	SKLEPI .....	40
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>43</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrsta, število in delež vzorcev, vključenih v raziskavo.....	19
Preglednica 2: Število in delež glede na vrsto in makroskopski opis kužnin iz spodnjih dihal, vključenih v raziskavo.....	20
Preglednica 3: Število in delež izolatov, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo.....	23
Preglednica 4: Vrsta, število in delež izolatov patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo.....	24
Preglednica 5: Število, delež in vrsta ujemanja/neujemanja rezultatov osamitve patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev.....	26
Preglednica 6: Število, delež in vrsta ujemanja/neujemanja rezultatov razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, obarvanih po Gramu.....	27
Preglednica 7: Koncentracije bakterije <i>H. influenzae</i> (CFU/ml) v izhodnih suspenzijah, po obdelavi z ditiotreitolum in v negativnih kontrolah.....	34



## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz obdelave kužnin iz spodnjih dihal .....	14
Slika 2: Število in opis izmečkov in trahealnih aspiratov .....	20
Slika 3: Makroskopski izgled trahealnega aspirata: a) nehomogeniziran viskozni vzorec; b) homogeniziran vzorec .....	21
Slika 4: Makroskopski izgled izmečka: a) nehomogeniziran krvavo viskozni vzorec; b) homogeniziran vzorec .....	21
Slika 5: Makroskopski izgled izmečka: a) nehomogeniziran gnojni vzorec; b) homogeniziran vzorec .....	21
Slika 6: Makroskopski izgled trahealnega aspirata: a) nehomogeniziran nehomogen vzorec; b) homogeniziran vzorec .....	22
Slika 7: Število osamljenih izolatov iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo .....	23
Slika 8: Število in vrsta osamljenih izolatov iz vzorcev, vključenih v raziskavo .....	25
Slika 9: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 12 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu pozitivni koki v skupinah .....	28
Slika 10: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 53 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidne blastospore.....	29
Slika 11: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 64 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran izmeček; desno – homogeniziran izmeček in vidni po Gramu pozitivni diplokoki.....	30
Slika 12: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 68 pod 1000-kratno povečavo: a) nehomogeniziran trahealni aspirat; b) homogeniziran trahealni aspirat in vidna po Gramu pozitivna bacila; c) homogeniziran trahealni aspirat in viden po Gramu negativen bacil ter po Gramu pozitivna diplokoka .....	31
Slika 13: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 76 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu pozitivni koki v skupinah; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu pozitivni koki v skupinah ter blastospore.....	32

Slika 14: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 87 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu negativni bacili; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu negativni bacili ter blastospore .....33

Slika 15: Koncentracije bakterije *H. influenzae* (log CFU/ml) v izhodnih suspenzijah, po obdelavi z ditiotreitolom in v negativnih kontrolah.....34

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	ang. The American Type Culture Collection
CFU	ang. colony forming units
CH-MRSA	kromogeno selektivno diferencialno gojišče za MRSA
CNA	agar s kolistinom in nalidiksinsko kislino
ČA	čokoladni agar
DDT	ditiotreitolum
KA	krvni agar
MCC	MacConkey agar
McF	McFarland
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporen <i>S. aureus</i>
TIO	tioglikolatni bujon

## 1 UVOD

Za diagnostiko okužb spodnjih dihal, ki dandanes predstavljajo enega najpogostejših vzrokov, zaradi katerih bolniki poiščejo pomoč pri zdravniku, uporabljamo neinvazivno in invazivno odvzete kužnine. Med neinvazivno odvzete kužnine štejemo izmeček (sputum), inducirani izmeček in trahealni aspirat. Med invazivno odvzete kužnine štejemo bronhoskopsko odvzete kužnine: bronhoalveolarni izpirek – BAL, izpirek bronhija, odvzem z zaščitenim katetrom ali zaščiteni ščetko, in plevralni punktat (Tomič, 2008).

V bakteriološki diagnostiki okužb spodnjih dihal najpogosteje uporabljamo preiskavo kužnin, odvzetih s področja spodnjih dihal, na patogene bakterije, ki obsega pregled razmaza kužnine, obarvanega po Gramu in njihovo kulturo (Tomič, 2008; Tomič in Seme, 2003). S to preiskavo ne moremo dokazati mikobakterij, legionel, klamidij in mikoplazem, ki so tudi pomembni povzročitelji okužb dihal. Ostale diagnostične metode, ki so tudi na voljo za opredeljevanje povzročiteljev okužb spodnjih dihal, so hemokultura, dokaz antigena v kužnini, serološke metode in molekularne mikrobiološke metode (Tomič in Seme, 2003).

S pregledom razmaza kakovostnega izmečka, obarvanega po Gramu, lahko hitro razkrijemo prisotnost najverjetnejšega povzročitelja okužb spodnjih dihal, saj je ta mikrobiološka metoda, s katero si lahko pomagamo tako pri ambulantni kot bolnišnični obravnavi bolnika z okužbo spodnjih dihal, zagotovo najcenejša, najhitrejša in najpreprostejša (Tomič, 2008; Tomič in Seme, 2003).

Najpogostejša kužnina, ki jo v medicinskih bakterioloških laboratorijih pregledujemo pri sumu na okužbo spodnjih dihal, je izmeček. Izmeček je zelo nehomogen vzorec, ki ga sestavljajo vnetni eksudat iz spodnjih dihalnih poti, slina in drug material, pridobljen pri prehodu kužnine skozi žrelo in usta (Tomič in Šorli, 2002). Že pred več kot 50 leti je bilo dokazano, da bakterije v njem niso enakomerno porazdeljene, kar lahko bistveno vpliva na rezultat preiskave (May, 1953). Osnovne težave pri diagnostiki okužb spodnjih dihal so odvzem kakovostne kužnine, ustreznost laboratorijska obdelava kužnin in hitro posredovanje

rezultatov mikrobioloških preiskav zdravniku (Tomič, 2008). S pregledom razmaza izmečka, obarvanega po Gramu, mikrobiolog oceni kakovost vzorca in se odloči, ali je kultura izmečka sploh smiselna. Ustreznost izmečka ocenimo glede na vsebnost ploščatega epitela pri 100-kratni mikroskopski povečavi s svetlobnim mikroskopom. S prisotnostjo ploščatega epitela ugotavljamo kontaminacijo izmečka. S prisotnostjo polimorfonuklearnih levkocitov ocenjujemo gnojnost izmečka pri isti povečavi (Tomič in Seme, 2003). Prav tako se uporabljajo enaki kriteriji za oceno ustreznosti pri trahealnem aspiratu, ki ga namesto izmečka odvezamemo pri bolnikih na umetnem predihavanju (Tomič, 2008).

Da bi se izognili lažno negativnim rezultatom, moramo za izvedbo medicinsko in ekonomsko najprimernejše oziroma najustreznejše mikrobiološke diagnostike poznati najverjetnejše povzročitelje pri posameznih vrstah okužb spodnjih dihal in najprimernejše mikrobiološke diagnostične teste zanje. Prav tako je pomembno znanje o pravilnih načinih odvzema posameznih vrst kužnin, načinu in trajanju transporta oziroma o pogojih shranjevanja kužnin ter dobra povezava med kliniki in kliničnimi mikrobiologi (Tomič, 2008). Ena izmed možnosti, da bi se izognili lažno negativnim rezultatom, je tudi priporočilo vzorčenja več makroskopsko najbolj gnojnih delov posameznega izmečka, kar zahteva posebno izurjenost in veliko pozornost laboratorijskega delavca, ki obdeluje vzorec in lahko vodi v veliko variabilnost rezultatov, kadar je v obdelavo kužnin iz spodnjih dihal vključenih veliko laboratorijskih delavcev (May, 1953; Hammerschlag in sod., 1980). Druga možnost za zmanjšanje lažno negativnih rezultatov je homogenizacija kužnine z enim od mukolitičnih sredstev. Za homogenizacijo izmečkov se največkrat priporoča uporaba ditiotreitola (DDT), saj razen na *Haemophilus influenzae* zanj ni bilo ugotovljenega protibakterijskega delovanja (Hammerschlag in sod., 1980).

## 1.1 NAMEN DELA

V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali obdelava vzorcev iz spodnjih dihal z ditiotreitolom omogoča izdelavo enakomernih razmazov za barvanje po Gramu in s tem lažje in bolj učinkovito mikroskopiranje teh kužnin ter učinkovitejšo osamitev patogenih bakterijskih vrst v primerjavi z nehomogeniziranimi vzorci. Želeli smo tudi preveriti protibakterijski učinek ditiotreitola na vrsto *H. influenzae*.

Na osnovi podatkov iz literature smo pričakovali, da bomo s homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom omogočili enostavno izdelavo enakomernih razmazov za barvanje po Gramu in s tem olajšali in povečali učinkovitost mikroskopskega pregleda razmazov ter dosegli tudi večjo učinkovitost osamitve patogenih bakterijskih vrst. Pričakovali smo tudi, da bomo potrdili protibakterijski učinek ditiotreitola na *H. influenzae* in ugotovili kako velik je.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 BAKTERIOLOŠKA PREISKAVA KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL**

#### **2.1.1 Barvanje po Gramu**

Barvanje po Gramu je diferencialno barvanje, s katerim razlikujemo dva tipa bakterijskih celic, in sicer po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterijske celice (Murray in sod., 1998). Ta metoda je ena najpomembnejših tehnik barvanja v mikrobiologiji, ki jo je zasnoval danski bakteriolog Hans Christian Gram leta 1884 (Kotnik, 2002). Barvanje bakterij po Gramu temelji na razliki v njihovi zgradbi celične stene. Celična stena po Gramu pozitivnih bakterij ima večjo vsebnost peptidoglikana in manjšo vsebnost lipidov kot po Gramu negativne bakterije. Ker imajo po Gramu pozitivne bakterije veliko peptidoglikana, zadržijo barvilo kristal vijolično in lugol ter jih z organskim topilom aceton alkoholom ne moremo razbarvati. Po Gramu pozitivne bakterije se obarvajo modro-vijolično. Po Gramu negativne bakterije imajo malo peptidoglikana, zato se z aceton alkoholom razbarvajo. Ker jih po razbarvanju obarvamo s safraninom, so po Gramu negativne bakterije rdeče barve (York, 2004; Murray in sod., 1998).

#### **2.1.2 Način odvzema in transport kužnin**

Kadar gre za okužbo spodnjih dihal, mora bolnik oddati izmeček za bakteriološko preiskavo z globokim izkašljanjem neposredno v sterilno posodico. Pomembno je, da se vzorec vzame pred začetkom antibiotičnega zdravljenja. Pred izkašljanjem si mora bolnik umiti zobe s ščetko brez zobne kreme, in če ima zobno protezo, jo mora odstraniti, da s tem prepreči kontaminacijo vzorca. Z grgranjem vode si najprej spere žrelo in usta. Pomembno je, da bolnik dobi natančna navodila za pravilen postopek za pridobitev izmečka. Če se bolnik ne more odkašljati, se v tem primeru uporabi inducirani izmeček. Izmeček v tesno zaprti posodici, ki je pravilno opremljen z bolnikovimi podatki, je potrebno skupaj z napotnico, kjer so osnovni podatki o bolniku, klinična diagnoza in morebitno predhodno antibiotično zdravljenje čim hitreje dostaviti v mikrobiološki laboratorij. Če transport kužnine ni mogoč v manj kot dveh urah po odvzemu, vzorec shranimo v hladilniku pri 4

°C in ga takoj, ko je mogoče, dostavimo v mikrobiološki laboratorij (Tomič in Seme, 2003).

### 2.1.3 Vrednotenje rezultatov

Z mikroskopskim pregledom ocenjujemo ustreznost vzorca iz spodnjih dihal in prisotnost potencialnih patogenov, na osnovi česar se mikrobiolog odloči, ali je kultura vzorca sploh smiselna. Ustreznost vzorca se opredeli z določanjem števila polimorfonuklearnih levkocitov in ploščatih epitelnih celic na vidno polje pri 100-kratni povečavi svetlobnega mikroskopa. Vzorec je kakovosten, kadar je več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov in manj kot 10 ploščatih epitelnih celic na vidno polje (York, 2004; Tomič in Seme, 2003). Pri kakovostnih vzorcih nato obarvane razmaze mikroskopiramo pod 1000-kratno povečavo in ugotavljamo prisotnost, način barvanja po Gramu, ocenimo obliko in način urejanja bakterij (Murray in sod., 1998). Rezultat mikroskopskega pregleda razmaza vzorca, obarvanega po Gramu, je na voljo že dvajset minut po prejetju vzorca v laboratorij (Tomič in Šorli, 2002).

Kadar v razmazu, obarvanem po Gramu, prevladuje ena značilna bakterijska oblika, je verjetnost pravilne opredelitve povzročitelja velika. Če torej v razmazu, obarvanem po Gramu, prevladujejo po Gramu pozitivni diplokokki, pričakujemo prisotnost bakterije *Streptococcus pneumoniae*, če prevladujejo po Gramu negativni kokobacili, pričakujemo prisotnost bakterije *H. influenzae* in pri po Gramu negativnih diplokokkih pričakujemo prisotnost bakterije *Moraxella catarrhalis*. Prevladujoč značilen morfotip v razmazu, obarvanem po Gramu, se večinoma ujema z rezultatom kulture izmečka. Zato je rezultat pregleda razmaza, obarvanega po Gramu, v veliko pomoč lečečemu zdravniku pri odločanju o začetnem antibiotičnem zdravljenju (Tomič in Šorli, 2002; Gleckman in sod., 1988; Roson in sod., 2000).

Da bi osamili najverjetnejšega povzročitelja bakterijske okužbe spodnjih dihal, zasadimo ustrezne vzorce na primerna bakteriološka gojišča in jih inkubiramo v ustreznih pogojih (Tomič in Seme, 2003).



#### **2.1.4 Pomanjkljivosti mikroskopskega pregleda kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih po Gramu**

V razmazu kužnine bakterije s svetlobnim mikroskopom vidimo, če so prisotne v koncentraciji vsaj  $10^5$  CFU (iz ang. colony forming units)/ml kužnine (Tomič, 2008). Pomembno je, da rezultate kulture vzorca vedno interpretiramo v skladu z rezultati pregleda razmaza, obarvanega po Gramu, in v povezavi z anamnezo, klinično sliko bolnika ter rezultati drugih mikrobioloških in nemikrobioloških preiskav (Tomič in Seme, 2003). Nekatere po Gramu pozitivne bakterije, ki so rasle v kulturi več kot 24 ur ali v prisotnosti antibiotikov, se lahko obarvajo lažno po Gramu negativno. Predhodno antibiotično zdravljenje lahko prepreči rast respiratornih patogenih bakterij, kot so *S. pneumoniae*, *H. influenzae* in *M. catarrhalis*, in privede do rasti bakterij, ki kolonizirajo zgornja dihalna, kot so po Gramu negativne bakterije in *Staphylococcus aureus*, ki pa so lahko v določenih primerih tudi povzročitelji okužb spodnjih dihal (Tomič in Seme, 2003).

Pomanjkljivosti pri vrednotenju mikroskopskega pregleda razmazov iz kužnine ali kulture so posledica neustrezne priprave preparata (nerazmaščena stekelca, predebel preparat, pregrevanje preparata pri fiksaciji), slabe kvalitete barvil in nepravilne izvedbe barvanja (slabo obarvane ali preveč razbarvane po Gramu pozitivne bakterije, slabo razbarvane po Gramu negativne bakterije, neenakomerno obarvan preparat, precipitat na preparatu, premočno spiranje) (York, 2004).

## **2.2 HOMOGENIZACIJA**

Izmeček je večinoma viskozen, saj gre za izkašljano sluzno gmoto, ki pogosto vsebuje tudi slino, izločke iz žlez zgornjih dihal, sluz iz globljih predelov dihal in ust ter različne mikroorganizme (Gubina in Ihan, 2002). Pred več kot 50 leti je bilo dokazano, da bakterije v njem niso enakomerno porazdeljene, kar bistveno vpliva na rezultat kulture (May, 1953). S homogenizacijo kužnine z enim od mukolitičnih sredstev se lahko tako izognemo lažno negativnim rezultatom (Hammerschlag in sod., 1980).

Homogenizacija je postopek, kjer z mukolitičnim sredstvom omogočimo, da iz nehomogeniziranega vzorca dobimo homogeniziran popolnoma utekočinjen vzorec. Omogočiti moramo intenzivno mešanje kužnine in mukolitičnega sredstva, ki mora delovati 15 minut. Pri mikrobiološki diagnostiki mikobakterij se uporablja natrijev hidroksid (NaOH) kot mukolitik, vendar ta ni primeren za obdelavo kužnin v diagnostiki drugih patogenih bakterij, saj jih uniči. Pri utekočinjenju in homogenizaciji izmečka so ugotovili, da tudi mukolitiki, kot so N-acetil-L-cistein (NALC), ditiotreitol in ostali proteolitični encimi delujejo učinkovito in omogočijo bolj učinkovito osamitev mikobakterij (Pfyffer, 2007).

Obstaja več mehanskih in kemičnih načinov homogenizacije oziroma utekočinjenja izmečka. Pri mehanski homogenizaciji ne pride do uničenja beljakovin in peptidov. Za kemični način homogenizacije je značilno, da uniči beljakovine in peptide s cepitvijo peptidnih vezi (Grebski in sod., 2001). Osnovna pomanjkljivost, ki preprečuje širšo uporabo homogenizacije izmečkov, je dolgotrajnost postopka (Hammerschlag in sod., 1980).

## 2.3 MUKOLITIKI

Mukolitiki ali ekspektoransi so snovi oziroma zdravila, ki raztapljajo sluz in se tako uporabljajo kot zdravila za lažje izkašljevanje viskoznega izmečka in v različnih laboratorijih za utekočinjenje ali homogenizacijo kužnin iz dihal. Ekspektoranse razdelimo po mehanizmu delovanja na sekretolitične in sekretomotorične. Sekretolitični ekspektoransi povečajo sekrecijo in zmehčajo izločke pri vnetjih v dihalih ter tako olajšajo izkašljevanje. Prav tako sekretomotorični ekspektoransi pospešijo premikanje izločka in olajšajo izkašljevanje (Rogers, 2007).

### 2.3.1 Ditiotreitol

Ditiotreitol je mukolitik, ki se uporablja za utekočinjenje oziroma homogenizacijo izmečkov v laboratoriju. Zanj je značilno, da ne vpliva na celično morfologijo in

mikrofloro v citoloških vzorcih (Grebski in sod., 2001). V raziskavi pri bolnikih s cistično fibrozo Hammerschlagova in sodelavci (Hammerschlag in sod., 1980) navajajo, da je ditiotreitol dober mukolitik pri homogenizaciji izmečkov, saj omogoča boljše osamitev bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in *S. aureus*. Protibakterijski učinek ditiotreiola so zaznali le pri bakteriji *H. influenzae*.

### **2.3.2 N-acetilcistein**

N-acetilcistein (NAC) je ekspektorans, ki cepi disulfidne vezi mukoproteinov viskoznega izločka v dihalih in tako zniža viskoznost izmečka (Hammerschlag in sod., 1980).

Ostali mukolitiki, ki se uporabljajo za homogenizacijo izmečka so še:

- pankreatin,
- pankreatin-tripsin,
- amilaze,
- natrijev 2-etilheksil sulfat (Hammerschlag in sod., 1980) in
- N-acetil-L-cistein (NALC) (Forbes in sod., 2002).

### **2.3.3 Uporaba mukolitikov v mikrobiološki diagnostiki**

Pri rutinskem delu v mikrobiologiji se mukolitiki največ uporabljajo v diagnostiki mikobakterijskih okužb, in sicer pri obdelavi kužnin iz spodnjih dihal. Uporabljajo se tudi v bakteriološki diagnostiki pri obdelavi kužnin, odvzetih iz spodnjih dihal bolnikov s cistično fibrozo, zaradi velike viskoznosti teh vzorcev in v zadnjem času tudi pri pripravi kužnin iz spodnjih dihal za molekularne diagnostične metode. V diagnostiki okužb z mikobakterijami se kužnine iz spodnjih dihal homogenizirajo z ditiotreitolom ali z N-acetil-L-cisteinom, za ostale navedene indikacije pa predvsem z ditiotreitolom (Forbes in sod., 2002).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

Za ugotavljanje učinkovitosti homogenizacije kužnin z ditiotreitolom pri bakteriološki preiskavi kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili:

- kužnine (izmečke in trahealne aspirate bolnikov);
- delovno raztopino ditiotreitola (Sputasol, Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija);
- gojišča, kot so krvni agar (KA), čokoladni agar (ČA), MacConkey agar (MCC), agar s kolistinom in nalidiksinsko kislino (CNA), kromogeno selektivno diferencialno gojišče za MRSA (iz ang. methicillin-resistant *S. aureus*; CH-MRSA, bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) in tioglikoladni bujon (TIO);
- barvila za barvanje po Gramu (Becton Dickinson, Sparks, ZDA), in sicer kristal vijolično, lugol, aceton alkohol in safranin;
- svetlobni mikroskop Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokyo, Japonska).

Za ugotavljanje protibakterijskega učinka ditiotreitola na bakterijsko vrsto *H. influenzae* smo uporabili:

- bakterijski sev *H. influenzae* ATCC (iz ang. the American Type Culture Collection) 49247 in izolate *H. influenzae*, osamljene iz kužnin iz spodnjih dihal pri treh različnih bolnikih;
- gojišče ČA;
- kakovostne kužnine (trahealne aspirate), v katerih je bila dokazana odsotnost bakterijske rasti in za katere smo z mikroskopskim pregledom ugotovili, da je v posameznem vidnem polju več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov in manj kot 10 ploščatih epitelnih celic;
- delovno raztopino ditiotreitola (Sputasol, Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija).

## 3.2 METODE

V raziskavo smo vključili kužnine iz spodnjih dihal (izmečke in trahealne aspirate), ki so bile poslone v Laboratorij za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani na rutinsko preiskavo na patogene bakterije. Za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom smo izbrali tiste vzorce, ki jih je bilo količinsko več kot 1 ml in za katere smo makroskopsko ocenili, da so nehomogeni, viskozni (sluzni), gnojni ali krvavi. V raziskavo nismo vključili vzorcev sline.

Ustreznost vzorca smo opredelili z določanjem števila polimorfonuklearnih levkocitov in ploščatih epitelnih celic na vidno polje pri 100-kratni povečavi svetlobnega mikroskopa Nikon Eclipse E400 (Nikon). Vzorec je bil kakovosten takrat, kadar je bilo več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov in manj kot 10 ploščatih epitelnih celic na vidno polje (York, 2004; Tomič in Seme, 2003).

### 3.2.1 Postopek obdelave kužnin iz spodnjih dihal

Kužnine, ki so ustrezale kriterijem za vključitev v raziskavo, smo obdelali po ustaljenem protokolu bakteriološke preiskave, ki vključuje izdelavo razmaza za barvanje po Gramu in nacepitev na določena gojišča. Zaradi narave, konzistence nehomogeniziranih vzorcev, nismo mogli zagotoviti uporabe enakih količin (volumna) nehomogeniziranega in homogeniziranega vzorca za pripravo razmazov in nacepitev kužnin na gojišča. Pri viskoznih vzorcih je namreč natančna volumska odmera vzorca praktično nemogoča. Šele homogenizacija, ki je pravzaprav utekočinjenje vzorca, omogoči natančno volumsko odmerjanje vzorca.

### 3.2.1.1 Priprava razmazov nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih po Gramu

Iz gnojnega dela kužnine iz spodnjih dihal smo naredili razmaz. S sterilnim vatiranim brisom smo nehomogenizirano kužnino v obliki tanke plasti nanесли in razmazali po objektnem stekelcu. Tako pripravljen razmaz smo posušili, fiksirali s kemijskim sredstvom metanolom in ga nato obarvali po Gramu. Fiksiran preparat smo prelili z raztopino barvila kristal vijolično za 30 do 60 sekund. Po pretečenem času smo z rahlim curkom vode barvilo sprali s preparata in ga nato prelili z lugolom za 30 do 60 sekund. Ponovno smo z rahlim curkom vode barvilo sprali s preparata in ga nato razbarvali z acetom alkoholom. Pri razbarvanju preparata je bilo pomembno, da smo stekelce držali pod kotom in nanj vlivali acetom alkohol tako dolgo, dokler izpirek ni postal brezbarven. Preparat smo nato ponovno sprali z rahlim curkom vode in ga prelili s safraninom za 30 sekund. Po pretečenem času smo z rahlim curkom vode barvilo sprali s preparata in preparat posušili (York, 2004). Vse razmaze nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvane po Gramu, smo pregledali s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E400 (Nikon) pri 100-kratni in 1000-kratni povečavi. Z mikroskopskim pregledom smo ocenili ustreznost vzorca in prisotnost potencialnih patogenov, na osnovi česar smo se odločili, ali bi bila kultura vzorca sploh smiselna. Ustreznost vzorca smo opredeli z določanjem števila polimorfonuklearnih levkocitov in ploščatih epitelnih celic na vidno polje pri 100-kratni povečavi svetlobnega mikroskopa Nikon Eclipse E400 (Nikon). Vzorec je bil kakovosten takrat, kadar je bilo več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov in manj kot 10 ploščatih epitelnih celic na vidno polje (York, 2004; Tomič in Seme, 2003). Pri kakovostnih vzorcih smo nato razmaze nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvane po Gramu, mikroskopirali pod 1000-kratno povečavo in ugotavljali prisotnost, način barvanja po Gramu, ocenili obliko in način urejanja bakterij (Murray in sod., 1998).

### 3.2.1.2 Nacepitev nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča

S sterilnim vatiranim brisom smo nehomogeniziran izmeček nacepili na KA, ČA in MCC. Prav tako smo s sterilnim vatiranim brisom nacepili nehomogeniziran trahealni aspirat na KA, MCC, CNA, CH-MRSA in TIO. Vsa inokulirana gojišča smo inkubirali 24 ur pri  $36 \pm$

1 °C, razen ČA, ki smo ga inkubirali pri  $36 \pm 1$  °C v CO<sub>2</sub> inkubatorju Binder CB 210 (Binder, Tuttlingen, Nemčija).

Po končani inkubaciji smo kolonije potencialnih patogenih bakterij osamili v čisti kulturi in jih po 24-urni inkubaciji identificirali po ustaljenih bakterioloških postopkih.

### 3.2.1.3 Priprava delovne raztopine ditiotreitola

Za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili sterilni komercialno dostopni pripravek ditiotreitola Sputasol (Oxoid). Za obdelavo kužnin se uporablja delovna raztopina koncentracije 1 mg/ml, ki je obstojna 48 ur pri 2-8 °C. Glede na število vzorcev za homogenizacijo smo delovno raztopino ditiotreitola največkrat pripravili tako, da smo 1,9 ml ditiotreitola aseptično dodali 23,1 ml sterilne destilirane vode in mešanico dobro premešali.

### 3.2.1.4 Homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolum

Vse kužnine, ki so ustrezale kriterijem za vključitev v raziskavo, smo homogenizirali z ditiotreitolum, in sicer tako, da smo po standardnem postopku obdelave kužnin iz spodnjih dihal vzorcu, ki je ostal, s pipeto aseptično dodali enak volumen delovne raztopine ditiotreitola, dobro premešali in pustili delovati 15 minut pri sobni temperaturi (Hammerschlag in sod., 1980; Health Protection Agency, 2008). Po pretečenem času smo homogenizirano kužnino iz spodnjih dihal ponovno dobro premešali in jo nato obdelali po ustaljenem protokolu bakteriološke preiskave.

### 3.2.1.5 Priprava razmazov homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih po Gramu

S sterilno pipeto smo eno kapljico homogenizirane kužnine iz spodnjih dihal nanесли na objektno stekelce in tanko razmazali. Tako pripravljen razmaz smo posušili, fiksirali s kemijskim sredstvom metanolom in ga po enakem standardnem postopku obarvali po

Gramu. Vse razmaze homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvane po Gramu, smo prav tako pregledali s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E400 (Nikon) pri 100-kratni in 1000-kratni povečavi. Z mikroskopskim pregledom smo po enakem kriteriju ocenili ustreznost vzorca in prisotnost potencialnih patogenov, na osnovi česar smo se odločili, ali bi bila kultura vzorca sploh smiselna. Pri kakovostnih vzorcih smo nato razmaze homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvane po Gramu, mikroskopirali pod 1000-kratno povečavo in ugotavljali prisotnost, način barvanja po Gramu, ocenili obliko in način urejanja bakterij (Murray in sod., 1998).

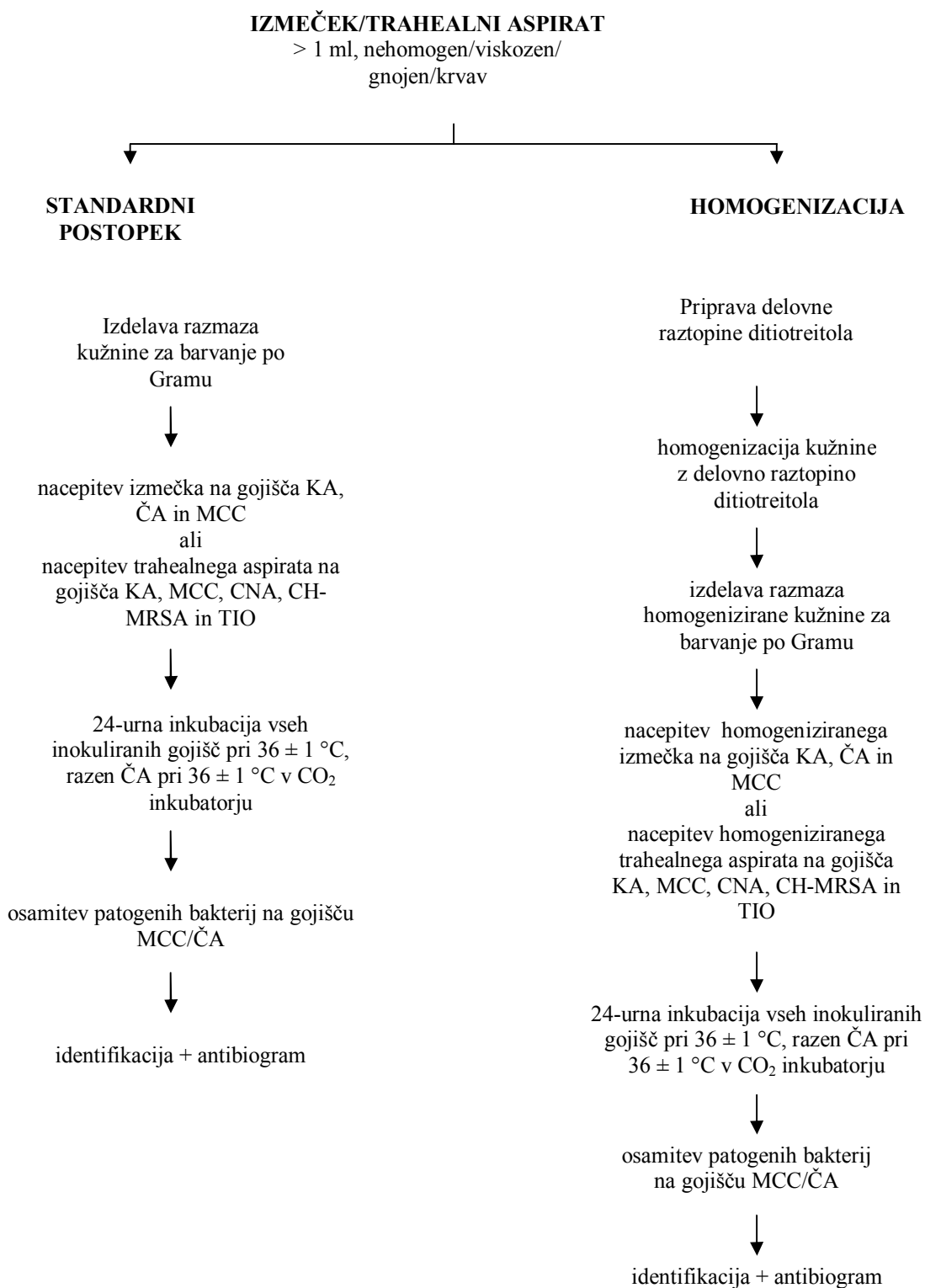
### 3.2.1.6 Nacepitev homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal na gojišča

Homogeniziran izmeček in homogeniziran trahealni aspirat smo s sterilno pipeto aseptično nacepili na enaka gojišča, ki jih uporabljamo pri standardnem postopku bakteriološke preiskave kužnin iz spodnjih dihal. Vsa inokulirana gojišča smo inkubirali 24 ur pri  $36 \pm 1$  °C, razen ČA, ki smo ga inkubirali pri  $36 \pm 1$  °C v CO<sub>2</sub> inkubatorju Binder CB 210 (Binder).

Po končani inkubaciji smo kolonije potencialnih patogenih bakterij osamili v čisti kulturi in jih po 24-urni inkubaciji identificirali po ustaljenih bakterioloških postopkih. Rezultate homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, obdelanih po ustaljenem protokolu bakteriološke preiskave smo med seboj primerjali.

Shematski prikaz obdelave kužnin iz spodnjih dihal v naši raziskavi je prikazan na sliki 1.





Slika 1: Shematski prikaz obdelave kužnin iz spodnjih dihal

### 3.2.1.7 Vrednotenje rezultatov

Pri primerjavi rezultatov, dobljenih iz razmazov nehomogeniziranih in homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvanih po Gramu, smo predvideli naslednje možnosti:

- ujemanje rezultata mikroskopskega pregleda – enak način barvanja in morfološke oblike bakterij v razmazu homogenizirane in nehomogenizirane kužnine;
- prisotnost mikroorganizmov samo v razmazu homogenizirane kužnine, ne pa v razmazu nehomogenizirane kužnine;
- več različnih tipov mikroorganizmov v razmazu homogenizirane kužnine kot v razmazu nehomogenizirane kužnine;
- več različnih tipov mikroorganizmov v razmazu nehomogenizirane kužnine kot v razmazu homogenizirane kužnine.

Pri primerjavi rezultatov kulture nehomogeniziranih in homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal smo predvideli naslednje možnosti:

- enaka vrsta in število izolatov v homogenizirani in nehomogenizirani kužnini;
- bakterijska rast v homogenizirani kužnini in odsotnost rasti v nehomogenizirani kužnini;
- rast več različnih bakterijskih vrst v homogenizirani kužnini kot v nehomogenizirani kužnini;
- rast več različnih bakterijskih vrst v nehomogenizirani kužnini kot v homogenizirani kužnini.

### 3.2.1.8 Občutljivost bakteriološke diagnostične metode

Ker smo na osnovi podatkov iz literature pričakovali, da bomo s homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom povečali učinkovitost mikroskopskega pregleda razmazov in osamitev patogenih bakterijskih vrst, smo občutljivost obeh metod izračunali po naslednjem izračunu:

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni rezultati}}{\text{resnično pozitivni rezultati} + \text{lažno negativni rezultati}} \times 100 \%$$

Občutljivost testa je sposobnost testa, da za pozitiven vzorec poda pozitiven rezultat (Gordis, 2004).

### 3.2.2 Protibakterijski učinek ditiotreitola na bakterijsko vrsto *H. influenzae*

V drugem delu raziskave smo pripravili suspenzijo bakterije *H. influenzae* 0,5 McF in jo vmešali v kakovosten (manj kot 10 ploščatih epitelnih celic/vidno polje in več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov/vidno polje) trahealni aspirat, v katerem je bila predhodno dokazana odsotnost bakterijske rasti. Polovico tako pripravljenega vzorca smo homogenizirali z delovno raztopino ditiotreitola, drugo polovico pa pustili nehomogenizirano, nakar smo s kvantitativno obdelavo obeh vzorcev ugotavljali morebitni protibakterijski učinek ditiotreitola na *H. influenzae*. Protibakterijski učinek ditiotreitola na *H. influenzae* smo preverili pri štirih različnih izhodnih koncentracijah bakterijske suspenzije.

#### 3.2.2.1 Določanje gostote mikrobne suspenzije

Iz kultur standardnega seva *H. influenzae* ATCC 49247 in izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz kužnin iz spodnjih dihal pri treh različnih bolnikih smo ločeno pripravili 10-kratne serijske razredčine v fiziološki raztopini. V epruveto z 2 ml 0,85 % fiziološke raztopine (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) smo s sterilnim vatiranim brisom dodali 24-urno kulturo standardnega seva *H. influenzae* ATCC 49247 oziroma izolatov *H. influenzae*, osamljenih iz kužnin iz spodnjih dihal pri treh različnih bolnikih, da smo dosegli gostoto 0,5 McFarland (McF). Gostoto smo izmerili z nefelometrom (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Vsebinsko epruvete smo dobro premešali in s pipeto odpipetirali 200 µl suspenzije v epruveto z 1,8 ml fiziološke raztopine. Novo suspenzijo smo ponovno dobro premešali in zgoraj opisani postopek smo ponavljali, dokler nismo dosegli zelenih

razredčitev. Nato smo iz vsake epruvete z razredčinami od  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$  odpipetirali 200  $\mu$ l in jih inokulirali na ČA. Inokulum smo s sterilno hokejko razmazali enakomerno po površini gojišča in plošče inkubirali 24 ur pri  $36 \pm 1$  °C v CO<sub>2</sub> inkubatorju Binder CB 210 (Binder). Po končani inkubaciji smo prešteli porasle kolonije na števnikih ploščah (plošče, na katerih je zraslo 30–300 kolonij). Vsaka porasla kolonija na čokoladnem agarju je predstavljala 1 CFU. Določili smo bakterijsko koncentracijo v CFU/ml.

### 3.2.2.2 Določanje protibakterijskega učinka ditiotreitola na bakterijsko vrsto *H. influenzae*

Delovno raztopino ditiotreitola smo pripravili po enakem postopku kot pri homogenizaciji kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom (3.2.1.3). V epruveto smo dodali 1 ml predhodno pripravljene bakterijske suspenzije določenega seva *H. influenzae*, gostote 0,5 McF, 1 ml kužnine (trahealni aspirat), v kateri je bila dokazana odsotnost bakterijske rasti, in 2 ml delovne raztopine ditiotreitola ter pustili delovati 15 minut. Po pretečenem času smo s pipeto odpipetirali 200  $\mu$ l suspenzije v epruveto z 1,8 ml fiziološke raztopine. Novo suspenzijo smo ponovno dobro premešali in zgoraj opisani postopek smo ponavljali, dokler nismo dosegli zelenih razredčitev. Nato smo iz vsake epruvete z razredčinami od  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$  odpipetirali 200  $\mu$ l in jih inokulirali na ČA. Inokulum smo s sterilno hokejko razmazali enakomerno po površini gojišča in plošče inkubirali 24 ur pri  $36 \pm 1$  °C v CO<sub>2</sub> inkubatorju Binder CB 210 (Binder). Po končani inkubaciji smo prešteli porasle bakterijske kolonije in izračunali CFU/ml izhodnega vzorca.

Za negativno kontrolo smo v epruveto dodali 1 ml predhodno pripravljene bakterijske suspenzije posameznega seva *H. influenzae*, gostote 0,5 McF, 1 ml kužnine (trahealni aspirat), v kateri je bila dokazana odsotnost bakterijske rasti in namesto sputasola 2 ml sterilne destilirane vode. Koncentracijo *H. influenzae* v vzorcu negativne kontrole smo določili po enakem postopku kot pri eksperimentalni suspenziji.

Da bi preverili še protibakterijski učinek ditiotreitola na bakterijsko vrsto *H. influenzae* pri nižjih koncentracijah bakterijske suspenzije, smo iz suspenzije standardnega seva *H. influenzae* ATCC 49247 gostote 0,5 McF pripravili 10-kratne serijske razredčine v

fiziološki raztopini. Iz razredčin  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  in  $10^{-5}$  smo odpipetirali 1 ml bakterijske suspenzije in jo dodali v epruveto. V vsako epruveto smo nato dodali tudi 1 ml kužnine (trahealni aspirat), v kateri je bila dokazana odsotnost bakterijske rasti, in 2 ml delovne raztopine ditiotreitola ter pustili delovati 15 minut. Po pretečenem času smo s pipeto odpipetirali 200  $\mu$ l suspenzije v epruveto z 1,8 ml fiziološke raztopine. Za negativno kontrolo smo v epruveto dodali 1 ml predhodno pripravljene razredčine  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  in  $10^{-5}$  bakterijske suspenzije seva *H. influenzae*, 1 ml kužnine (trahealni aspirat), v kateri je bila dokazana odsotnost bakterijske rasti in namesto sputasola 2 ml sterilne destilirane vode. Koncentracijo *H. influenzae* v posameznih izhodnih suspenzijah, po obdelavi s sputasolom ter v vzorcih negativnih kontrol smo določili po enakem postopku kot pri bakterijskih suspenzijah višje koncentracije. Vse tri izhodne razredčine ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  in  $10^{-5}$ ) smo testirali v dvojniku.

## 4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 96 vzorcev iz spodnjih dihal (izmečke in trahealne aspirate), ki so bili v obdobju približno dveh mesecev poslani v Laboratorij za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani na rutinsko preiskavo na patogene bakterije. Prvih 47 kužnin iz spodnjih dihal smo po homogenizaciji z ditiotreitolum obdelali po protokolu, ki je vključeval izdelavo razmaza za barvanje po Gramu in nacepitev na določena gojišča. Ker smo po analizi rezultatov ugotovili, da s homogenizacijo kužnin nismo povečali učinkovitosti osamitve patogenih bakterij, opazili pa smo razlike v rezultatih razmazov iz nehomogeniziranih in homogeniziranih kužnin, obarvanih po Gramu, smo v nadaljevanju raziskave pri 49 kužninah iz spodnjih dihal primerjali samo rezultate razmazov iz homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, obarvanih po Gramu.

V preglednici 1 je prikazana vrsta, število in delež vzorcev, ki smo jih vključili v raziskavo. Razvidno je, da smo v raziskavi od 96 kužnin obdelali 34 (35,4 %) izmečkov in 62 (64,6 %) trahealnih aspiratov.

Preglednica 1: Vrsta, število in delež vzorcev, vključenih v raziskavo

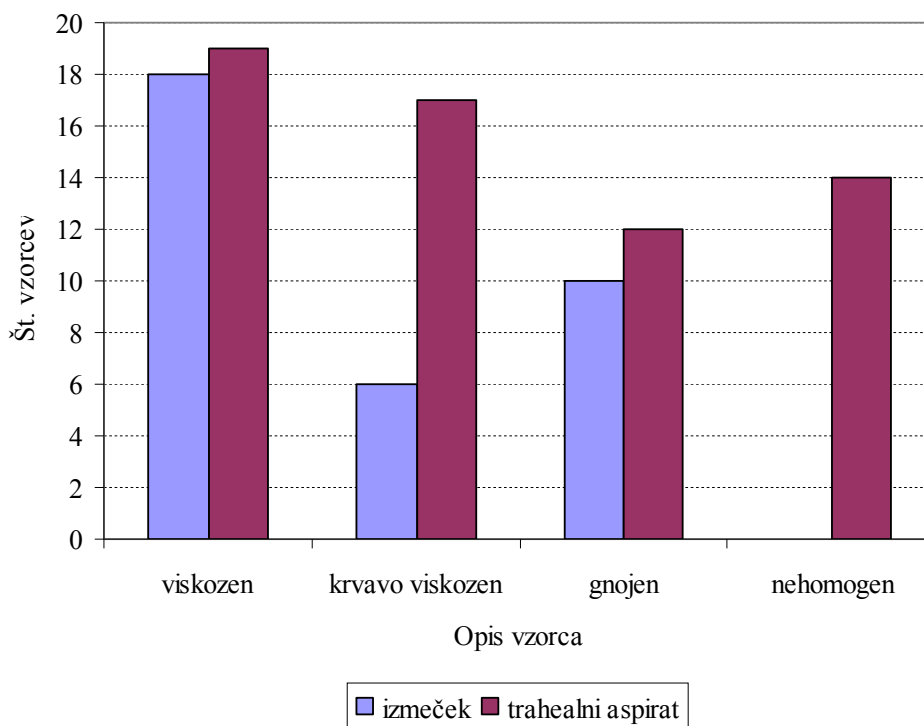
Vrsta vzorca	Število (%) obdelanih vzorcev
Izmeček	34 (35,4)
Trahealni aspirat	62 (64,6)
Skupaj	96 (100)

Za homogenizacijo kužnin z ditiotreitolum smo izbrali tiste vzorce, ki jih je bilo količinsko več kot 1 ml in za katere smo makroskopsko ocenili, da so nehomogeni, viskozni, gnojni ali krvavi. Število in delež glede na vrsto in makroskopski opis kužnin, ki smo jih vključili v raziskavo, so prikazani v preglednici 2. Od 96 kužnin iz spodnjih dihal smo obdelali 37 viskoznih, 23 krvavo viskoznih, 22 gnojnih in 14 nehomogenih vzorcev.

Preglednica 2: Število in delež glede na vrsto in makroskopski opis kužnin iz spodnjih dihal, vključenih v raziskavo

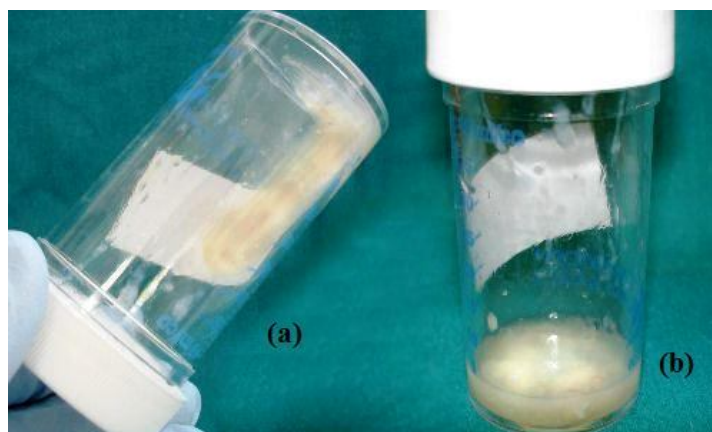
Opis vzorca	Število (%) vzorcev		
	Izmeček	Trahealni aspirat	Skupaj
Viskozen	18 (52,9)	19 (30,6)	37 (38,5)
Krvavo viskozen	6 (17,7)	17 (27,4)	23 (24,0)
Gnojen	10 (29,4)	12 (19,4)	22 (22,9)
Nehomogen	0	14 (22,6)	14 (14,6)
Skupaj	34 (100)	62 (100)	96 (100)

Število posameznih vzorcev glede na opis je prikazano na sliki 2.

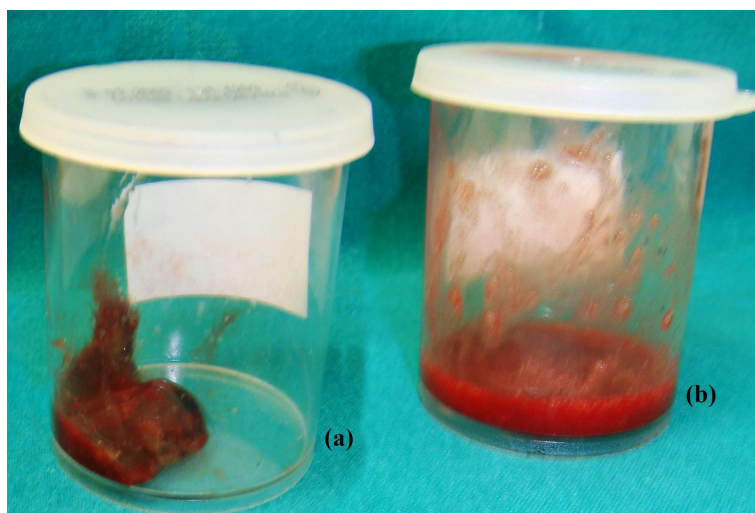


Slika 2: Število in opis izmečkov in trahealnih aspiratov

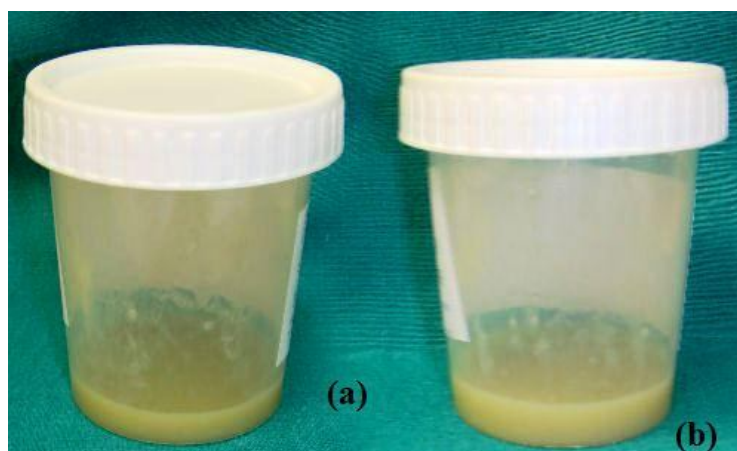
Primeri makroskopskega izgleda vseh tipov nehomogeniziranega in homogeniziranega vzorca so prikazani na slikah 3–6.



Slika 3: Makroskopski izgled trahealnega aspirata: a) nehomogeniziran viskozni vzorec; b) homogeniziran vzorec

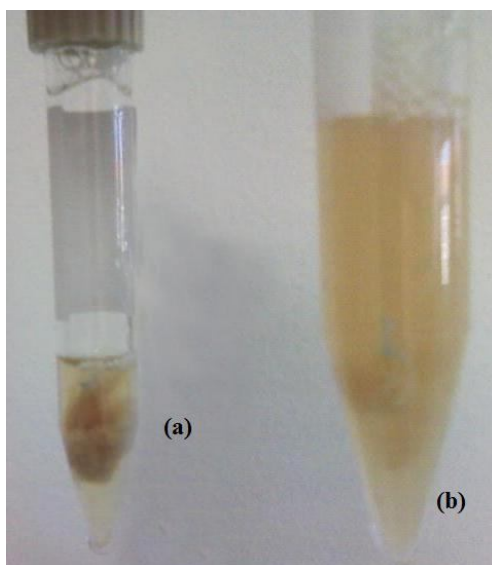


Slika 4: Makroskopski izgled izmečka: a) nehomogeniziran krvavo viskozni vzorec; b) homogeniziran vzorec



Slika 5: Makroskopski izgled izmečka: a) nehomogeniziran gnojni vzorec; b) homogeniziran vzorec





Slika 6: Makroskopski izgled trahealnega aspirata: a) nehomogeniziran nehomogen vzorec; b) homogeniziran vzorec

Za obdelavo enega vzorca po standardnem postopku preiskave na patogene bakterije smo potrebovali približno 3 minute, za obdelavo 5 vzorcev 10 minut. Pri homogenizaciji vzorcev iz spodnjih dihal z ditiotreitolum smo za celotno obdelavo enega vzorca potrebovali 20 minut, za obdelavo 5 vzorcev pa 30 minut.

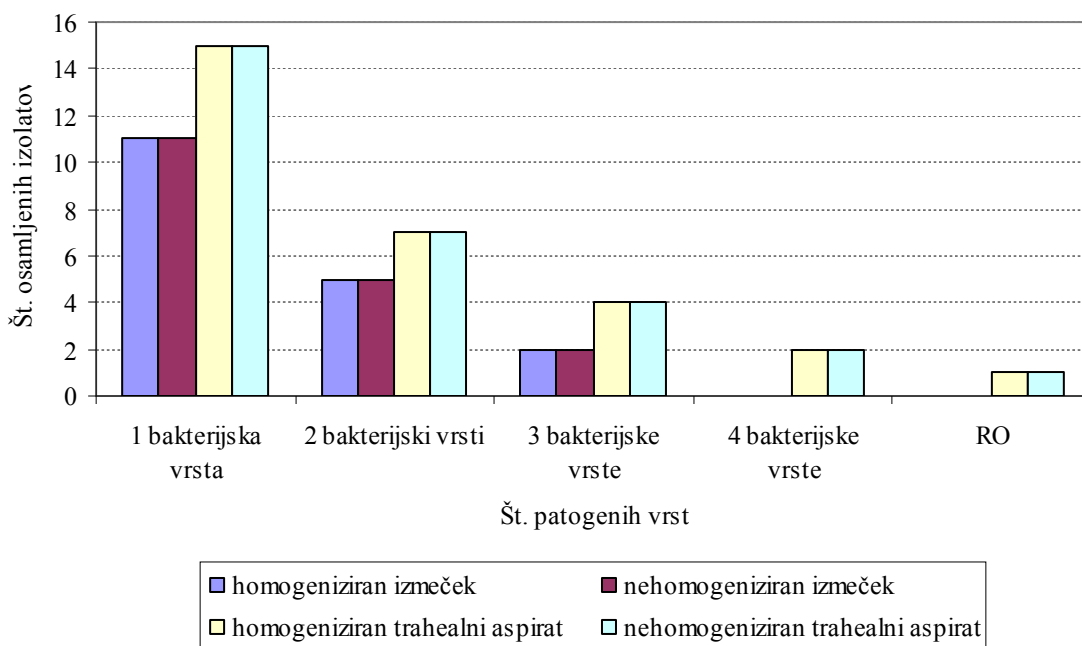
#### 4.1 OSAMITEV PATOGENIH IN/ALI POTENCIALNO PATOGENIH BAKTERIJ IZ KULTURE IN RAZMAZI KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL, OBARVANI PO GRAMU

Rezultate osamljenih patogenih in/ali potencialno patogenih bakterij iz nehomogeniziranih kužnin smo primerjali z rezultati osamljenih patogenih in/ali potencialno patogenih bakterij iz homogeniziranih kužnin. V preglednici 3 je prikazano število in delež izolatov, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo. Grafično so ti rezultati prikazani na sliki 7.

Preglednica 3: Število in delež izolatov, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo

Bakterijski izolati	Število (%) izolatov, osamljenih iz vzorcev			
	Izmeček n=18		Trahealni aspirat n=29	
	Homogeniziran	Nehomogeniziran	Homogeniziran	Nehomogeniziran
<b>1 vrsta</b>	11 (61,1)	11 (61,1)	15 (51,7)	15 (51,7)
<b>2 vrsti</b>	5 (27,8)	5 (27,8)	7 (24,1)	7 (24,1)
<b>3 vrste</b>	2 (11,1)	2 (11,1)	4 (13,8)	4 (13,8)
<b>4 vrste</b>	0	0	2 (6,9)	2 (6,9)
<b>RO</b>	0	0	1 (3,4)	1 (3,4)

Legenda: RO – rast odsotna



Slika 7: Število osamljenih izolatov iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo

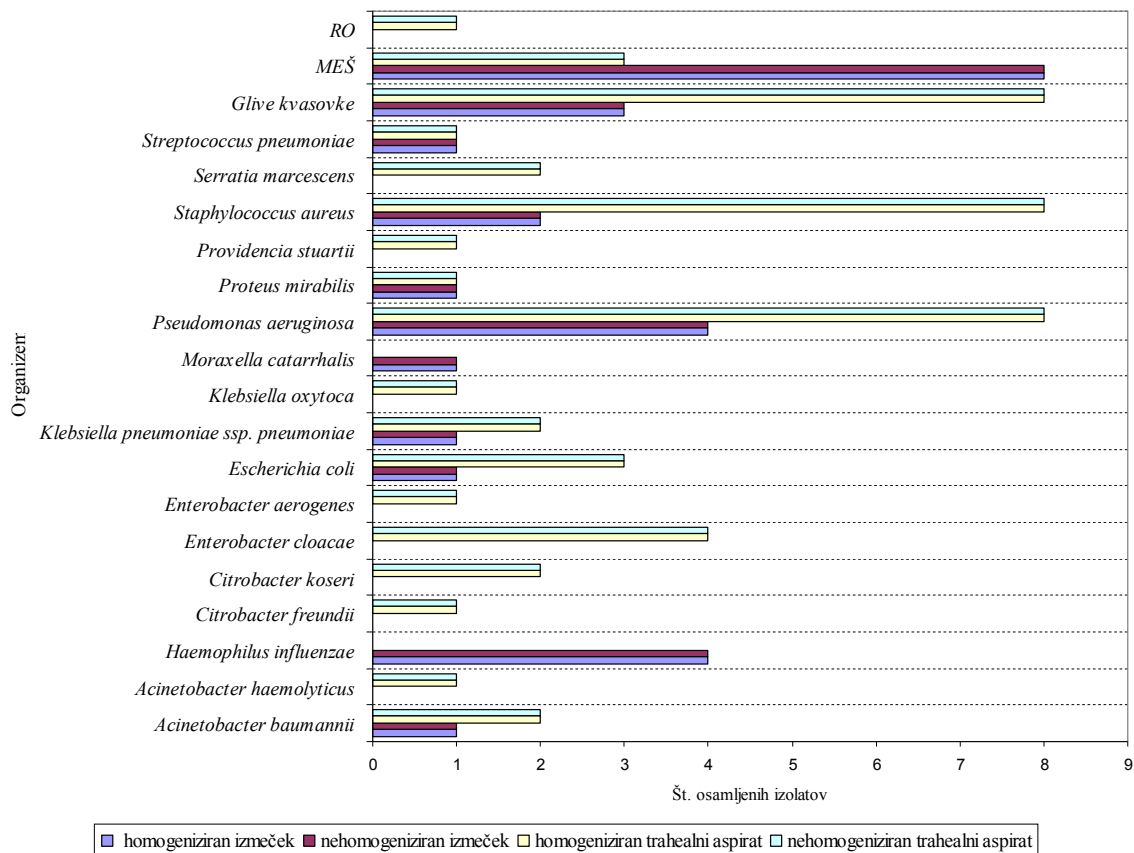
Vrsta, število in delež izolatov patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo, so prikazani v preglednici 4. Iz 18 homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov smo osamili enako število in vrsto patogenih in/ali potencialno patogenih mikroorganizmov.

Enako velja tudi za osamitev vrste in števila patogenih in/ali potencialno patogenih mikroorganizmov iz 29 homogeniziranih in nehomogeniziranih trahealnih aspiratov. Iz homogeniziranih in nehomogeniziranih trahealnih aspiratov smo največkrat osamili glive kvasovke (n=8), *P. aeruginosa* (n=8) in *S. aureus* (n=7). Iz homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov pa je po kultivaciji največkrat porasla mešana bakterijska flora (n=8), *H. influenzae* (n=4) in *P. aeruginosa* (n=4). Končno število posameznih patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst se je torej povsem ujemalo (slika 8).

Preglednica 4: Vrsta, število in delež izolatov patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst, osamljenih iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, vključenih v raziskavo

Organizem	Število (%) izolatov, osamljenih iz vzorcev			
	Izmeček n= 18		Trahealni aspirat n=29	
	Homogeniziran	Nehomogeniziran	Homogeniziran	Nehomogeniziran
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (3,7)	1 (3,7)	2 (4,0)	2 (4,0)
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	0	0	1 (2,0)	1 (2,0)
<i>Haemophilus influenzae</i>	4 (14,8)	4 (14,8)	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	1 (2,0)	1 (2,0)
<i>Citrobacter koseri</i>	0	0	2 (4,0)	2 (4,0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	4 (8,0)	4 (8,0)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	1 (2,0)	1 (2,0)
<i>Escherichia coli</i>	1 (3,7)	1 (3,7)	3 (6,0)	3 (6,0)
<i>Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae</i>	1 (3,7)	1 (3,7)	2 (4,0)	2 (4,0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	1 (2,0)	1 (2,0)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1 (3,7)	1 (3,7)	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 (14,8)	4 (14,8)	8 (16,0)	8 (16,0)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (3,7)	1 (3,7)	1 (2,0)	1 (2,0)
<i>Providencia stuartii</i>	0	0	1 (2,0)	1 (2,0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (7,4)	2 (7,4)	8 (16,0)	8 (16,0)
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	2 (4,0)	2 (4,0)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (3,7)	1 (3,7)	1 (2,0)	1 (2,0)
Glive kvasovke	3 (11,1)	3 (11,1)	8 (16,0)	8 (16,0)
MEŠ	8 (29,6)	8 (29,6)	3 (6,0)	3 (6,0)
RO	0	0	1 (2,0)	1 (2,0)
Skupaj	27 (100)	27 (100)	50 (100)	50 (100)

Legenda: RO – rast odsotna, MEŠ – mešana bakterijska flora zgornjih dihal



Slika 8: Število in vrsta osamljenih izolatov iz vzorcev, vključenih v raziskavo

**Legenda:** RO – rast odsotna, MEŠ – mešana bakterijska flora zgornjih dihal

Število, delež in vrsta ujemanja/neujemanja rezultatov osamitve patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev so prikazani v preglednici 5. Vrste in število izoliranih posameznih patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst iz homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov in trahealnih aspiratov so se popolnoma ujemale.

Preglednica 5: Število, delež in vrsta ujemanja/neujemanja rezultatov osamitve patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst iz homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev

Vrsta ujemanja/neujemanja		Število vzorcev (%)		
		Izmeček n=18	Trahealni aspirat n=29	Skupaj n=47
<b>Ujemanje</b>	<b>Vrsta in število izolatov</b>	18 (100)	29 (100)	47 (100)
<b>Neujemanje</b>	<b>Rast v homogenizirani kužnini in odsotnost rasti v nehomogenizirani kužnini</b>	0	0	0
	<b>Rast več različnih MO v homogenizirani kužnini kot v nehomogenizirani kužnini</b>	0	0	0
	<b>Rast več različnih MO v nehomogenizirani kužnini kot v homogenizirani kužnini</b>	0	0	0

**Legenda: MO** - mikroorganizmi

#### 4.2 RAZMAZI KUŽNIN IZ SPODNJIH DIHAL, OBARVANI PO GRAMU

Vse razmaze homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obarvane po Gramu, smo pregledali s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E400 (Nikon) pod 100-kratno in 1000-kratno povečavo. Rezultate mikrobiološkega pregleda razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin smo med seboj primerjali. Mikroskopski pregled razmazov homogeniziranih kužnin, obarvanih po Gramu, je bil bolj učinkovit, ker smo v več vidnih poljih videli jasno razporejene posamezne mikroorganizme in eritrocite, levkocite in ploščate epitelne celice kot v razmazih nehomogeniziranih kužnin.

Število, delež in vrsta ujemanja/neujemanja rezultatov razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, obarvanih po Gramu, so prikazani v preglednici 6. Od 96 vzorcev so se pri 88 (91,7 %) vzorcih rezultati mikroskopskega pregleda razmaza nehomogeniziranega in homogeniziranega vzorca, obarvanega po Gramu, ujemali. V 8 (8,3 %) vzorcih se rezultati niso ujemali.

Preglednica 6: Število, delež in vrsta ujemanja/neujemanja rezultatov razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev, obarvanih po Gramu

Vrsta ujemanja/neujemanja		Število vzorcev (%)		
		Izmeček n=34	Trahealni aspirat n=62	Skupaj n=96
Ujemanje	Način barvanja in morfološka oblika bakterij	33 (97,1)	55 (88,7)	88 (91,7)
Neujemanje	Prisotnost MO v razmazu homogenizirane kužnine in ne v razmazu nehomogenizirane kužnine	1 (2,9)	4 (6,5)	5 (5,2)
	Več različnih tipov MO v razmazu homogenizirane kužnine kot v razmazu nehomogenizirane kužnine	0	3 (4,8)	3 (3,1)
	Več različnih tipov MO v razmazu nehomogenizirane kužnine kot v razmazu homogenizirane kužnine	0	0	0

**Legenda:** MO - mikroorganizmi

Iz rezultatov smo izračunali občutljivost mikroskopskega pregleda razmazov nehomogeniziranih in homogeniziranih vzorcev.

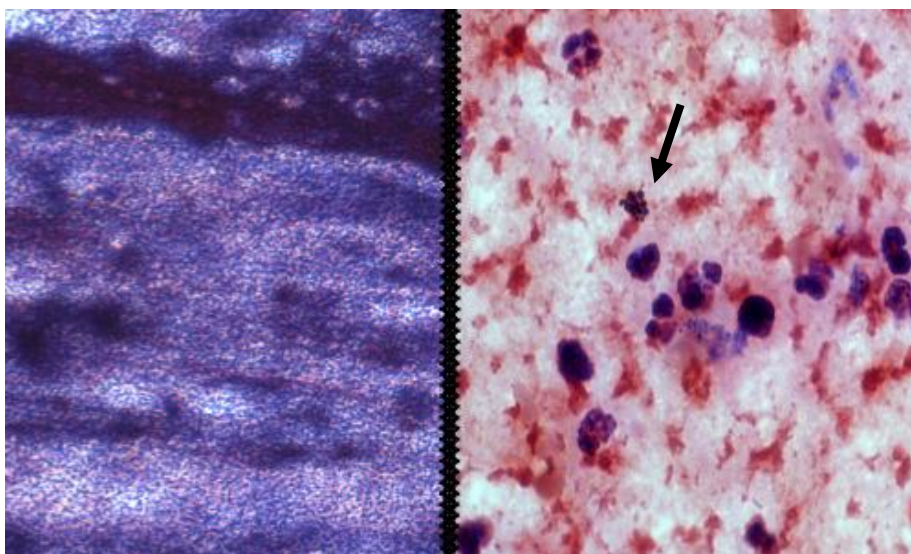
$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{88}{88 + 8} \times 100 \% = 91,7 \% \quad (\text{nehomogenizirani vzorci})$$

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{96}{96 + 0} \times 100 \% = 100 \% \quad (\text{homogenizirani vzorci})$$

V nadaljevanju je podrobneje opisanih vseh 8 primerov, v katerih se rezultati mikroskopskega pregleda razmaza homogeniziranega in nehomogeniziranega vzorca niso ujemali.

Pri mikroskopskem pregledu nehomogeniziranega, nehomogenega trahealnega aspirata pri bolniku št. 12 nismo videli nobenih mikroorganizmov, medtem ko smo v razmazu homogeniziranega vzorca videli po Gramu pozitivne koke v skupinah. Kakovost nehomogeniziranega in homogeniziranega trahealnega aspirata smo ocenili s svetlobnim mikroskopom Nikon Eclipse E400 (Nikon) pod 100-kratno povečavo. Nehomogeniziran in

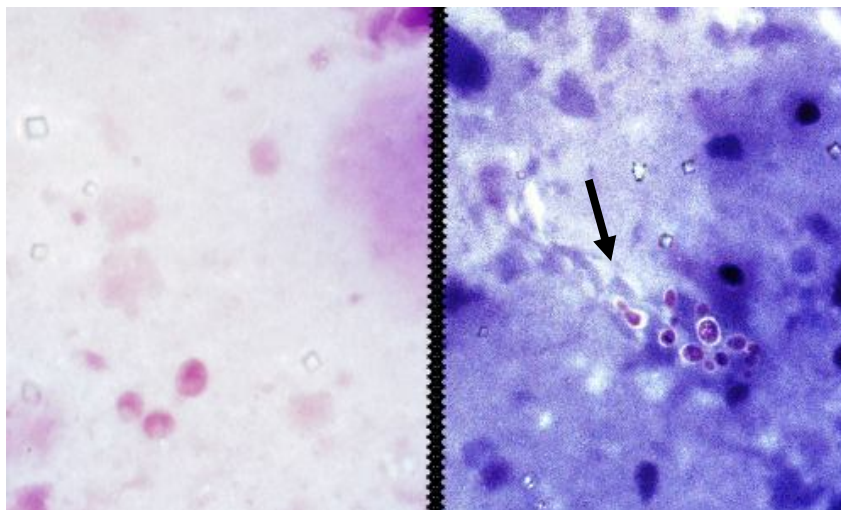
homogeniziran vzorec je bil dobre kvalitete, saj smo v posameznem vidnem polju videli manj kot 10 ploščatih epitelnih celic in več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov. Iz homogeniziranega in nehomogeniziranega vzorca smo osamili *S. aureus* v čisti kulturi. Slika 9 prikazuje mikroskopsko razliko razmazov nehomogeniziranega in homogeniziranega trahealnega aspirata, obarvanih po Gramu, pod 1000-kratno povečavo pri bolniku št. 12.



Slika 9: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 12 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu pozitivni koki v skupinah

Pri bolnikih št. 50 in 53 nismo pri mikroskopskem pregledu nehomogeniziranega, viskoznega trahealnega aspirata videli nobenih mikroorganizmov, medtem ko smo v razmazu homogeniziranega vzorca videli blastospore. Z mikroskopskim pregledom smo pod 100-kratno povečavo ocenili kakovost nehomogeniziranega in homogeniziranega trahealnega aspirata. Nehomogeniziran in homogeniziran vzorec obeh bolnikov je bil dobre kvalitete, saj smo v posameznem vidnem polju videli manj kot 10 ploščatih epitelnih celic in več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov. Iz nehomogeniziranega vzorca smo pri obeh bolnikih osamili glive kvasovke v čisti kulturi, medtem ko homogeniziranih vzorcev pri teh dveh bolnikih iz drugega dela raziskave nismo kultivirali. Slika 10 prikazuje

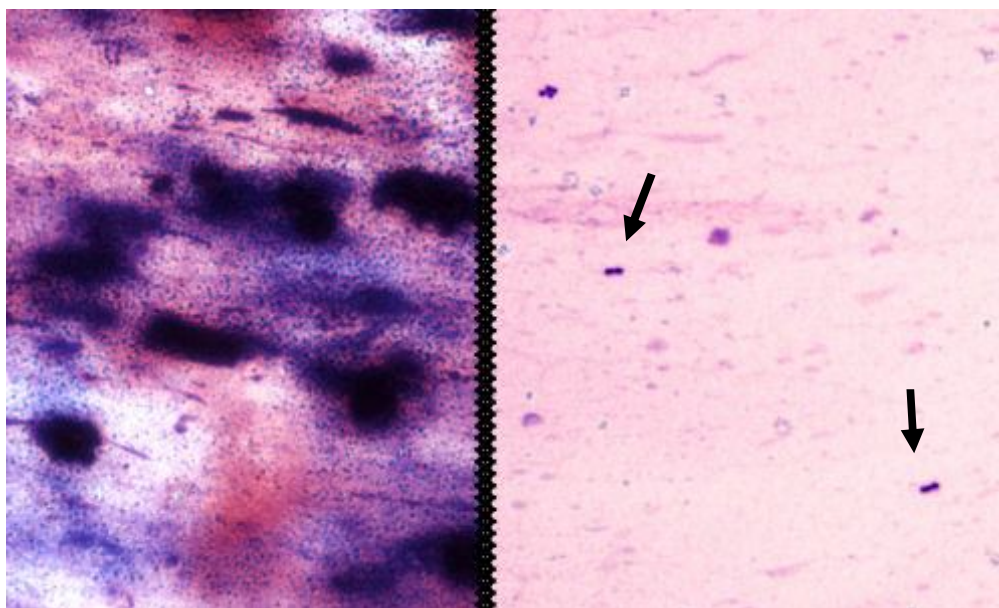
mikroskopsko razliko razmazov nehomogeniziranega in homogeniziranega trahealnega aspirata, obarvanih po Gramu, pod 1000-kratno povečavo pri bolniku št. 53.



Slika 10: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 53 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidne blastospore

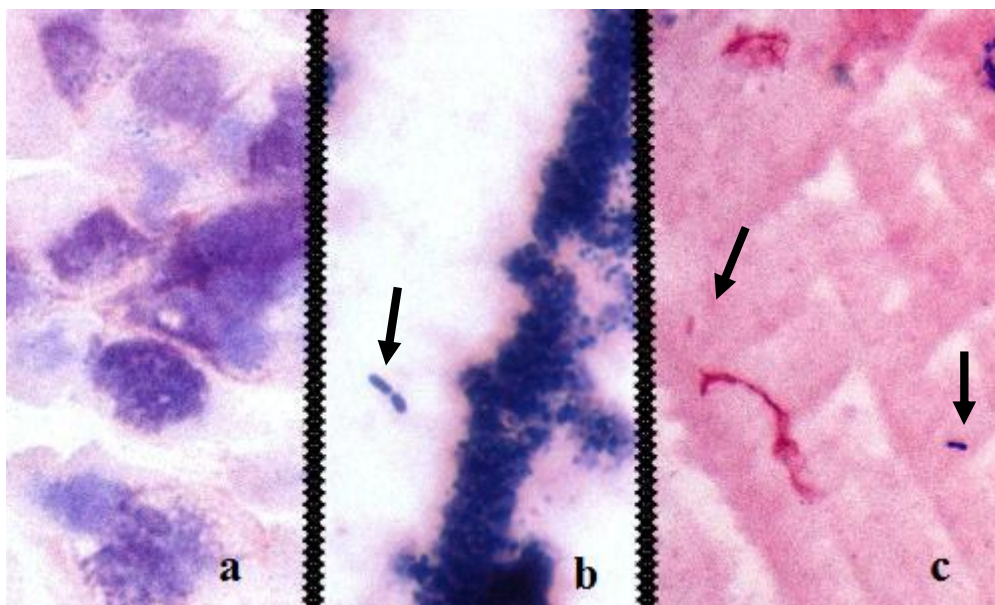
Pri mikroskopskem pregledu nehomogeniziranega, viskoznega izmečka pri bolniku št. 64 nismo videli nobenih mikroorganizmov, medtem ko smo v razmazu homogeniziranega vzorca videli po Gramu pozitivne diplokoke (slika 11). Z mikroskopskim pregledom smo pod 100-kratno povečavo ocenili tudi kakovost nehomogeniziranega in homogeniziranega izmečka. Nehomogeniziran in homogeniziran vzorec je bil dobre kvalitete, saj smo v posameznem vidnem polju videli manj kot 10 ploščatih epitelnih celic in več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov. Iz nehomogeniziranega vzorca smo osamili *S. pneumoniae* v čisti kulturi, s tem da je bilo število kolonij *S. pneumoniae* na primarnih gojiščih relativno majhno (približno 20 CFU). Homogeniziranega vzorca nismo kultivirali, saj je bila kužnina iz drugega dela raziskave.





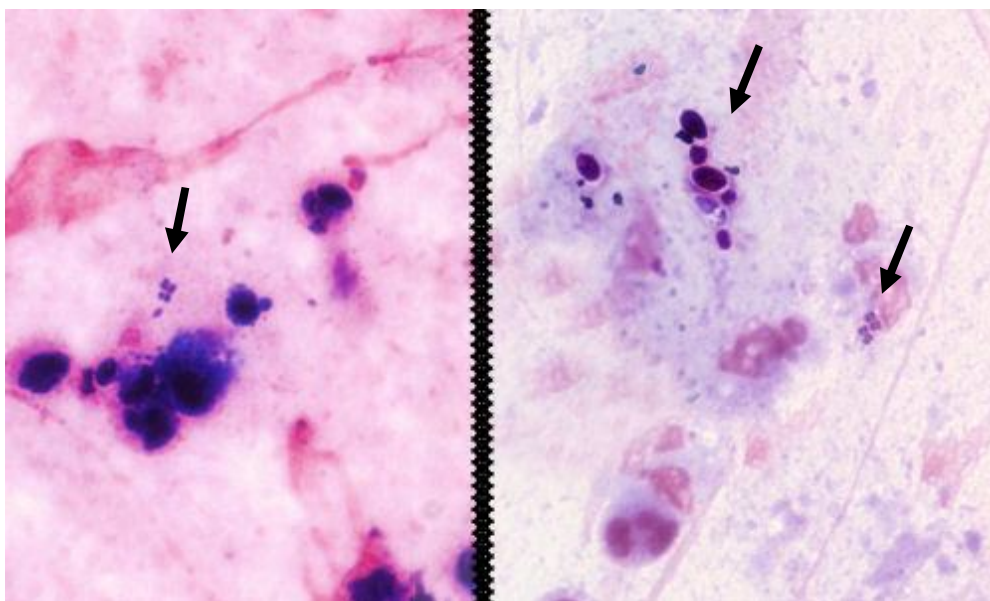
Slika 11: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 64 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran izmeček; desno – homogeniziran izmeček in vidni po Gramu pozitivni diplokoki

Slika 12 prikazuje mikroskopsko razliko razmazov nehomogeniziranega in homogeniziranega trahealnega aspirata, obarvanih po Gramu, pod 1000-kratno povečavo pri bolniku št. 68. V razmazu nehomogeniziranega, viskoznega trahealnega aspirata nismo videli nobenih mikroorganizmov, medtem ko smo v razmazu homogeniziranega vzorca videli več tipov mikroorganizmov, in sicer po Gramu pozitivne bacile, po Gramu negativne bacile in po Gramu pozitivne diplokoke. Iz nehomogeniziranega vzorca je po kultivaciji porasla mešana bakterijska flora zgornjih dihal. Homogeniziranega vzorca nismo kultivirali, saj je bila kužnina iz drugega dela raziskave.



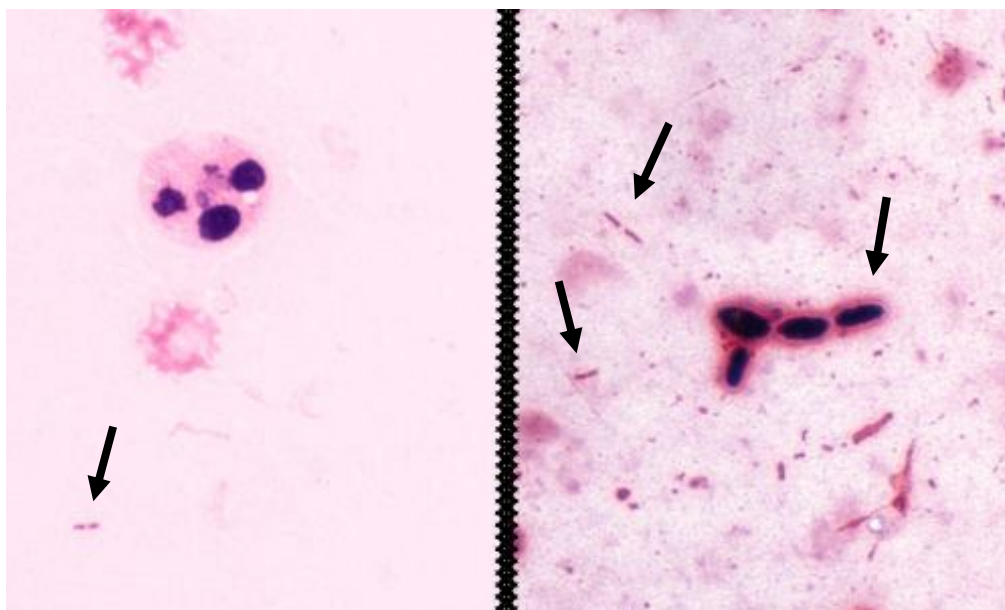
Slika 12: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 68 pod 1000-kratno povečavo: a) nehomogeniziran trahealni aspirat; b) homogeniziran trahealni aspirat in vidna po Gramu pozitivna bacila; c) homogeniziran trahealni aspirat in viden po Gramu negativen bacil ter po Gramu pozitivna diplokoka

Slika 13 prikazuje mikroskopsko razliko razmazov nehomogeniziranega in homogeniziranega trahealnega aspirata, obarvanih po Gramu, pod 1000-kratno povečavo pri bolniku št. 76. V razmazu nehomogeniziranega, viskoznega trahealnega aspirata smo videli po Gramu pozitivne koke v skupinah. V razmazu homogeniziranega vzorca smo poleg po Gramu pozitivnih kokov v skupinah videli tudi blastospore. Iz nehomogeniziranega vzorca smo osamili *S. aureus* (70 %) in glive kvasovke (30 %), medtem ko homogeniziranega vzorca nismo kultivirali, saj je bil iz drugega dela raziskave.



Slika 13: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 76 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu pozitivni koki v skupinah; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu pozitivni koki v skupinah ter blastospore

Pri bolnikih št. 87 (slika 14) in 90 smo pri mikroskopskem pregledu nehomogeniziranega, viskoznega trahealnega aspirata videli po Gramu negativne bacile, medtem ko smo v razmazu homogeniziranega vzorca poleg po Gramu negativnih bacilov videli tudi blastospore. Z mikroskopskim pregledom smo pod 100-kratno povečavo ocenili tudi kakovost nehomogeniziranega in homogeniziranega trahealnega aspirata. Nehomogeniziran in homogeniziran vzorec obeh bolnikov sta bila dobre kvalitete, saj smo v posameznem vidnem polju videli manj kot 10 ploščatih epitelnih celic in več kot 25 polimorfonuklearnih levkocitov. Pri bolniku št. 87 smo iz nehomogeniziranega vzorca osamili *P. aeruginosa* (80 %) in glive kvasovke (20 %), pri bolniku št. 90 pa *E. cloacae* (60 %) in glive kvasovke (40 %). Homogeniziranih vzorcev pri teh dveh bolnikih nismo kultivirali, saj sta bila iz drugega dela raziskave.



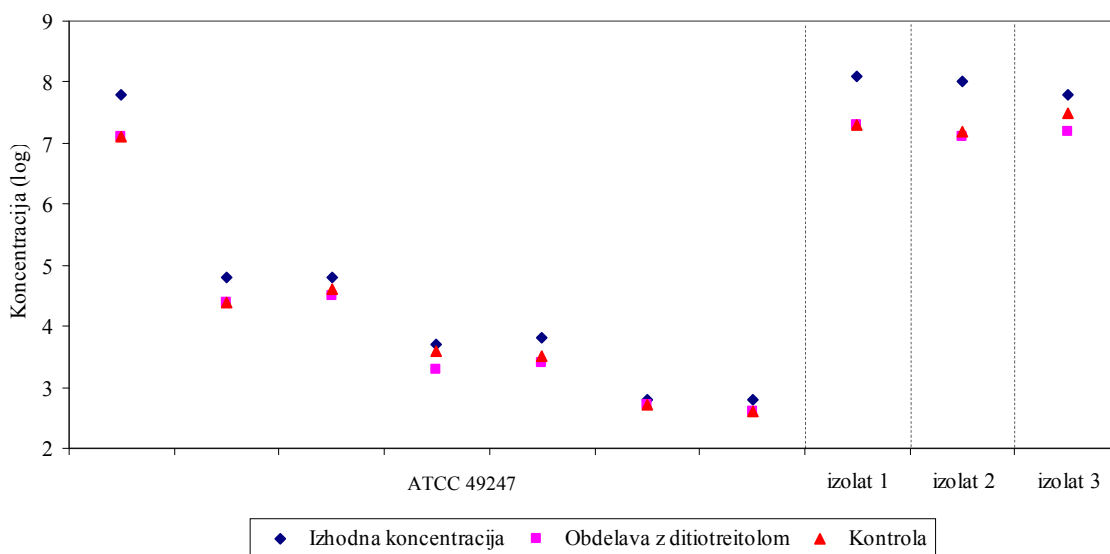
Slika 14: Mikroskopski pregled kužnine bolnika št. 87 pod 1000-kratno povečavo: levo – nehomogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu negativni bacili; desno – homogeniziran trahealni aspirat in vidni po Gramu negativni bacili ter blastospore

#### 4.3 PROTIBAKTERIJSKI UČINEK DITIOTREITOLA NA BAKTERIJSKO VRSTO *H. INFLUENZAE*

V drugem delu raziskave, v katerem smo preverjali protibakterijski učinek ditiotreitola na bakterijsko vrsto *H. influenzae*, smo na osnovi dobljenih rezultatov, prikazanih v preglednici 7, ugotovili, da ditiotreitola nima pomembnega protibakterijskega učinka na to patogeno bakterijsko vrsto.

Preglednica 7: Koncentracije bakterije *H. influenzae* (CFU/ml) v izhodnih suspenzijah, po obdelavi z ditiotreitolom in v negativnih kontrolah

Suspencije <i>H. influenzae</i>	Izhodna koncentracija (CFU/ml)	Obdelava z ditiotreitolom (CFU/ml)	Kontrola (CFU/ml)
ATCC 49247	$5,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
	$5,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$
	$6,6 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$
	$5,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$
	$5,8 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
	$6,3 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$
	$5,8 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
Izolat 1	$1,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
Izolat 2	$9,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Izolat 3	$5,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$



Slika 15: Koncentracije bakterije *H. influenzae* (log CFU/ml) v izhodnih suspenzijah, po obdelavi z ditiotreitolom in v negativnih kontrolah

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Okužbe spodnjih dihal so dandanes ene najpogostejših vzrokov, zaradi katerih bolniki poiščejo pomoč pri zdravniku (Tomič, 2008). Posledice okužb spodnjih dihal so najhujše in najpogostejše pri otrocih v prvih letih življenja in pri ljudeh v pozni starosti. Zato je pomembno, da pravočasno prepoznamo okužbo spodnjih dihal in jo ustrezno zdravimo, saj s tem zmanjšamo potrebo po bolnišničnem zdravljenju in smrtnost, preprečimo širjenje odpornosti bakterijskih povzročiteljev in zmanjšamo družbene stroške (Drinovec, 2003). Vendar osnovne pomanjkljivosti, kot so odvzem kakovostne kužnine, ustreza laboratorijska obdelava kužnin in hitro posredovanje rezultatov mikrobiološke preiskave zdravniku, lahko otežijo diagnostiko okužb spodnjih dihal (Tomič, 2008). V bakteriološki diagnostiki okužb spodnjih dihal najpogosteje uporabljamo preiskavo kužnin, odvzetih s področja spodnjih dihal na patogene bakterije, ki obsega pregled razmaza kužnine, obarvanega po Gramu in njihovo kulturo. Prisotnost najverjetnejšega povzročitelja okužb spodnjih dihal lahko zelo hitro razkrijemo s pregledom razmaza, obarvanega po Gramu, saj je ta metoda zagotovo najcenejša, najhitrejša in najpreprostejša mikrobiološka metoda (Tomič, 2008; Tomič in Seme, 2003). Ker so kužnine iz spodnjih dihal pogosto nehomogene, viskozne, gnojne ali krvave, je še posebej pomembno, da jih ustrezno laboratorijsko obdelamo. Tako omogočimo izdelavo enakomernih razmazov za barvanje po Gramu in s tem lažje in bolj učinkovito mikroskopiranje teh kužnin ter učinkovitejšo osamitev patogenih bakterijskih vrst. Da bi se izognili lažno negativnim rezultatom, je priporočljivo vzorčenje več makroskopsko najbolj gnojnih delov posamezne kužnine. Laboratorijski delavec, ki obdeluje vzorec, mora biti posebej pozoren in izurjen za to vrstno delo. Do variabilnosti rezultatov lahko pride tudi takrat, kadar je v obdelavo kužnin iz spodnjih dihal vključenih veliko laboratorijskih delavcev (May, 1953; Hammerschlag in sod., 1980). Druga možnost za zmanjšanje lažno negativnih rezultatov je homogenizacija kužnin z enim od mukolitičnih sredstev. Največkrat priporočljiva je uporaba ditiotreitola, saj razen na *H. influenzae* zanj ni bilo ugotovljenega protibakterijskega delovanja (Hammerschlag in sod., 1980).

V diplomski nalogi smo s primerjavo rezultatov mikrobiološkega pregleda razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, obarvanih po Gramu, in njihovih kvalitativnih kultur želeli ugotoviti učinkovitost homogenizacije z ditiotreitolom. Za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili delovno raztopino ditiotreitola. Pri mikrobiološki diagnostiki okužb z mikobakterijami se kot mukolitika uporabljata ditiotreitol in N-acetil-L-cistein (NALC), vendar v diagnostiki drugih patogenih bakterij NALC, predvsem v kombinaciji z natrijevim hidroksidom, ni primeren za obdelavo kužnin, saj jih uniči (Forbes in sod., 2002). Kilbourn in sod. (Kilbourn in sod., 1968) navajajo, da niso ugotovili nobene razlike v osamitvi patogenih bakterij pri rutinski bakteriološki preiskavi izmečka bolnikov s cistično fibrozo in homogenizaciji izmečka z mukolitikom natrijevim 2-etilheksil sulfatom. Uporabnost ostalih mukolitikov, kot so pankreatin, pankreatin-tripsin in amilaze za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal, v literaturi ni opisana. Želeli smo tudi preveriti protibakterijsko delovanje ditiotreitola na patogeno bakterijsko vrsto *H. influenzae*, ki je bilo ugotovljeno v raziskavi Hammerschlagove in sod. (1980).

V obdobju dveh mesecev smo po ustaljenem protokolu bakteriološke preiskave obdelali 96 kužnin iz spodnjih dihal, od tega 34 (35,4 %) izmečkov in 62 (64,6 %) trahealnih aspiratov. V raziskavo smo vključili samo ustrezne vzorce za homogenizacijo kužnin z ditiotreitolom, in sicer tiste, za katere smo ocenili, da jih je bilo količinsko več kot 1 ml ter za katere smo makroskopsko ocenili, da so nehomogeni, viskozni, gnojni ali krvavi. Od 96 kužnin iz spodnjih dihal smo obdelali največ viskoznih kužnin (38,5 %) in najmanj nehomogenih kužnin (14,6 %). Rezultate osamljenih patogenih in/ali potencialno patogenih bakterij iz nehomogeniziranih kužnin smo primerjali z rezultati osamljenih patogenih in/ali potencialno patogenih bakterij iz homogeniziranih kužnin. Iz preglednice 3 lahko vidimo, da smo iz 18 homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov ter 29 homogeniziranih in nehomogeniziranih trahealnih aspiratov osamili enako število patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst. Iz kužnin smo največkrat osamili po eno patogeno in/ali potencialno patogeno bakterijsko vrsto in le pri eni je bila rast odsotna. Iz homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov smo osamili 27 patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst in 50 patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst iz homogeniziranih in nehomogeniziranih trahealnih aspiratov. Iz



homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov je po kultivaciji največkrat porasla mešana bakterijska flora zgornjih dihal, *P. aeruginosa* in *H. influenzae*. Iz homogeniziranih in nehomogeniziranih trahealnih aspiratov pa smo največkrat osamili glive kvasovke, *P. aeruginosa* in *S. aureus*. Iz 18 homogeniziranih in nehomogeniziranih izmečkov in iz 29 homogeniziranih in nehomogeniziranih trahealnih aspiratov smo osamili enako število in vrsto patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst. Na osnovi rezultatov, pridobljenih pri osamitvi patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst iz homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, lahko zaključimo, da homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom ne poveča učinkovitost osamitve patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst. V nadaljevanju raziskave smo zato pri 49 kužninah iz spodnjih dihal primerjali samo rezultate razmazov iz homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, obarvanih po Gramu.

Pri primerjavi rezultatov mikrobiološkega pregleda razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, obarvanih po Gramu, so rezultati pokazali, da smo s homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom za 8,3 % povečali občutljivost mikroskopskega pregleda razmaza. Obdelava kužnin z ditiotreitolom je omogočila izdelavo enakomernih razmazov za barvanje po Gramu in s tem lažje in učinkovitejše mikroskopiranje vseh kužnin. V razmazih homogeniziranih kužnin smo videli posamezne mikroorganizme in eritrocite, levkocite in ploščate epitelne celice v več vidnih poljih kot v razmazih nehomogeniziranih kužnin.

V drugem delu raziskave smo na osnovi podatkov iz literature pričakovali, da bomo dokazali protibakterijski učinek ditiotreitola na *H. influenzae*. Hammerschlagova in sod. (1980) so namreč v svoji raziskavi ugotavljali protibakterijski učinek ditiotreitola na določene mikroorganizme (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae* in *Candida albicans*). Določili so minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) in minimalno baktericidno koncentracijo ditiotreitola, pri čemer so uporabili ditiotreitol v koncentracijah od 8–500 µg/ml. Največji protibakterijski učinek ditiotreitola so ugotovili pri bakterijski vrsti *H. influenzae*. Koncentracija ditiotreitola 31 µg/ml je bila inhibitorna za 16 od skupaj 29 testiranih bakterijskih izolatov *H. influenzae*, pri 27 od 29 izolatov pa je bila MIK 62,5 µg/ml. Minimalna baktericidna koncentracija je bila pri vseh mikroorganizmih enaka ali za



eno razredčino višja od MIK. Prav tako so potrdili protibakterijski učinek ditiotreitola na *H. influenzae*, ko so ugotavljali časovno odvisnost vpliva določene koncentracije ditiotreitola na rast te bakterijske vrste. Protibakterijski učinek ditiotreitola koncentracije 50 µg/ml je bil viden že po 2 urah inkubacije. V drugem delu raziskave, kjer so primerjali rezultate rutinske obdelave vzorcev, odvzetih bolnikom s cistično fibrozo, in obdelavo teh z ditiotreitolom, so prav tako dokazali protibakterijski učinek ditiotreitola na bakterijsko vrsto *H. influenzae*. Na osnovi teh rezultatov nekateri priporočajo, da se kužnine bolnikov s cistično fibrozo še pred homogenizacijo z ditiotreitolom nacepijo na čokoladni agar, da bi s tem omogočili osamitev hemofilusa.

Rezultati naše raziskave (preglednica 7) niso potrdili protibakterijskega učinka ditiotreitola na *H. influenzae* tako pri višji kot pri nižjih koncentracijah bakterijske suspenzije, s tem da smo mi preverjali učinek delovne koncentracije ditiotreitola, ki se uporablja za obdelavo kužnin (1 mg/ml), ki je celo višja kot MIK, ugotovljen v raziskavi Hammerschlagove in sod. (1980). Odsotnost protibakterijskega učinka ditiotreitola na to bakterijsko vrsto potrjujejo tudi naši rezultati iz prvega dela raziskave, saj smo uspeli *H. influenzae* osamiti tako iz nehomogeniziranih kot iz homogeniziranih kužnin.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom olajša oz. omogoča učinkovitejši mikroskopski pregled razmazov teh kužnin. Osnovna pomanjkljivost, ki preprečuje širšo uporabo homogenizacije kužnin z ditiotreitolom, je, da nekoliko zaplete in podaljša postopek obdelave vzorca. Upoštevati moramo tudi ostale okoliščine, ki vplivajo na dolgotrajnost postopka, saj je čas celotne obdelave predvsem odvisen tudi od količine rutinske obdelave vzorcev.

V Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani so se na osnovi rezultatov opravljene raziskave odločili, da pri rutinskem delu ne bodo homogenizirali vseh kužnin iz spodnjih dihal, saj bi s takšno strategijo predvsem povečali obseg dela in podaljšali čas obdelave kužnin, ne da bi pri tem izboljšali občutljivost bakteriološke preiskave. V laboratoriju tako nadaljujejo s homogenizacijo vseh kužnin iz spodnjih dihal, odvzetih bolnikom s cistično fibrozo, saj je velika večina teh kužnin zelo viskozna in

homogenizacija z ditionitritom močno olajša obdelavo vzorca. Dodatno z ditionitritom homogenizirajo predvsem tiste nehomogene, viskozne in gnojne kužnine, pri katerih v razmazu nehomogenizirane kužnine ni videti bakterijskih in/ali glivnih celic.

## 5.2 SKLEPI

- Homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolum ni povečala učinkovitosti osamitve patogenih bakterij.
- Rezultati mikroskopskega pregleda razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcev so se ujemali v 91,7 % vzorcev.
- Homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolum je za 8,3 % povečala občutljivost mikroskopskega pregleda razmaza. Omogočala je izdelavo enakomernih razmazov za barvanje po Gramu in s tem lažje in učinkovitejše mikroskopiranje teh kužnin.
- Rezultati naše raziskave niso potrdili protibakterijskega učinka na bakterijsko vrsto *H. influenzae*.
- Na osnovi rezultatov raziskave v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pri rutinskem delu poleg vseh vzorcev iz spodnjih dihal, odvzetih bolnikom s cistično fibrozo, z ditiotreitolum homogenizirajo tudi nehomogene, viskozne in gnojne kužnine, pri katerih v razmazih nehomogeniziranega vzorca, obarvanega po Gramu, ni videti bakterijskih in/aliglivnih celic.

## 6 POVZETEK

V bakteriološki diagnostiki okužb spodnjih dihal se najpogosteje uporablja preiskava kužnin, odvzetih s področja spodnjih dihal na patogene bakterije, ki obsega mikroskopski pregled razmaza kužnine, obarvanega po Gramu, in njihovo kulturo. Pravilen odvzem kužnine in ustrezna laboratorijska obdelava kužnine ter hitro posredovanje rezultatov mikrobiološke preiskave zdravniku omogoča pravočasno prepoznavanje in ustrezno zdravljenje okužb spodnjih dihal. Ker so kužnine iz spodnjih dihal pogosto nehomogene in viskozne in bakterije v njih niso enakomerno porazdeljene, lahko to bistveno vpliva na rezultat bakteriološke preiskave. Da bi se izognili lažno negativnim rezultatom, je potrebno poznati najverjetnejše povzročitelje pri posameznih vrstah okužb spodnjih dihal in najprimernejše mikrobiološke diagnostične teste zanje. Lažno negativne rezultate bi lahko zmanjšali tudi s homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal z enim od mukolitičnih sredstev. Najbolj priporočljiv mukolitik za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal je ditiotreitol. Zanj so v preteklosti ugotovili protibakterijsko delovanje na patogeno bakterijsko vrsto *H. influenzae*.

V diplomski nalogi smo primerjali rezultate nehomogeniziranih in z ditiotreitolom homogeniziranih kužnin iz spodnjih dihal, obdelanih po ustaljenem protokolu bakteriološke preiskave, ki vključuje izdelavo razmaza za barvanje po Gramu in nacepitev na določena gojišča. Za homogenizacijo kužnin iz spodnjih dihal smo uporabili delovno raztopino ditiotreitola. Preverili smo tudi protibakterijski učinek ditiotreitola na patogeno bakterijsko vrsto *H. influenzae*.

Homogenizacija kužnin iz spodnjih dihal z ditiotreitolom ni povečala učinkovitosti osamitve patogenih in/ali potencialno patogenih bakterijskih vrst, saj smo osamili enako število in vrsto patogenih in/ali potencialno patogenih bakterij tako iz 47 nehomogeniziranih kot iz homogeniziranih vzorcev. Pri primerjavi rezultatov mikroskopskega pregleda razmazov homogeniziranih in nehomogeniziranih kužnin, obarvanih po Gramu, smo pri 88 od 96 vzorcih, vključenih v raziskavo, videli enak način barvanja in morfološke oblike bakterij. Rezultati se niso ujemali v 5 vzorcih, kjer smo z mikroskopskim pregledom razmazov videli prisotnost mikroorganizmov samo v razmazih

homogeniziranih kužnin in ne v razmazih nehomogeniziranih kužnin ter v 3 vzorcih, kjer smo v razmazih homogeniziranih kužnin videli več različnih tipov mikroorganizmov kot v razmazih nehomogeniziranih kužnin. V drugem delu raziskave, kjer smo na osnovi podatkov iz literature preverili protibakterijski učinek ditiotreitola na patogeno bakterijsko vrsto *H. influenzae*, so rezultati pokazali, da ditiotreitol nima protibakterijskega učinka na to patogeno bakterijsko vrsto.

## 7 VIRI

Drinovec J. 2003. Epidemiološki in družbeni pomen okužb na spodnjih dihalih. *Krka v medicini in farmaciji*, 24, 35: 8–14

Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. 2002. *Mycobacteria*. V: *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 11<sup>th</sup> ed. Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. (eds.). St. Louis, Mosby: 538–571

Gordis L. 2004. Assessing the validity and reliability of diagnostic and screening tests. V: *Epidemiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Gordis L. (ed.). Philadelphia, Elsevier Saunders: 71–94

Gleckman R., de Vita J., Hibert D., Pelletier C., Martin R. 1988. Sputum Gram stain in community-acquired bacteremic pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 846–849

Grebski E., Peterson C., Medici T.C. 2001. Effect of physical and chemical methods of homogenization on inflammatory mediators in sputum of asthma patients. *Chest*, 119: 1521–1525

Gubina M., Ihan A. 2002. Diagnostika bakterijskih okužb. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 335–341

Hammerschlag M.R., Harding L., Macone A., Smith A.L., Goldmann D.A. 1980. Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: Evaluation of dithiothreitol as a mucolytic agent. *Journal of Clinical Microbiology*, 11: 552–557

Health Protection Agency. 2008. Investigation of bronchoalveolar lavage, sputum and associated specimens. National Standard Method BSOP 57 Issue 2.2. London, Health Protection Agency

[http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf\\_sops.asp](http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp) (Junij, 2009): 26 str.

Kilbourn J.P., Campbell R.A., Grach J.L., Willis M.D. 1968. Quantitative bacteriology of sputum. *American Review of Respiratory Disease*, 98: 810–818

Kotnik V. 2002. Od miazme do bolezni norih krav. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 503–515

May J.R. 1953. The bacteriology of chronic bronchitis. *Lancet*, 262: 534–537

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 1998. Bacterial morphology and cell wall structure and synthesis. V: *Medical microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. (eds.). St. Louis, Mosby: 10–21

Pfyffer G.E. 2007. Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. V: *Manual of clinical microbiology*. 9<sup>th</sup> ed. Murray P.R., Baron E.J., Landry M.L., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. (eds.). Washington DC, ASM Press: 543–572

Rogers D.F. 2007. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. *Respiratory Care*, 52, 9: 1176–1197

Roson B., Carratala J., Verdaguer R., Dorca J., Manresa F., Gudiol F. 2000. Prospective study of the usefulness of sputum Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 869–874

Tomič V. 2008. Mikrobiološka diagnostika okužb spodnjih dihal. *Medicinski razgledi*, 47, Suppl.3: S41–S44

Tomič V., Seme K. 2003. Pomen mikrobioloških preiskav pri okužbah na spodnjih dihalih. *Krka v medicini in farmaciji*, 24, 35: 15–22

Tomič V., Šorli J. 2002. Diagnostična vrednost razmaza sputuma in endotrahealnega aspirata, obarvanega po Gramu. *Zdravniški vestnik*, 71: 83–86

York M.K. 2004. Gram Stain. V: *Clinical microbiology procedures handbook*. 2<sup>nd</sup> ed. Isenberg H.D. (ed.). Washington DC, ASM Press: 3.2.1.1–3.2.1.22



## ZAHVALA

Iskreno hvala mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med., za koristne nasvete, spodbudne besede, strokovno vodenje, pomoč in usmerjanje pri izvajanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Manici Mueller-Premru, dr. med., za korekten pregled diplomskega dela.

Hvala tudi Antoniji, Marji, Mrjetki, Poloni in Polonci iz Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani za prijazen sprejem, pomoč, nasvete in spodbudne besede pri praktični izvedbi diplomskega dela.

Iskrena hvala moji družini, predvsem staršem, ki so mi omogočili študij, sestri Barbari in Dejanu za potrpežljivost, razumevanje, skrb in vsestransko podporo. Z vami je bilo vse lažje.

Hvalu tudi vsem prijateljem, ki so me spremljali in spodbujali skozi čas študija.