

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona PLAZAR

**PREVERJANJE TRAJNOSTI IZBRANIH BAKTERIOLOŠKIH
GOJIŠČ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STABILITY TESTING OF SELECTED BACTERIAL CULTURE
MEDIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije, smer medicinsko sanitarne mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Murska Sobota.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme in za recenzentko prof. dr. Evo Ružić-Sabljić.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja Žgur Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Katja Seme
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona Plazar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.083(043) = 163.6
KG	mikrobiološke metode / gojišča / kakovost gojišč / življenjska doba gojišč / agar Campy / agar CLED / agar MAC / agar ORSAB / agar SS / agar XLD / agar MHR / agar DNAA / gojišče GOI / agar King B/
AV	PLAZAR, Simona
SA	SEME, Katja (mentorica) / RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	PREVERJANJE TRAJNOSTI IZBRANIH BAKTERIOLOŠKIH GOJIŠČ
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XVI, 72 str., 41 pregl., 28 sl., 21 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI V medicinskih laboratorijih za bakterijske okužbe so za izolacijo in kultivacijo bakterij nujno potrebna ustrezna bakteriološka gojišča. Gojišča morajo omogočati bakterijam optimalne rastne pogoje. Kakovost se preverja takoj po pripravi gojišča, pomembno pa je določiti tudi njegovo življenjsko dobo. Zelo malo literature o življenjski dobi gojišč je na voljo, rok trajanja, ki ga določi proizvajalec, pa je velikokrat tako kratek, da ne zadostuje potrebam uporabnika. V naši raziskavi smo preverili trajnost za 11 splošno uporabljenih gojišč. Izbrali smo 6 gojišč za kultivacijo, 3 gojišča, ki se uporabljajo pri identifikaciji in 1 gojišče, ki se uporablja pri določanju občutljivosti bakterij za antibiotike. Še prej pa smo izbrali najustreznejšo metodo med več preizkušenimi. Po priporočilih smo uporabili kontrolne seve, s katerimi smo preverjali rast na izbranih gojiščih. Z opazovanjem rasti smo dobili rezultate, ki so bili merilo za ustreznost gojišča. Ko je rast upadla, smo zaključili, da gojišče ni več uporabno in mu tako določili novo življenjsko dobo. Življenjska doba trdnih gojišč za izolacijo in kultivacijo je vsaj 4 tedne in vsaj 2 tedna, če so jim dodani antibiotiki. Življenjska doba gojišč za identifikacijo je vsaj 13 tednov in gojišče za določanje občutljivosti bakterij za antibiotike je uporabno vsaj 6 tednov po pripravi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.083(043) = 163.6
CX	microbiology methods / culture media / quality of culture media / shelf-life of culture media / agar Campy / agar CLED / agar MAC / agar ORSAB / agar SS / agar XLD / agar MHR / agar DNAA / MIO culture medium / agar King B/
AU	PLAZAR, Simona
AA	SEME, Katja (supervisor) / RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2009
TI	STABILITY TESTING OF SELECTED BACTERIAL CULTURE MEDIA
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XVI, 72 p., 41 tab., 28 fig., 21 ref.
LA	sl
AL	sl/en

AB Medical laboratories for bacterial infections necessarily require suitable culture media for isolation, cultivation and identification of bacterial isolates. Culture media must enable optimal conditions for bacterial growth. Quality is tested directly after the preparation of the culture medium, and the determination of shelf-life is very important. There are not many published studies regarding the shelf-life of culture media and the time limit indicated by the manufacturer is usually so short that it does not meet the requirements of the user. In our study we have tested the stability of 11 commonly used culture media. We have selected 6 culture media for cultivation, 3 culture media used for identification and 1 culture medium used for antimicrobial susceptibility testing. Before that we have selected the most appropriate method out of many tested methods. Control strains were used for testing growth on selected culture media. In the case of nonadequate growth the culture medium was supposed as not useable and its new shelf-life was defined. The shelf-life of culture media for isolation and cultivation was at least 4 weeks or 2 weeks if the antibiotics are added. The shelf-life of culture media for identification was at least 13 weeks and of the culture media for testing the bacterial sensitivity of antibiotics at least 6 weeks after the preparation.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	XII
Okrajšave in simboli	XIV
Slovarček	XVI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OBJAVE DRUGIH AVTORJEV O TRAJNOSTI IN KAKOVOSTI GOJIŠČ	2
2.1.1 Ločitev kontrole kakovosti gojišča po njegovi pripravi od testiranja življenjske dobe	2
2.1.2 Kontrola kakovosti po pripravi gojišča	2
2.1.2.1 Kontrola kakovosti pripravljenih gojišč	2
2.1.2.2 Kontrola kakovosti dehidriranih gojišč in reagentov	2
2.1.3 Testiranje življenjske dobe	3
2.1.4 Transport in shranjevanje, ter življenjska doba	4
2.1.4.1 Transport in shranjevanje, ter življenjska doba pripravljenih gojišč	4
2.1.4.2 Transport in shranjevanje, ter življenjska doba dehidriranih gojišč	4
2.2 IZBRANA BAKTERIOLOŠKA GOJIŠČA	6
2.2.1 Delitev gojišč	6
2.2.2 Gojišča za izolacijo in kultivacijo	7
2.2.2.1 Izbrano gojišče: agar Campy	7
2.2.2.2 Izbrano gojišče: agar CLED	7
2.2.2.3 Izbrano gojišče: MAC ali MacConkey agar	8
2.2.2.4 Izbrano gojišče: agar ORSAB	9

2.2.2.5 Izbrano gojišče: agar SS	9
2.2.2.6 Izbrano gojišče: agar XLD	10
2.2.2.7 Izbrano gojišče: agar MH	12
2.2.3 Testna gojišča za identifikacijo in za antibiogram	12
2.2.3.1 Izbrano gojišče: agar DNAA	12
2.2.3.2 Izbrano gojišče: GOI	13
2.2.3.3 Izbrano gojišče: agar King B	13
2.2.3.4 Izbrano gojišče: agar MHR	14
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 MATERIAL	15
3.1.1 Uporabljena bakteriološka gojišča	15
3.1.2 Kontrolni sevi	16
3.1.3 Drugi material	17
3.2 METODA	19
3.2.1 Priprava sevov	19
3.2.2 Preverjanje trajnosti gojišč za izolacijo in kultivacijo	19
3.2.2.1 Potek raziskave	19
3.2.2.2 Izbira metode za merjenje rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo	22
3.2.2.2.1 Cilji	22
3.2.2.2.2 Definicije	23
3.2.2.2.3 Preverjanje metod	25
3.2.2.2.3.1 Metoda Miles & Misra	25
3.2.2.2.3.2 Ekometrična metoda	26
3.2.2.2.3.3 Washingtonova metoda	27
3.2.2.2.3.4 Metoda 5 črt	27
3.2.2.2.3.5 Metoda CLSI	29
3.2.2.2.3.5.1 Osnovni opis metode CLSI	29
3.2.2.2.3.5.2 Ugotavljanje vpliva odmerjanja volumnov pri metodi CLSI	29
3.2.2.2.3.5.3 Nova modifikacija metode CLSI	29
3.2.2.2.3.5.4 Ugotavljanje vpliva redčenja pri metodi CLSI	29
3.2.2.2.3.5.5 Ugotavljanje vpliva različnih osnovnih suspenzij pri metodi CLSI	30

3.2.2.3	Določitev gostote za nacepitev inokuluma glede na rastni koeficient za izbrana bakteriološka gojišča	30
3.2.2.4	Osnova za interpretacijo rezultatov rasti bakterij na gojiščih	31
3.2.3	Preverjanje trajnosti testnih gojišč	33
4	REZULTATI	35
4.1	REZULTATI PREVERJANJA GOJIŠČ ZA IZOLACIJO IN KULTIVACIJO	35
4.1.1	Rezultati preverjanja metod za merjenje rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo	35
4.1.1.1	Metoda Miles & Misra	35
4.1.1.2	Ekometrična metoda	36
4.1.1.3	Washingtonova metoda	37
4.1.1.4	Metoda 5 črt	37
4.1.1.5	Metoda CLSI	38
4.1.1.5.1	Rezultati prvotnega preizkusa metode CLSI	38
4.1.1.5.2	Rezultati ugotavljanja vpliva odmerjanja volumnov pri metodi CLSI	39
4.1.1.5.3	Rezultati drugega preizkusa metode CLSI	39
4.1.1.5.4	Rezultati ugotavljanja vpliva redčenja pri metodi CLSI	40
4.1.1.5.5	Rezultati ugotavljanja vpliva različnih osnovnih suspenzij pri metodi CLSI	41
4.1.2	Rezultati rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo	43
4.1.2.1	Prikaz rezultatov preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo	43
4.1.2.2	Rezultati preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo s statistično analizo	49
4.1.2.2.1	Statistično obdelani rezultati agarja Campy	49
4.1.2.2.2	Statistično obdelani rezultati agarja CLED	50
4.1.2.2.3	Statistično obdelani rezultati agarja MAC	52
4.1.2.2.4	Statistično obdelani rezultati agarja ORSAB	55
4.1.2.2.5	Statistično obdelani rezultati agarja SS	56
4.1.2.2.6	Statistično obdelani rezultati agarja XLD	57
4.2	REZULTATI PREVERJANJA GOJIŠČ ZA IDENTIFIKACIJO IN GOJIŠČ ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA ANTIBIOTIKE	58
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	61
5.1	RAZPRAVA	61

5.1.1	Preverjanje gojišč za izolacijo in kultivacijo	61
5.1.1.1	Metode za merjenje rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo	61
5.1.1.1.1	Metoda Miles & Misra	61
5.1.1.1.2	Ekometrična metoda	61
5.1.1.1.3	Washingtonova metoda	61
5.1.1.1.4	Metoda 5 črt	61
5.1.1.1.5	Metoda CLSI	62
5.1.1.1.5.1	Prvotni preizkus metode CLSI	62
5.1.1.1.5.2	Vpliv odmerjanja volumnov pri metodi CLSI	62
5.1.1.1.5.3	Drugi preizkus metode CLSI	62
5.1.1.1.5.4	Vpliv redčenja pri metodi CLSI	62
5.1.1.1.5.5	Vpliv različnih osnovnih suspenzij pri metodi CLSI	63
5.1.1.1.6	Izbira metode	63
5.1.1.2	Interpretacija rezultatov preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo	64
5.1.1.2.1	Agar Campy	64
5.1.1.2.2	Agar CLED	64
5.1.1.2.3	Agar MAC	64
5.1.1.2.4	Agar ORSAB	64
5.1.1.2.5	Agar SS	65
5.1.1.2.6	Agar XLD	65
5.1.2	Interpretacija rezultatov preverjanja testnih gojišč	65
5.1.2.1	Agar DNAA	65
5.1.2.2	Gojišče GOI	66
5.1.2.3	Agar King B	66
5.1.2.4	Agar MHS	66
5.1.3	Možne izboljšave metod za preverjanje trajnosti in kriteriji za ustreznost gojišč	66
5.2	SKLEPI	68
6	POVZETEK	69
7	VIRI	71
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Uporabljena bakteriološka gojišča	16
Preglednica 2: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar Campy	20
Preglednica 3: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar CLED	20
Preglednica 4: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar MAC	21
Preglednica 5: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar ORSAB	21
Preglednica 6: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar SS	21
Preglednica 7: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar XLD	21
Preglednica 8: Računanje teoretičnega inokuluma	24
Preglednica 9: Končne določitve cepljenja za vsako gojišče in vsak sev posebej po metodi CLSI	30
Preglednica 10: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar DNAA	33
Preglednica 11: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za GOI gojišče	33
Preglednica 12: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar King B	34
Preglednica 13: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar MHS	34
Preglednica 14: Rezultati metode Miles & Misra	35
Preglednica 15: Rezultati števila kolonij metode Miles & Misra, prikazani po posameznih nacepljenih elipsah s specifičnim TI (teoretični inokulum), in njihovi statistični izračuni	36
Preglednica 16: Rast v posameznih poljih na plošči	36
Preglednica 17: Rezultati petih ponovitev Washingtonove metode z izračunanim povprečjem, standardno deviacijo, koeficientom variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti	37
Preglednica 18: Rezultati metode 5črt; uporabljeno gojišče MH (Mueller Hinton) in kontrolni sev <i>E. coli</i>	37
Preglednica 19: Rezultati metode 5črt; uporabljeno gojišče MHR (rdeči Mueller Hinton) in kontrolni sev <i>S. pneumoniae</i>	37
Preglednica 20: Statistični izračuni za rezultate preizkusa metode 5 črt, ki so prikazani v preglednicah 18 in 19	38
Preglednica 21: Preizkus metode 5 črt z različno gostoto nanesenih redčin bakterije <i>E. coli</i> na agar MH	38

Preglednica 22: Rezultati petih ponovitev modifikacije metode CLSI z TI = 1000 CFU na ploščo pri nacepivki 10 µl redčine 10 ⁻³	38
Preglednica 23: Izmerjeni volumni s pomočjo tehtanja destilirane H ₂ O in izračunana standardna deviacija, ter koeficient variacije za vsako pipeto posebej	39
Preglednica 24: Rezultati treh ponovitev modifikacije metode CLSI z TI = 500 CFU na ploščo pri nacepivki 50 µl redčine 10 ⁻⁴	39
Preglednica 25: Rezultati treh ponovitev modifikacije metode CLSI z TI = 1000 CFU na ploščo pri nacepivki 100 µl redčine 10 ⁻⁴	40
Preglednica 26: Število CFU na ploščah z različnim načinom redčenja OS ob uporabi modificirane metode CLSI	40
Preglednica 27: Statistični izračuni za rezultate vpliva redčenja na natančnost, ki so v preglednici 26	40
Preglednica 28: Prvi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepivitvijo 50 µl redčine 10 ⁻⁴ , narejene iz petih različnih OS, TI = 500 CFU na ploščo	41
Preglednica 29: Drugi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepivitvijo 50 µl redčine 10 ⁻⁴ , narejene iz petih različnih OS, TI = 500 CFU na ploščo	41
Preglednica 30: Prvi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepivitvijo 100 µl redčine 10 ⁻⁵ , narejene iz petih različnih OS, TI = 100 CFU na ploščo	42
Preglednica 31: Drugi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepivitvijo 100 µl redčine 10 ⁻⁵ , narejene iz petih različnih OS, TI = 100 CFU na ploščo	42
Preglednica 32: Rezultati preverjanja trajnosti agarja Campy z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov	43
Preglednica 33: Rezultati preverjanja trajnosti agarja CLED z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov	44
Preglednica 34: Rezultati preverjanja trajnosti agarja MAC z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov	45
Preglednica 35: Rezultati preverjanja trajnosti agarja ORSAB z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov	46

Preglednica 36: Rezultati preverjanja trajnosti agarja SS z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov	47
Preglednica 37: Rezultati preverjanja trajnosti agarja XLD z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov	48
Preglednica 38: Rezultati preverjanja trajnosti agarja DNAA z izvedbo DNA-znega testa posameznih kontrolnih sevov	58
Preglednica 39: Rezultati preverjanja trajnosti gojišča GOI z izvedbo treh vsebovanih testov: G – giblјivost, O – ornitinska dekarboksilaza in I – indol, in sicer z vsakim posameznim kontrolnim sevom	58
Preglednica 40: Rezultati preverjanja trajnosti agarja King B kot testa na nastanek pioverdina pri posameznih kontrolnih sevih	58
Preglednica 41: Rezultati preverjanja trajnosti agarja MHS z izvedbo antibiogramskega testa štirih antibiotikov in z merjenjem rasti uporabljenega kontrolnega seva <i>Streptococcus pneumoniae</i> po CLSI metodi	58

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Rast kolonij na plošči, cepljeni po metodi Miles & Misra	25
Slika 2: Šablona za nacepitev po ekometrični metodi	26
Slika 3: Nacepitev po metodi 5 črt	28
Slika 4: Osnovni graf za interpretacijo, kjer so rezultati A – J prikazani v odstotkih in imajo dodane 95 % intervale zaupanja; glede na mejo so postavljeni v skupine, ki so različno obarvane	32
Slika 5: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja Campy	43
Slika 6: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja CLED	44
Slika 7: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja MAC	45
Slika 8: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja ORSAB	46
Slika 9: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja SS	47
Slika 10: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja XLD	48
Slika 11: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar Campy in kontrolni sev <i>Campylobacter jejuni</i>	49
Slika 12: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Slika 13: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev <i>Enterococcus faecalis</i>	51
Slika 14: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev <i>Proteus mirabilis</i>	51
Slika 15: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev <i>Escherichia coli</i>	52
Slika 16: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni sev <i>Escherichia coli</i>	53
Slika 17: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni	

sev <i>Proteus mirabilis</i>	53
Slika 18: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni	
sev <i>Shigella flexneri</i>	54
Slika 19: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni	
sev <i>Salmonella</i> Typhimurium	54
Slika 20: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar ORSAB in kontrolni	
sev <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300, redčine 10^{-4}	55
Slika 21: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar ORSAB in kontrolni	
sev <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300, redčine 10^{-5}	55
Slika 22: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar SS in kontrolni sev	
<i>Shigella flexneri</i>	56
Slika 23: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar SS in kontrolni sev	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	56
Slika 24: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar XLD in kontrolni sev	
<i>Shigella flexneri</i>	57
Slika 25: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik penicilin (disk P10) preizkusa trajnosti agarja	
MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)	59
Slika 26: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik eritromicin (disk E15) preizkusa trajnosti agarja	
MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)	59
Slika 27: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik klindamicin (disk CC2) preizkusa trajnosti agarja	
MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)	60
Slika 28: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik oksacilin (disk OX1) preizkusa trajnosti agarja	
MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AGI	= (angl. absolute growth index) absolutni rastni indeks
ATCC	= (angl. American Type Culture Collection) ameriška zbirka tipskih kultur
Campy	= okrajšava za selektivni agar, ki ga uporabljamo za izolacijo bakterij rodu <i>Campylobacter</i>
CFU	= (angl. colony forming unit) enota (mikrobna celica ali skupek celic), iz katere se razvije posamezna kolonija
CLED	= (angl. Cystine Lactose – Electrolyte – Deficient Agar) diferencialni agar, ki se uporablja za osamitev bakterij iz urina
CLSI	= (Clinical and Laboratory Standards Institute) novejšo poimenovanje za NCCLS
DNAA	= agar za ugotavljanje DNA-zne aktivnosti bakterij
GOI	= slovensko poimenovanje testnega gojišča MIO (angl. Motility Indole Ornithine Medium) za ugotavljanje gibljivosti, ornitinske dekarboksilaze in produkcije indola
HPA	= (angl. Health Protection Agency, London) oznaka za zunanjo kontrolo kakovosti laboratorija
KNS	= bakterije rodu <i>Staphylococcus</i> , ki ne proizvajajo koagulaze (koagulaza negativni stafilokoki)
MAC	= okrajšava za MacConkey agar
MCB	= (angl. multiple combination bacterial antibiotic testing) večkratno testiranje kombinacij bakterijskih antibiotikov
MH	= Mueller Hinton
MHR	= rdeči Mueller Hinton oziroma Mueller Hinton z dodatkom 5 % ovčje krvi
MHS	= proizvajalčevo ime za MHR (S je izpeljan iz angleškega izraza za ovce: sheep)
MIC	= (angl. minimal inhibitory concentration) minimalna inhibitorna koncentracija, metoda testiranja občutljivosti bakterij za antibiotike
MRSA	= bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> , ki je odporna proti meticilinu
MSSA	= bakterija <i>Staphylococcus aureus</i> , ki je občutljiva za meticilin
NCCLS	= National Committee for Clinical Laboratory Standards
NCTC	= (angl. National Collection of Type Cultures) zbirka medicinsko pomembnih bakterij, ki jo hrani Central Public Health Laboratory, London
ORSAB	= (angl. Oxacillin Resistance Screening Agar Base) selektivni agar za izolacijo bakterij MRSA

OS	= osnovna suspenzija bakterijskega seva; naša definicija osnovne suspenzije je suspenzija bakterij z gostoto 0,5 po McFarlandu, kar je enako absorbanci 0,08 – 0,1 pri 625 nm in znaša $(1 \text{ do } 2) \times 10^8$ (bakterijskih) celic na ml
PHLS	= Public Health Laboratory Service
RLS	= referenčni laboratorijski sev, ki izvira iz zunanjih kontrol kakovosti laboratorija HPA
SS	= gojišče za izolacijo bakterijskega rodu <i>Salmonella</i> in nekaterih vrst rodu <i>Shigella</i>
TI	= teoretični inokulum, ki nam pove število kolonij, ki jih lahko pričakujemo na plošči po nacepiti inokuluma določene gostote in volumna, torej teoretično število CFU inokuluma
XLD	= (angl. Xylose Lysine Deoxycholate Agar) selektivno gojišče za izolacijo patogenih enterobakterij

SLOVARČEK

Antibiogram	= določitev občutljivosti določenega mikrobnega seva za antibiotike in kemoterapevtike
Diferencialen	= razločevalen, razlikovalen
Inhibicija	= zaviranje bakterijske rasti, zaviranje encimske aktivnosti
Inokulum	= vcepek
Kalibriran	= kalibriran izdelek ima natančno določeno obliko, mero
Nefelometer	= naprava za merjenje koncentracije suspendiranih celic s preusmerjanjem svetlobe
Patogen	= bolezenski
Rezistenca	= odpornost: v našem primeru odpornost bakterij proti antibiotikom, kemoterapevtikom in razkužilom
Selektiven	= izbiren
Sev	= mikrobní izolat znotraj vrste ali različka z neko posebno lastnostjo
Validacija	= ugotavljanje, ali je metoda ali proizvod ustrezen za namen uporabe

1 UVOD

1.1 NAMEN RAZISKAVE

Medicinski bakteriološki laboratoriji se ukvarjajo z odkrivanjem povzročiteljev bakterijskih okužb. Bakterije je potrebno pred identifikacijo osamiti iz kužnin, ki jih zdravstvene ustanove pošiljajo v laboratorije. Pri izolaciji in nadaljnji kultivaciji, ter identifikaciji so nujno potrebna bakteriološka gojišča, ta pa morajo ustrezati kriterijem za optimalne rezultate. Eden izmed kriterijev je upoštevanje njihove življenjske dobe. Življenjska doba gojišča je maksimalni čas, v katerem gojišče ohrani vse fizikalno – kemijske lastnosti, esencialne za pravilno rast in karakterizacijo mikroorganizmov. Življenjska doba, ki jo imenujemo tudi trajnost gojišča, je torej obdobje, v katerem je gojišče ustrezno za namen uporabe. Namen uporabe gojišč je »zadostna« rast kolonij ali izražanje testne lastnosti. »Zadostna« rast je v našem primeru lastnost, ki jo opredelimo v odnosu na stanje v trenutku priprave gojišča. Kadar gojišče ni več ustrezno, je velika verjetnost za sledeče posledice: slaba rast bakterij, prevelika ali premajhna inhibicija selektivnih gojišč, napačna identifikacija povzročitelja ali napačno določena občutljivost na testirane antibiotike, t.i. antibiogram.

Namen raziskave je bil preveriti trajnost agarških bakterioloških gojišč pri določenem načinu shranjevanja, ki smo ga izbrali med raznimi priporočili. Gojišča se glede nabave ločijo na dve vrsti: pripravljena gojišča in dehidrirana gojišča. Pripravljena gojišča lahko takoj uporabljamo, saj laboratorij kupi že gotova, imajo pa tudi rok trajanja določen s strani proizvajalca. Rok trajanja je časovna točka, do katere je gojišče ustrezno za namen uporabe. Za dehidrirana gojišča, ki se pripravljajo sproti v laboratoriju, pa je trajnost določena v priporočilih drugih virov (pri tem je upoštevan tip gojišča in način shranjevanja). Za raziskavo smo se odločili, ker so obstoječa priporočila zelo različna in nejasna, pravzaprav trajnost ni konkretno določena. Rok trajanja pripravljenih gojišč pa je določen po protokolu samega proizvajalca, zato smo pri preverjanju upoštevali le-tega.

1.2 HIPOTEZA

Pričakovali smo, da se bodo naši rezultati ujemali s tovarniško določenim rokom trajanja pri pripravljenih gojiščih in da se bo trajnost dehidriranih gojišč ujemala s trajnostjo, določeno v raznih priporočilih. To pomeni, da mora biti gojišče uporabno do roka oz. do konca življenjske dobe in še kakšen teden po tem, ker mora biti trajnost smiselno skrajšana zaradi pojavnosti občutljivejših delov populacije istega bakterijskega seva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OBJAVE DRUGIH AVTORJEV O TRAJNOSTI IN KAKOVOSTI GOJIŠČ

2.1.1 Ločitev kontrole kakovosti gojišča po njegovi pripravi od testiranja življenjske dobe

Pogoj za dobre laboratorijske rezultate so dobra gojišča, zato je potrebno preverjati njihovo kakovost. Kontrola kakovosti je po definiciji metoda, s katero organizacija zagotavlja, da je produkt ali informacija, ki jo daje, najbližje popolnosti (Hyde, 1989). Nichols (1999) jo je ločili na kontrolo kakovosti, ki se vrši takoj po pripravi gojišč, in testiranje trajnosti, kar je podatek o tem, kako dolgo gojišče ohrani kakovost. Kontrola kakovosti takoj po pripravi je uvedena kot laboratorijski rutinski monitoring. Pri izbiri novega gojišča in pri validaciji življenjske dobe se testira trajnost tako, da se ista metoda, kot je za testiranje kakovosti po pripravi, ponavlja v krajših časovnih intervalih do konca izbranega celotnega časa testiranja.

2.1.2 Kontrola kakovosti po pripravi gojišča

2.1.2.1 Kontrola kakovosti pripravljenih gojišč

Pripravljena gojišča prestajajo razne procese in kontrole preden prispejo v laboratorij. Testira se surovi material, uvedene so standardne kontrole v procesu in kvalitativni test kemijskih, ter bioloških parametrov. Uporabnik dobi vse podatke od proizvajalca, zato teh testov ne ponavlja.

2.1.2.2 Kontrola kakovosti dehidriranih gojišč

Gojišča za izolacijo in kultivacijo, ki se pripravljajo v laboratoriju (torej dehidrirana gojišča), se v laboratoriju testirajo na kakovost takoj po pripravi. Sewell (1992) je zapisal, da so minimalni kriteriji testiranja kakovosti gojišč določena v CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), prej NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) dokumentu (NCCLS, 1996). Izbere se ustrezen delež na novo pripravljene serije za merjenje glavnih signifikantnih lastnosti gojišča. Fizikalne lastnosti, ki se testirajo, so: barva, bistrost, trdnost in pH. Obvezno se testira še sterilnost. Vsaka sprememba normalnega stanja in vsako odstopanje je lahko znak, da gojišče ni primerno. Rast se testira s kontrolnimi sevi zbirke ATCC (American Type Culture Collection) in NTCC (National Collection of Type Cultures) in sicer za vsako gojišče z minimalnim izborom sevov, priporočenih s strani Public Health Laboratory Service, krajše PHLS skupine (Nichols, 1999). Avtorji NCCLS (1996) opozarjajo, da so uporabne tudi komercialne oblike sevov ATCC, npr. Culti-Lops (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). Pri selektivnih gojiščih se preveri inhibicija (SIST EN ISO 11133-1, 2002) z nekaterimi

sevi, ki so vključeni v celoten izbor po PHLS. Z ustrezno metodo inokulacije je takšno testiranje primerno za rutinski monitoring.

Westwell (1999) je opisal kontrolo kakovosti testnih gojišč, ki lahko služijo kot presejalni testi, ključni testi za identifikacijo ali testi, ki so vključeni v identifikacijsko shemo. Tudi tukaj se preverja izgled, pH in rast; dodana je še pozitivna in negativna kontrola (Weissfeld in Bartlett, 1987, cit. po Westwell, 1999). Vsak test ima svojo občutljivost in specifičnost. Napake se pojavijo že zaradi tega, ker z njimi merimo kvantitativne reakcije in pričakujemo kvalitativne rezultate. Za teste sta Sneath in Johnson (1972) določila, da pri 10 % pojavnosti napak testi naj ne bi bili vključeni v identifikacijo.

Antibiogrami se testirajo z različnimi metodami (metoda difuzije diskov, MIC metoda, MCB metoda, itd.). Kontrola se rutinsko večkrat izvaja, tudi ko je gojišče že shranjeno, in sicer nekaj dni zapored z več različnimi laboratorijskimi delavci, zaradi prisotnih neizogibnih variacij drugega vzroka. Omenjeni vzroki so: priprava inokuluma, odčitavanje con inhibicije, kontaminacije, shranjevanje diskov, čas pred polaganjem diskov ali čas pred začetkom inkubacije. Za testiranje so uvedene meje velikosti con, znotraj katerih morejo biti rezultati, npr. vsaj 19 od 20 testiranih.

2.1.3 Testiranje življenjske dobe

Življenjska doba je odvisna je od kakovosti posušenih sestavin, procesa priprave (tehtanja s kalibrirano in redno servisirano tehtnico, kakovosti vode, navodil za pripravo, vročinske obdelave kot sterilizacijske tehnike) in pogojev shranjevanja (temperature, svetlobe). Življenjska doba je definirana tako, da se morajo od začetka, do skrajnega roka uporabe ohraniti nujne lastnosti gojišča pri določenih okoliščinah shranjevanja.

Ulisse in sod. (2006) so osnovali preizkus življenjske dobe dvanajstih kritičnih gojišč splošne uporabe [med njimi tudi *Campylobacter* krvni agar (Karmali), *Campylobacter* selektivno gojišče (Skirrow), *Bacillus cereus* agar, *Pseudomonas* CN agar, XLD agar,...]. Interno določeno trajnost, ki pri nobenem gojišču ni presegala 30 dni, so hoteli podaljšati. Razlagali so, da distributerji gojišč velikokrat naznanijo življenjsko dobo tako kratko, da je nekompatibilna s potrebami uporabnika.

Izbrana gojišča so po pripravi ovili v folije in shranili v hladilniku s temperaturnim območjem (3 – 5) °C.

Testirali so parametre:

- izgubo vode s tehtanjem
- pH
- sterilnost
- rast z uporabo kontrolnih sevov zbirke ATCC

Upoštevali so kriterij 70 % rasti pri uporabi ekometrične metode; tako določeno mejo še sprejete rasti, ki znaša 70 % od rasti na svežem gojišču je tudi Nichols (1999) omenil pri opisu Miles & Misra metode. Ostali kriteriji v Ullisse in sod. (2006) so bili: popolna inhibicija nekaterih sevov pri selektivnih gojiščih, upad teže manj ali enako 5 %, popolna sterilnost vseh plošč in vrednost pH, ki je morala biti v mejah tolerance vsakega posameznega gojišča. Poskus so ustavili po nekaj tednih izvajanja, ko je pH izpadel iz mejnega intervala. Zaključili so precejšnjo razliko med »starimi« in dobljenimi trajnostmi. Določili so novo življenjsko dobo posameznih gojišč, ki je ustrezala operativnim potrebam (pri vsakem gojišču je nova doba daljša kot prejšnja in znaša kar 90 dni, pri nekaterih gojiščih celo 120 dni). Dobljena doba je rahlo znižana, kot so jo dali rezultati, kar je varnostni faktor za napake med shranjevanjem.

2.1.4 Transport in shranjevanje, ter življenjska doba

2.1.4.1 Transport in shranjevanje, ter življenjska doba pripravljenih gojišč

V NCCLS (1996) je objavljeno, da tovarniško določen rok trajanja nabavljenih materialov sloni na učinkovitosti, ki je zagotovljeno s strani proizvajalca. Ta pa mora upoštevati pogoje transporta in shranjevanja, ter minimalizirati število vmesnih postaj. Med celotnim procesom se ne sme izgubiti vlažnost in material mora biti ustrezno zaščiten pred toploto in mehanskimi poškodbami. Vsakršne napake je uporabnik dolžan zabeležiti in obvestiti proizvajalca, da slednji lahko uvede ustrezne korektivne ukrepe. Hyde (1989) omenja pomembnost nabave materialov, kar pomaga kontrolirati zalogo, preprečiti kvarjenje in spreminjanje blaga (v našem primeru gojišč ali ostalih dodatkov in reagentov). Za vsakega dobavitelja je določen red naročila, velikost enote, stroški in če je potrebno, še rok trajanja.

2.1.4.2 Transport in shranjevanje, ter življenjska doba dehidriranih gojišč

Pri zagotovitvi kakovosti dehidriranih gojišč v laboratoriju ne smemo pozabiti na pravilen postopek nabave in shranjevanja. Prostor shranjevanja in pravi pogoji so pomembni za zagotovitev lahkega dostopa do materialov in njihovega točnega vodenja, ter seveda preprečitev kvarjenja. Vandepitte in sod. (2003) priporočajo uporabo dehidriranih gojišč, saj je transport in shranjevanje lažje, kakovost pa višja od pripravljenih gojišč.

Po Hyde-u (1989) se dehidrirana gojišča v prahu lahko shranjujejo v optimalnih pogojih 2 - 3 leta, če še niso odprta, in 6 mesecev po prvem odprtju. Pri pogojih moramo biti pozorni na vročino, svetlobo in vlago, saj so praški dehidriranih gojišč na te dejavnike zelo občutljivi. Dobro je pred uporabo preveriti kakovost 2 leti starega posušenega gojišča. Če se pojavijo kakšne vidne spremembe, praška ne uporabimo. Po Vandepitte in sod. (2003) so taka gojišča uporabna 6 mesecev do 1 leta, po odprtju pa do 2 meseca. Shranjevanje dehidriranih gojišč opisujejo podobno kot Hyde (1989). Če je vse v redu, pripravimo gojišča iz dehidriranih praškov po navodilih proizvajalca.

Pripravljena gojišča iz dehidriranih praškov je pomembno zavarovati pred svetlobo in toploto, zato je nujno shranjevanje v hladilniku. Petrijevke s pripravljenim gojiščem je po Hyde-u (1989) najboljšje shraniti na 4 °C, kjer zdržijo do 10 dni; s tem, da se selektivna gojišča začnejo kvariti že prej (sušenje zelo skoncentrira inhibitorne dodatke, ki potem začnejo delovati na vse ostale bakterijske vrste, ali pa se antibiotik razgradi in selektivnost upade). Življenjska doba tako shranjenih gojišč opisujejo Vandepitte in sod. (2003) v odvisnosti od uporabljene embalaže. Tako so gojišča v epruvetah uporabna 2 - 3 tedne (to so nekatera testna gojišča), posode s privitim pokrovom zdržijo tudi do 3 mesece in gojišča v petrijevkah, ki so shranjene v vrečke, okrog 4 tedne od priprave. 4 tedne je bistveno več od 10 dni, ki jih navaja Hyde (1989). Miller (1991) je podal 8 - 9 tednov življenjske dobe gojišč v petrijevkah, ki so prav tako shranjene v vrečke in v hladilnik; in skrajšal dobo na 2 tedna, če petrijevke niso v vrečkah. Sewell (1992) je navedel življenjsko dobo za enako shranjena gojišča do 16 tednov; za gojišča v epruvetah pa do 12 mesecev (za gojišča v epruvetah brez suplementov celo 18 mesecev) od priprave. Če pa pogledamo v standarde (SIST EN ISO 11133-1, 2002), pa je določeno, da trdna gojišča v vrečkah lahko hranimo v hladilniku najdlje 1 teden.

Vse navedene življenjske dobe so zelo različne. Ullisse in sod. (2006) so imeli namen pri testiranju življenjske dobe gojišč primerjati svoje rezultate z ostalimi, vendar navajajo, da nobeni bibliografski podatki, ki bi poročali o študijah drugih avtorjev na isto temo, niso na voljo.

2.2 IZBRANA BAKTERIOLOŠKA GOJIŠČA

2.2.1 Delitev gojišč

Proučevanje smo omejili na trdna gojišča, ki vsebujejo agar (v petrijevkah ali epruvetah). Tekočih gojišč nismo obravnavali. Gojišča lahko s stališča namena uporabe delimo v 2 skupini:

- gojišča za izolacijo in kultivacijo bakterij,
- gojišča za teste, npr. za antibiogram in identifikacijske teste.

Gojišča za izolacijo in kultivacijo so namenjena nacepiti kužnin in rasti bakterij na njih. Na agarjih tako dobimo kolonije, ki so izhodišče za nadaljnjo delo. Prilagojena so za rast različnih vrst bakterij. Vsako gojišče je namenjeno rasti eni ali več ključnim bakterijskim vrstam in skupinam, ki so možni povzročitelji okužb. Osnovana so tako, da je dosežena pravilna rast in karakterizacija specifičnih bakterij, ter zavirata rast nepomembnih in za identifikacijo motečih bakterijskih vrst.

Gojišča za izolacijo in kultivacijo so substrati z različno kompleksnostjo, ki je formulirana za določeno bakterijsko populacijo. Zadostujejo prehranjevalnim potrebam bakterij s tem, da vsebujejo vire dušika, ogljika, vodika, kisika, žvepla, fosforja, natrija, kalija, magnezija, železa in mangana v količinah za življenje in razmnoževanje. Osnovne komponente gojišč so vsebovane glede na tip gojišča in so razdeljene v sledeče skupine: peptoni, ogljikovodiki, indikatorji, selektivni agensi, agensi za zgoščevanje, posebni substrati in encimski substrati.

Vsa bakteriološka gojišča najprej delimo na osnovna in specialna. Sestavine osnovnih gojišč zadoščajo za rast večine heterotrofov. Če so organizmi, ki jih želimo izolirati, prehransko bolj zahtevni, osnovna gojišča izboljšamo z ustreznimi substrati in dobimo obogatena gojišča. Med specialna gojišča pa uvrščamo bogatitvena, selektivna, diferencialna in minimalna gojišča. Bogatitvena gojišča med celotno nacepljeno populacijo bakterij podpirajo rast slabše rastočim vrstam s pomočjo dodanih njim ključnih substratov. Selektivna gojišča vsebujejo tudi agense za inhibicijo nekaterih vrst, da lahko naredimo selekcijo v nacepljeni populaciji. Na diferencialnem gojišču ne pride do inhibicije ali pospešene rasti, na njem se porasle vrste dobro ločujejo med seboj po vidnih fenotipskih lastnostih (barvi in obliki kolonij, spremembi gojišča okrog kolonij, itd.). Pogosto so sestavine tako izbrane, da gre hkrati za selektivno in diferencialno gojišče. Minimalna gojišča pa imajo odvzete nekatere osnovne rastne faktorje, tako da nekateri sevi niso sposobni tvoriti kolonij na njih. Ponavadi zrastejo le divji tipi, ki so v populaciji.

Ko iz preiskane kužnine v laboratoriju dobimo bakterijske kolonije na teh gojiščih (lahko tudi več sumljivih vrst povzročiteljev), se delo nadaljuje z nacepitvijo teh kolonij na testna gojišča ali z izvedbo direktnih testov za identifikacijo. Izraz »testno gojišče« uporabljamo za gojišča, ki so del testa: to je postopek, pri katerem ugotavljamo lastnost kolonij, npr. lastnost za identifikacijo izolatov ali občutljivost na antibiotike (t.j. antibiogram).

2.2.2 Gojišča za izolacijo in kultivacijo

2.2.2.1 Izbrano gojišče: agar Campy (Oxoid, 2009a)

Za pripravo *Campylobacter* gojišča se uporabljajo naslednje osnove:

1. *Campylobacter* Blood-Free Selective Medium
2. CCDA Selective Supplement

Campylobacter gojišče je trdo selektivno gojišče za izolacijo bakterije *Campylobacter jejuni*, človeški povzročiteljici gastroenteritisa. Prirejeno je le za rast omenjene vrste. Bakterija se izolira iz vzorcev blata, lahko pa tudi iz vzorcev hrane. Prvo selektivno izolacijo tega mikroorganizma je leta 1972 objavil Dekeyser. Skirrow je izolacijo poenostavil z dodanimi selektivnimi snovmi za redukcijo rasti bakterij iz normalne črevesne flore. Blaser pa je delno do kompletno inhibiral rast gliv z dodatkom amfotericina B. Selektivne snovi so nadomestili predhodno membransko filtracijo, kot jo je opisal Dekeyser. S tem se lahko izolacija vrši direktno iz vzorca. Modificirano CCDA gojišče je formuliral Bolton, ki je kri nadomestil z ogljem in izboljšal selekcijo z zamenjavo antibiotika. Gojišče je trdno, črne barve, bakterija *C. jejuni* tvori na njem nehemolitične ploščate sive drobne kolonije, nekatere vrste so rumenorjave do rahlo roza barve. Vsebuje snovi za vezavo kisikovih derivatov, ki so toksični za ciljno bakterijo.

Pomembno je, da se vzorec blata nacepi na gojišče v 4 urah, če pa nacepitev v tem času ni možna, pa se mora vzorec hraniti v transportnem gojišču Cary Blair Transport Medium.

Rast posameznih vrst mikroorganizmov:

- *Campylobacter jejuni*: dobra rast
- *Escherichia coli*: kompletna inhibicija
- *Enterococcus faecalis*: kompletna inhibicija
- *Candida albicans*: kompletna inhibicija.

2.2.2.2 Izbrano gojišče: agar CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient Agar) (Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003; Bio-Rad, 2000; Biolife, 2003)

Agar CLED je trdo diferencialno gojišče, namenjeno kultivaciji in oceni skupnega števila mikroorganizmov v urinu.

Formulo CLED sta razvila Mackey in Sandys tako, da omogoča optimalno rast urinskih patogenih bakterij in njihovo diferenciacijo. Gre torej za obogateno in hkrati diferencialno gojišče. Agar CLED loči koliformne bakterije na podlagi fermentacije dodane laktoze. Ob pH indikatorju »Brom Thymol Blue«, ki daje gojišču značilno zeleno barvo, obarvajo fermentacijski produkti kolonije in gojišče okrog njih rumeno. Kolonije bakterij, ki ne fermentirajo laktoze, so modrozeleno barve. Agar ima nizko vsebnost elektrolitov, kar zmanjša rojenje bakterijskih vrst *Proteus* spp. in s tem onemogoča, da bi spregledali pridružene povzročitelje okužb.

Rast posameznih bakterijskih vrst:

- *Escherichia coli*: dobra rast, rumene barve s temnejšim centrom (nekateri ne fermentirajo laktoze, zato so modrozeleno barve)
- *Klebsiella pneumoniae*: dobra rast, rumene barve, zelo sluzne kolonije
- *Proteus* spp.: dobra rast, modre barve, rojenje zavrto; ponavadi so manjše kolonije od *E. coli*
- *Enterobacter* spp.: dobra rast, rahlo rumene ali celo modrozeleno barve
- *Pseudomonas aeruginosa*: dobra rast, zelene in mat kolonije
- *Staphylococcus aureus*: dobra rast, rahlo rumene ali celo temno rumene barve
- KNS: rumene ali bele drobne kolonije
- *Enterococcus faecalis*: dobra rast, rumene drobne kolonije

2.2.2.3 Izbrano gojišče: MAC ali MacConkey agar

(Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003; Bio-Rad, 2000; Biolife, 2003)

MacConkey agar je trdo selektivno – diferencialni medij, namenjen izolaciji po Gramu negativnih enterobakterij, npr. bakterijskih rodov *Salmonella*, *Shigella* in *Escherichia*.

Bistvena sestavina MacConkey agarja je žolčna sol, ki omogoča selektivnost na ta način, da inhibira neenterične bakterije. Dodano je še barvilo »Crystal Violet«, ki pa inhibira po Gramu pozitivne koke, vendar le delno, saj se po dolgi inkubaciji lahko pojavijo kolonije rodu *Enterococcus*. Z dodatnim barvilom »Neutral Red« pa nastane diferenciacija med laktoza-fermentirajočimi bakterijami in tistimi, ki laktoze ne razgrajujejo. Produkti po fermentaciji laktoze sprožijo padec pH, čemur sledi adsorpcija barvila v kolonije in njihova obarvanost rdeče. Kolonije ostalih bakterijskih vrst niso obarvane. Zavrto je rojenje.

MacConkey agar je splošno v uporabi za selektivno izolacijo po Gramu negativnih bacilov za klinične in druge namene. Priporočen je v preiskavah hrane, vzorcih vode in tudi urina.

Koncentracija žolčnih soli v kombinaciji z barvilom »Neutral Red« spodbuja rast bakterijskih vrst rodov *Salmonella* in *Shigella*. Kasneje se je začelo gojišče uporabljati za diferenciacijo bakterijske vrste *Salmonella typhi* od drugih koliformov.

Rast posameznih bakterijskih vrst:

- *Enterobacter aerogenes*: dobra rast, roza ali rdeče obarvane kolonije
- *Escherichia coli*: dobra rast, roza ali rdeče obarvane kolonije
- *Proteus mirabilis*: dobra rast brez rojenja, kolonije so brezbarvne
- *Salmonella enteritidis*: dobra rast, kolonije so brezbarvne
- *Shigella flexneri*: dobra rast, kolonije so brezbarvne
- *Staphylococcus aureus*: inhibirana rast
- *Enterococcus faecalis*: zelo slaba rast ali celo popolna inhibicija.

2.2.2.4 Izbrano gojišče: agar ORSAB (Oxacillin Resistance Screening Agar Base) (Oxoid, 2009b)

Za pripravo ORSAB gojišča se uporabljajo naslednje osnove:

1. Oxacillin Resistance Screening Agar Base
2. ORSAB Selective Supplement

Gojišče ORSAB je trdo gojišče, namenjeno izolaciji proti meticilinu odpornih bakterijskih vrst *Staphylococcus aureus*, t.i. MRSA, direktno iz kužnin.

Agar ORSAB je selektiven, saj vsebuje visoko koncentracijo soli (55 g/L), kar inhibira rast ostalim bakterijskim vrstam, razen *S. aureus*. Dodan je antibiotik oksacilin (namesto meticilina), ki zavira rast vsem občutljivim vrstam *S. aureus*, t.i. MSSA. Tako tvorijo kolonije na ORSAB agarju le sevi MRSA. Dodan pa je še polimiksin B za inhibicijo bakterijskih vrst, ki lahko rastejo kljub visoki koncentraciji soli (na primer rod *Proteus*). Gojišče vsebuje manitol in barvilo »Aniline Blue«, zato so kolonije MRSA zaradi fermentacije manitola intenzivno modre barve.

Rast posameznih bakterijskih vrst:

- *Staphylococcus aureus*, sev MRSA: dobra rast, modre kolonije
- *Staphylococcus aureus*, sev MSSA: ni rasti
- *Escherichia coli*: ni rasti.

2.2.2.5 Izbrano gojišče: agar SS (Salmonella Shigella agar)

(Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003; Bio-Rad, 2000; Biolife, 2003)

Agar SS je trdo, visokoselektivno in diferencialno gojišče za izolacijo bakterijskega rodu *Salmonella* in nekaterih vrst rodu *Shigella*.

Agar SS daje najboljše rezultate v primerjavi z drugimi gojišči pri izolaciji bakterijskih rodov *Shigella* in *Salmonella* (po Mayfield-u in Goeber-ju). Gojišče je primerno za izolacijo bakterij z direktno inokulacijo vzorcev pacientov z drisko. Lahko pa se izolirajo bakterije tudi iz zdravih nosilcev.

Prvotno se je agar SS uporabljal za izolacijo omenjenih rodov, danes pa bolj za diferenciacijo enterobakterij, ker sta inhibirani dve ciljni vrsti: *Shigella dysenteriae* in *Shigella sonnei*. Diferenciacija poteka na podlagi fermentacije laktoze. Bakterijske kolonije, ki fermentirajo laktozo, se obarvajo rdeče ob pH indikatorju »Neutral Red«. Kolonije bakterij, ki ne fermentirajo laktoze, ostanejo brezbarvne. Agar SS ima dodane inhibitorje rasti po Gramu pozitivnih bakterij in nekaterih nepatogenih enterobakterij.

Inhibitorji so:

1. natrijev citrat
2. žolčne soli – s tem so inhibirane po Gramu pozitivne bakterije
3. barvilo »Brilliant Green«.

Dodatna diferenciacija je omogočena zaradi redukcije sulfata, ki povzroči nastanek črnega centra kolonij sulfatnih reducentov. Črni center pomeni namreč prisotnost vodikovega sulfata (H_2S), ki je končni produkt redukcije.

Rast posameznih bakterijskih vrst:

- *Salmonella* spp. – dobra rast, kolonije brez barve, možen črni center
- *Shigella* spp. – dobra rast, kolonije brez barve
- *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp. – rdeče kolonije po podaljšani inkubaciji, drugače ni rasti
- *Proteus* spp. – rast brez rojenja, kolonije brez barve, možen črni center
- *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Enterococcus* spp. – ni rasti.

2.2.2.6 Izbrano gojišče: agar XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar)

(Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003; Bio-Rad, 2000; Biolife, 2003)

Gojišče XLD je namenjeno selektivni izolaciji patogenih enterobakterij (predvsem rodov *Salmonella* in *Shigella*) iz kužnin z mešano floro. Je standardno trdo gojišče za izolacijo bakterij rodov *Shigella* in *Salmonella*.

Agar je sestavljen iz osnove po Taylor-ju z dodatki:

1. natrijev deoksiholat (sodium deoxycholate)
2. natrijev tiosulfat (sodium thiosulphate)
3. železov amonijski citrat.

Natrijev deoksiholat je inhibitor po Gramu pozitivnih bakterij, ostala 2 dodatka sta substrata za biokemične reakcije.

XLD je zelo dobro diferencialno gojišče, saj ločevanje pogojujejo 3 biokemične reakcije:

1. ksilozna fermentacija, pri kateri nastali produkti zakisajo gojišče. V XLD agarju je dodana ksiloza in barvilo »Phenol Red« kot pH indikator, ki se ob zakisanju obarva rumeno.
2. dekarboksilacija lizina (dodan lizin) ob kateri se kolonije obarvajo rdeče (pH je zvišan).
3. produkcija vodikovega sulfida (H_2S) iz natrijevega tiosulfata, kar je inducirano ob železovem amonijskem citratu. Nastali H_2S je viden kot črni center v koloniji.

XLD se najpogosteje uporablja za izolacijo bakterij rodu *Shigella*, ki počasi fermentira ksilozo ali pa sploh ne, kar pomeni, da ne pride do zakisanja, zato so kolonije prosojne oz. zaradi gojišča rdeče barve (v nadaljnje bomo pisali rdeče). Bakterije rodu *Salmonella* pa fermentirajo ksilozo, vendar dekarboksilirajo lizin, zato pride do preobrata pH, kar jih loči od ostalih nepatogenih fermentatorjev ksiloze. Kolonije so potem tudi rdeče namesto rumene barve.

Rast posameznih bakterijskih vrst:

- *Salmonella arizonae*: dobra rast, kolonije rdeče barve, ponavadi s črnim centrom
- *Salmonella* Typhimurium: dobra rast, kolonije rdeče barve, ponavadi s črnim centrom
- *Shigella sonnei*: dobra rast, rdeče kolonije
- *Escherichia coli*: slaba rast, rumene kolonije, ali sploh ni rasti
- *Citrobacter* spp.: dobra rast, rumene kolonije s črnim centrom
- *Klebsiella* spp.: dobra rast, rumene kolonije
- *Proteus mirabilis*: dobra rast, rumene kolonije, možen črni center
- *Enterobacter aerogenes*: dobra rast, rumene kolonije, žolčni precipitat
- *Serratia* spp.: dobra rast, rumene kolonije
- *Providencia alcalifaciens*: dobra rast, rdeče kolonije
- *Staphylococcus aureus*: inhibirana rast.

Pojavi se problem diferenciacije pri nekaterih vrstah rodu *Pseudomonas*, ki tudi tvorijo rdeče kolonije na XLD gojišču. Prav tako pa tudi vrsti *Providencia rettgeri* in *Morganella morganii* ne fermentirata ksiloze, niti ne producirata H_2S , zato so kolonije podobne kot pri vrstah rodu *Shigella*.

2.2.2.7 Izbrano gojišče: agar MH (Mueller Hinton)

(Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003)

MH je trdo gojišče, ki je standardizirano za testiranje občutljivosti aerobnih in fakultativno aerobnih bakterij za antimikrobne agense.

Gojišča MH so bila prvotno razvita za gojenje bakterijskega rodu *Neisseria*, vendar je bilo kasneje izbrano za antibiogram, ko se je to področje šele razvijalo. To pa zato, ker se pri tem zaradi definirane koncentracije magnezijevih in kalcijevih kationov in nizke vsebnosti timina in timidina zelo dobro obnese. MH je tako postalo testno gojišče. V uporabi pa je tudi kot osnovno gojišče za pripravo bakterijskih inokulumov.

Tako smo tudi mi uporabljali to gojišče kot neko »navadno« gojišče in je služilo za primerjavo različnih metod za merjenje rasti, ki smo ji rabili pri testiranih gojiščih za izolacijo in kultivacijo.

2.2.3 Testna gojišča za identifikacijo in za antibiogram

2.2.3.1 Izbrano gojišče: agar DNAA

(Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003)

Agar DNAA je trdo gojišče za določanje produkcije in aktivnosti encima deoksiribonukleaze (krajše DNA-zne aktivnosti) mikroorganizmov, npr. med vrstami znotraj rodu *Staphylococcus*. Test na DNA-zo je ključen tudi za ločevanje bakterijske vrste *Serratia marcescens* od ostalih koliformnih bakterij.

Test poteka tako, da bakterijska kultura na gojišču v petrijevki depolimerizira prisotno DNA z reakcijo hidrolize. Po inkubaciji razgradnja DNA še ni vidna; dokažemo jo z dodatkom klorovodikove kisline (1 M HCl), ki jo nakapljamo na poraslo mesto. Če je DNA razgrajena, se bo 5 min zatem naredila bistra cona na gojišču okrog kulture, če pa bakterija nima aktivne DNA-ze, pa bo gojišče pomotnelo.

Rezultati DNA-znih testov nekaterih vrst:

▪ <i>Serratia marcescens</i>	+
▪ <i>Staphylococcus aureus</i>	+
▪ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
▪ <i>Streptococcus pyogenes</i>	+

2.2.3.2 Izbrano gojišče: GOI (MIO = angl. Motility Indole Ornithine Medium) (Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003)

GOI je testno gojišče za določanje gibljivosti (=G), ornitinske dekarboksilazne aktivnosti (=O) in produkcije indola (=I) enterobakterij.

Gojišče vsebuje agar, vendar ga uvrščamo med poltrda gojišča. Formulo sta razvila Ederer in Clark z namenom zmanjšanja števila testov. Združila sta tri teste v eno gojišče z bistvenimi sestavinami: dekstroza, ornitin, pH indikator »Brom Cresol Purple«, triptofan:

1. Gibljivost se v epruveti vidi kot motnost medija ali kot rast, ki difundira od linije inokulacije; negibljive kulture ne kažejo te difuzije, ampak rastejo le ob črti inokulacije.
2. Pozitivna ornitinska reakcija je vidna kot vijolična barva medija. Vijolična je tudi osnovna barva GOI agarja, vendar je v njem še dekstroza, katera ob fermentaciji zakisa gojišče in pH indikator porumeni. To so optimalni pogoji za dekarboksilacijo ornitina, kar pa spet zviša pH in indikator ga obarva nazaj vijolično. Če testirana kultura ornitina ne dekarboksilira, ostane medij rumene barve kot negativen rezultat.
3. Indol test temelji na produkciji indola iz triptofana. Indol na koncu določimo z dodatkom Kovacs-evega reagenta na vrh gojišča v epruveti. Če je indol prisoten, nastane roza ali rdeča obarvanost, če pa ne, pa ostane reagent rumene barve. Torej je pozitiven rezultat na indol rdeča ali roza oborina, medtem ko rumena oborina pomeni, da indol ni nastal. Zelo pomembno je, da reagent dodamo ko že odčitamo ostale rezultate, kajti lahko je moteno odčitavanje gibljivosti in ornitinske reakcije.

Rezultati testov gojišča GOI s posameznimi sevi:

	G	O	I
▪ <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	+	-	+
▪ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+
▪ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
▪ <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	+/-*	-	+

*Pri bakteriji *Proteus mirabilis* je gibljivost odvisna od temperature inkubacije: pri 20 °C je bakterija najbolj gibljiva, pri 35 °C pa je gibljivost lahko odsotna.

2.2.3.3 Izbrano gojišče: agar King B (Bio-Rad, 2000)

Gojišče King B se uporablja za ugotavljanje sinteze pigmenta pioverdina s strani bakterije *Pseudomonas aeruginosa* ali katere druge vrste rodu *Pseudomonas*. Uporablja se paralelno tudi agar King A, ki je prirejen za določanje barvila piocianin.

Agar King B je trdo gojišče, v uporabi kot poševni agar v epruveti. Vsebuje magnezijev sulfat, ki aktivira pioverdin tako, da dobi gojišče po inkubaciji fluorescentno zeleno ali rumeno barvo. Prisoten je fosfat za inhibicijo produkcije piocianina. Fluorescenco preverimo po inkubaciji s pomočjo UV žarnice. Pozitivni rezultat agarja King B je njegova obarvanost na zeleno ali rumeno barvo in prisotnost fluorescence.

Rezultati testov na pioverdin pri posameznih sevih:

- | | |
|-----------------------------------|---|
| ▪ <i>Escherichia coli</i> : | - |
| ▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : | + |

2.2.3.4 Izbrano gojišče: agar MHR (MHR = rdeči Mueller Hinton) (Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media, 2003)

MHR je standardizirano trdo gojišče za testiranje občutljivosti zahtevnih bakterij na antimikrobne agense po navodilih CLSI. MHR je obogateno gojišče MH (Mueller Hinton) z dodatkom 5 % ovčje krvi.

Kompozicija MHR je standardizirana za dobre rezultate bakterijske občutljivosti tako, da ima definirano koncentracijo kalcijevega klorida, magnezijevega klorida in cinkovega klorida. Velik vpliv na rezultate imajo magnezijevi in kalcijevi kationi. Prav tako sta pomembna še dodana timin in timidin. Največkrat se testi izvajajo z metodo difuzije diskov po Bauer-Kirby proceduri, ki jo opisuje CLSI (2006a); uporablja pa se tudi dilucijska metoda. V naši nalogi smo preverjali Bio Mérieux-ovo gotovo gojišče, poimenovano MHS s tovarniško določenim rokom trajanja.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Uporabljena bakteriološka gojišča

Testirali smo 6 gojišč za izolacijo in kultivacijo bakterij in 4 testna gojišča, ki se uporabljajo pri identifikaciji in določanju občutljivosti bakterij za antibiotike. Izbrali smo gojišča, ki so v uporabi za najpogostejše izolirane seve v kliničnih laboratorijih. Izbrano število gojišč bi moralo zadostovati za primerjavo dobljenega s priporočenim rokom trajanja.

Izbrana gojišča, ki so naštet v preglednici 1, se med seboj zelo razlikujejo po rastnih lastnostih za iste bakterijske seve, saj ima vsako gojišče svojo nalogo v izolaciji in nadaljnji identifikaciji bakterijskih povzročiteljev bolezni. V preizkušanju rasti smo upoštevali koeficiente rasti za vsako kombinacijo izbrano gojišče – izbran sev bakterij.

Vsa gojišča razen MHS smo pripravili po navodilih proizvajalca. Naredili smo tudi kontrolo kakovosti, kot je rutinsko delo po vsaki pripravi nove serije gojišča. Kontrola vključuje preverjanje pH, sterilnost, rast in ponekod še določeno inhibicijo; vse mora ustrezati optimalnosti gojišča, še preden to pride v uporabo. Sestavine dehidriranih gojišč in reagenti, ki se rabijo pri testnih gojiščih, so prav tako ustrezne kakovosti, zagotovljene s strani proizvajalca glede na opisana dejstva v poglavju »2 Pregled objav«. Vsa gojišča smo shranjevali v hladilniku pri (2 – 8) °C. Vrečk nismo uporabili, čeprav se praviloma v njih pakirajo gojišča, ki se dlje časa shranjujejo, da se najbolj prepreči izguba vode. Za gojišča, ki se porabijo v 2 tednih, pa vrečk ni potrebno uporabiti. Naše testiranje je sicer trajalo dlje časa, vendar smo želeli dokazati, da je gojišče uporabno dlje od npr. 10 dni, kot je to določeno v eni od pregledane literature. Nas je zanimalo, kakšen je razpon življenjske dobe gojišč, saj je zelo malo znanega o trajnosti gojišč. Čas testiranja smo podaljšali vsaj na 4 tedne; gojišča za teste smo testirali še dlje, ker na dejavnike kvarjenja niso tako občutljiva.

Preglednica 1: Uporabljena bakteriološka gojišča

Gojišče	Proizvajalec
Campy (agar za bakterije rodu <i>Campylobacter</i>)	Oxoid (Cambridge, Velika Britanija)
CLED (Cystine Lactose Deficient Agar)	Biolife (Milano, Italija)
MAC (MacConkey agar)	Biokar (Pantin, Beauvais, Francija)
ORSAB (Oxacillin Resistance Screening Agar Base)	Oxoid (Cambridge, Velika Britanija)
SS (Salmonella Shigella agar)	Biolife (Milano, Italija)
XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, ZDA)
DNAA (agar za testiranje DNA-ze)	Oxoid (Cambridge, Velika Britanija)
GOI (gojišče za gibljivost, ornitinskega in indolnega testa)	Sigma Aldrich (St. Louis, ZDA)
King B	Sigma Aldrich (St. Louis, ZDA)
MHS (Mueller Hinton z ovčjo krvjo)	Bio Mérieux (Marcy l'Etoile, Francija)

3.1.2 Kontrolni sevi

Izbrana gojišča smo testirali s čisto kulturo sevov ATCC in RLS. ATCC so sevi s stabilnimi lastnostmi iz zbirke (American Type Culture Collection), RLS pa referenčni laboratorijski sevi, ki izvirajo iz zunanjih kontrol kakovosti laboratorija, t.i. HPA. Namesto sevov, ki nam kot ATCC niso bili na voljo, smo iz finančnih razlogov uporabili RLS seve, ki vsebujejo vse potrebne definirane lastnosti. Kontrolne seve smo izbrali glede na namen uporabnosti gojišča tako, da je bilo vsako gojišče testirano s ključnimi bakterijskimi vrstami, katerim je njegova sestava prilagojena. Nekatera gojišča s selektivno funkcijo smo testirali še s sevi, katerih rast mora biti zavirna za zagotovitev delovanja vsebovanih inhibitorjev. Upoštevali smo priporočila skupine PHLS (Public Health Laboratory Service) iz Nichols (1999), vendar pa smo po lastni presoji dodali kakšno bakterijsko vrsto, ki se večkrat pojavlja kot povzročitelj okužb. Uporabili smo našete seve, ki jih v nadaljevanju imenujemo kar standardni sevi:

- *Campylobacter jejuni* ATCC 29428

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* RLS
- *Salmonella* Typhimurium RLS
- *Shigella flexneri* RLS
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300
- *Staphylococcus epidermidis* RLS
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- *Proteus mirabilis* RLS
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.1.3 Drugi material

- ❖ ampule z 2 ml fiziološke raztopine, t.j. 0,85 % NaCl (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Francija)
- ❖ nefelometer Densimat (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Francija)
- ❖ epruvete z 10 ml sterilne fiziološke raztopine
- ❖ 1000 µl pipeta s sterilnimi nastavki (Biohit PLC, Helsinki, Finska)
- ❖ 100 µl pipeta s sterilnimi nastavki (Transferpette, Wertheim, Nemčija)
- ❖ 50 µl pipeta s sterilnimi nastavki (Transferpette, Wertheim, Nemčija)
- ❖ 25 µl pipeta s sterilnimi nastavki (Transferpette, Wertheim, Nemčija)
- ❖ 10 µl pipeta s sterilnimi nastavki (Transferpette, Wertheim, Nemčija)
- ❖ 10 µl kalibrirana bakteriološka zanka (Golias sp., Ljubljana, Slovenija)
- ❖ 1 µl kalibrirana bakteriološka zanka (Golias sp., Ljubljana, Slovenija)
- ❖ inokulacijska bakteriološka zanka, inokulacijska igla in gorilnik
- ❖ inokulacijska hokejka in razkužilo za hokejke

- ❖ sterilni brisi
- ❖ kalibrirana tehtnica Exacta EB300 (Exacta, Železniki, Slovenija)
- ❖ 1 M HCl, pripravljen v laboratoriju ZZV Murska Sobota po navodilu *505na0603 Iz003 1M HCl reagent*
- ❖ Kovacs-ev reagent, pripravljen v laboratoriju ZZV Murska Sobota po navodilu *505na0600 Iz001 Indol reagent*
- ❖ UV svetilka Manwood (Mesdan – Lab, Raffa di Puegnago, Italija)
- ❖ pinceta
- ❖ ravnilo za odčitavanje con
- ❖ 4 diski antibiotikov za antibiogram (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NS, ZDA)
 - o PENICILIN (P10), lot 5276018
 - o ERITROMICIN (E15), lot 5334897
 - o KLINDAMICIN (CC2), lot 6013601
 - o OKSACILIN (OX1), lot 5318721

Diske z antibiotiki smo za našo nalogo posebej pripravili in hranili, ker so občutljivi na vlago, toploto in svetlobo. S tem smo se hoteli izogniti napačnim rezultatom zaradi njihove oslabitve. Odprli smo sveže pakete z navedenim lotom in diske posamično zaprli v majhne ependorfke z dodanim dehidracijskim sredstvom. V vsaki ependorfki so bili 4 diski vseh možnih antibiotikov, da so ustrezali uporabi za vsak eksperiment posebej. Tako zapakirane diske smo potem še zamrznili in s tem obdržali njihovo optimalno stanje. Diske smo odmrznili na sobni temperaturi tik pred njihovo uporabo.

3.2 METODA

3.2.1 Priprava sevov

Pri kontroli kakovosti in tudi pri našem preverjanju trajnosti gojišč je pomembno, da so uporabljeni sevi na voljo vedno v svežih kulturah. Vzdrževanje kontrolnih sevov mora biti standardizirano. Postopek je ponazoril Hyde (1989). Pomembna je zagotovitev, da ti sevi ohranijo rastne karakteristike, in da imajo kulture minimalno možnost kontaminacije.

Za dolgoročno shranjevanje smo kulture ATCC in RLS sevov zamrznili pri -70°C . ATCC kulture so liofilizirane in smo jih obnovili po navodilih ATCC. RLS kulture smo zamrznili kot suspenzijo z dodatkom krioprotektanta. Pred uporabo smo kulture čim hitreje odmrznili in jih nacepili na trda gojišča (uporabili smo gojišča z dodano krvjo) za pridobitev izoliranih kolonij čiste kulture. To pomeni, da smo morali najprej dobiti posamezne kolonije določenega seva in nato po eno kolonijo precepiti na sveže gojišče do posameznih kolonij čiste kulture. Čiste kulture smo pripravili tako, da smo jih že naslednji dan lahko uporabili za pripravo redčin za naš preizkus trajnosti izbranih gojišč. Del teh kultur pa smo nacepili na poševne agarje. Poševne agarje kontrolnih sevov smo čez noč inkubirali, nato smo jih dali v hladilnik, kjer se lahko shranjujejo do 4 tedne. Tako shranjeni sevi se uporabljajo za kontrolo kakovosti ki se vrši takoj po pripravi gojišč, seveda spet po pridobitvi kolonij čiste kulture na trdem gojišču (v našem primeru se testirajo gojišča enkrat na začetku, ko se vsa pripravijo). Poševni agar ni primeren za zahtevnejše seve.

Za vsak preizkus (vsak teden) smo odmrznili sveže suspenzije kontrolnih sevov, da smo zagotovili enake pogoje rasti le-teh.

3.2.2 Preverjanje trajnosti gojišč za izolacijo in kultivacijo

3.2.2.1 Potek raziskave

Pripravili smo sveža gojišča po navodilih proizvajalca in naredili kontrolo kakovosti. S pripravljenimi svežimi sevi smo nacepili ustrezne kombinacije gojišč, da bi določili njihovo rast oz. inhibicijo, po čemer smo potem ugotavljali uporabnost gojišča. Za vsako kombinacijo seva in izbranega gojišča smo morali upoštevati pogoje inkubacije, ki sovpadajo s pogoji inkubacije rutinskega laboratorijskega dela. Spisek kontrolnih sevov s pogoji inkubacije in pričakovanimi rezultati za vsako testirano gojišče so zbrani v spodnjih preglednicah 2 – 7, kar je osnova nastavitve eksperimentov za preizkus trajnosti in ustreza lastnostim posameznega gojišča. Za nacepitev gojišča smo najprej izbrali najboljšo metodo. Preizkusili smo več metod; preizkus in izbira metode med razpoložljivimi metodami je opisano v naslednjem poglavju »3.2.2.2 Izbira metode za merjenje rasti

bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo». Poleg izbrane metode smo določili še gostoto inokuluma, da smo dobili številne rezultate (to je opisano v poglavju »3.2.2.3 Določitev gostote za nacepitev inokuluma glede na rastni koeficient za izbrana bakteriološka gojišča«). Vsa gojišča smo naenkrat položili v inkubator z ustreznimi inkubacijskimi pogoji za vsak sev. Nacepitev smo naredili enkrat tedensko in smo proces ponavljali vsak teden do konca testiranja. Po inkubaciji smo odčitali rezultate, kot je to narekovala izbrana metoda. Prva nacepitev, to je nacepitev na sveža gojišča, je služil za primerjavo z vsemi rezultati naslednjih meritev skozi celoten čas testiranja, to pomeni, da so prvi rezultati rasti bili obravnavani kot 100 % rast, na katero smo potem lahko določali odstotek (%) padca rasti, ki se pojavi s staranjem gojišča. Rezultate smo prikazali v preglednicah in grafih (poglavje »4 Rezultati«), nato smo jih statistično obdelali za določitev padca rasti in jih tudi v istem poglavju posamezno (eno gojišče, en sev) prikazali v grafih. Na podlagi tega smo interpretirali uporabnost gojišča. Rezultate trajnosti vsakega posameznega gojišča smo na koncu primerjali s priporočenimi roki trajanja.

Preglednica 2: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar Campy

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
Campy	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	mikroaerofilno, (42 ± 2) °C	18h do 48h	rast, sive kolonije
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	mikroaerofilno, (42 ± 2) °C	18h do 48h	delna ali popolna inhibicija

Preglednica 3: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar CLED

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
CLED	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast, rumene kolonije
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast, drobne rumene kolonije
	<i>Proteus mirabilis</i> RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast, modrozelenne kolonije brez rojenja
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast, rumene kolonije

Preglednica 4: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar MAC

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
MAC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast, vijolične kolonije
	<i>Proteus mirabilis</i> RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast, brezbarvne kolonije brez rojenja
	<i>Salmonella</i> Typhimurium RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	brezbarvne kolonije s črnimi točkami v centru
	<i>Shigella flexneri</i> RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	brezbarvne kolonije
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	popolna inhibicija

Preglednica 5: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar ORSAB

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
ORSAB	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA ATCC 29213	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	popolna inhibicija
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	modre kolonije

Preglednica 6: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar SS

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
SS	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	popolna inhibicija
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	popolna inhibicija
	<i>Salmonella</i> Typhimurium RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	brezbarvne kolonije s črnimi točkami v centru
	<i>Shigella flexneri</i> RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	brezbarvne kolonije

Preglednica 7: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar XLD

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
XLD	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	popolna inhibicija
	<i>Salmonella</i> Typhimurium RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	prosojne kolonije s črnimi točkami v centru
	<i>Shigella flexneri</i> RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rdeče kolonije

3.2.2.2 Izbira metode za merjenje rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo

3.2.2.2.1 Cilji

Prvi korak pri izvedbi praktičnega dela preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo je izbira ustrezne metode, s katero smo merili rast standardnih sevov na izbranih gojiščih. Z izbrano metodo smo določili padec rasti in s tem ugotovili staranje gojišča. Metoda je morala omogočati rezultate, ki se najbolj približajo resničnemu stanju, so med seboj primerljivi in se lahko preverijo. Kot dobro metodo smo uvrstili tisto, ki je hitra, poceni, lahka za izvajanje, natančna, zanesljiva, ponovljiva in takšna, ki je najbolj optimalna za merjenje parametra, ki nas izključno zanima.

Pri preizkušanju raznih opisanih metod z namenom, da bi bili naši rezultati čim boljši, smo bili pozorni na naslednje vplive in moteče dejavnike pri točnosti rezultatov:

- Koeficient rasti: Vse metode smo preizkušali z istim sevom *Escherichia coli* ATCC 25922 in vedno s sveže pripravljenim MH gojiščem (Mueller Hinton agar). Vse plošče smo tudi inkubirali 1 dan v istem inkubatorju z zračno atmosfero in nastavljeno temperaturo na 35 °C, da smo se izognili odstopanju zaradi različne rasti. Če smo uvedli kakšna odstopanja, smo na to posebej opozorili v besedilu za vsako posamezno metodo. Eksperiment preverjanja trajnosti smo izvedli tako, da koeficient rasti ni motil primerjave rezultatov; za vsako izbrano gojišče in sev smo vse rezultate rasti skozi čas primerjali z rezultatom prve nacepitve na svežem gojišču. Zanima nas le padec rasti v odstotkih, ne pa konkretno število kolonij. Tako je vsaka kombinacija gojišče – sev pomenila poseben eksperiment. Rezultatov različnih gojišč ali različnih sevov nismo primerjali med seboj.
- Volumen nacepitve: Pomembno je, da se nacepi tolikšen volumen suspenzije bakterijskega seva, ki zagotovi čim lažje odčitavanje rezultatov (lažja določitev rasti ali lažje štetje kolonij). Volumen mora biti tako izbran, da so odstopanja čim manjša. Vemo, da so pri večjih volumnih nacepitve napake manjše, kot pri majhnih; zato smo določili čim manjši in hkrati dovolj natančen volumen nacepitve.
- Nacepitev z inokulacijsko bakteriološko zanko ali pipeto: Primerjali smo natančnost pipet in kalibriranih bakterioloških zank.

- Priprava redčine bakterijske suspenzije: Upoštevali smo, da nastane najmanj napak ko je najmanj korakov pri izvedbi celotnega preizkusa, torej tudi čim krajša in hitrejša priprava redčine.
- Napaka izvajalca: Pri naši nalogi ni pomembno, da je metoda prijazna različnim izvajalcem, kajti celotni potek izvede ista oseba. Vseeno smo preverjali variabilnost rezultatov z narejenimi več ponovitvami iste preizkušene metode (duplikat, triplikat, itd.).
- Napake pri odčitavanju rezultatov: Metoda mora omogočati lahko odčitavanje rezultatov, pri čemer je zelo pomembna gostota inokuluma (torej redčina in volumen). Če je več kolonij na plošči, je štetje težje kot če jih je manj; vendar moramo gostoto inokuluma pravilno izbrati, ker se z manjšanjem števila kolonij večja variabilnost rezultatov. Število kolonij za štetje ne sme biti tako majhno, da bi nastali problemi pri odčitavanju rezultatov, ko bi rast začela upadati. Lažja kontrola natančnosti je pri metodah, kjer se lahko vnaprej določi TI (TI je teoretični inokulum ali pričakovano število kolonij na plošči, ki se izračuna po formuli, opisani v poglavju »3.2.2.2.2 Definicije«), da se lažje izbere redčina in volumen nacepitve. Rezultati rasti se na koncu primerjajo s TI, drugače pa se lahko primerjajo le med seboj.
- Čas: Čas izvajanja mora biti čim krajši, saj se lahko pri daljšem postopku dogaja s sevi kaj neugodnega. Nekateri sevi so še posebej občutljivi na predolgo pripravo in potek nacepitve. Možni so lažni rezultati padca rasti, ki nastanejo zaradi odmrtnosti dela bakterijske populacije med pripravo inokuluma.

3.2.2.2.2 Definicije

V nalogi se večkrat pojavi pojem OS (osnovna suspenzija bakterijskega seva), kar pomeni suspenzijo z gostoto 0,5 po McFarlandu in znaša 1 do 2×10^8 CFU/ml (kolonij v enem mililitru). Za izračune smo upoštevali predvideno gostoto 1×10^8 CFU/ml. OS smo pripravljali v 2 ml Bio Mérieux-ovih stekleničkah fiziološke raztopine tako, da smo dodajali svežo živo kulturo bakterij z brisom do zelene gostote, določene z nefelometrom.

Redčenje smo pripravljali v epruvetah z fiziološko raztopino na dva različna načina:

- 1 : 10 ali 10-kratne razredčine, to pomeni 1 ml vzorca ali predhodne redčine v 9 ml fiziološke raztopine
- 1 : 100 ali 100-kratne razredčine, to pomeni 0,1 ml vzorca ali predhodne redčine v 9,9 ml fiziološke raztopine.

Za izbiro ustrezne redčine in volumna nacepitve suspenzije na agarske plošče, je pomemben podatek izračuna TI (teoretični inokulum), ki nam pove, koliko kolonij lahko pričakujemo na plošči (preglednica 8).

TI smo izračunali po formuli:

$$\text{Celotni faktor redčenja} = \text{redčitev} \times \text{volumen nacepitve v ml} \quad \dots(1)$$

$$TI = \text{osnovna suspenzija } (1 \times 10^8 \text{ CFU / ml}) \times \text{celotni faktor redčenja} \quad \dots(2)$$

Odstopanja dejanskih rezultatov z določenim TI nastanejo zaradi specifičnosti rasti posamezne bakterije na določenem gojišč. Posledično dobimo zmanjšano število kolonij, če je rast slabša, kajti takrat vsaka bakterija ne tvori svoje kolonije. Poleg tega so tu še naključne napake in navzdol zaokrožen TI, kot smo ga mi uporabljali, kar pa vodi do višjega rezultata od TI.

Preglednica 8: Računanje teoretičnega inokuluma, podanega kot število CFU na ploščah po inkubaciji, glede na redčenje in volumen nacepitve

redčina	volumen nacepitve		celotni faktor redčenja (ml)	teoretični inokulum (CFU na plošči)
	(μ l)	(ml)		
10^{-1}	100	0,10	10^{-2}	10^6
	50	0,05	5×10^{-3}	5×10^5
	10	0,01	10^{-3}	10^5
	1	0,001	10^{-4}	10^4
10^{-2}	100	0,10	10^{-3}	10^5
	50	0,05	5×10^{-4}	5×10^4
	10	0,01	10^{-4}	10^4
	1	0,001	10^{-5}	10^3
10^{-3}	100	0,10	10^{-4}	10^4
	50	0,05	5×10^{-5}	5×10^3
	10	0,01	10^{-5}	10^3
	1	0,001	10^{-6}	100
10^{-4}	100	0,10	10^{-5}	10^3
	50	0,05	5×10^{-6}	500
	10	0,01	10^{-6}	100
	1	0,001	10^{-7}	10
10^{-5}	100	0,10	10^{-6}	100
	50	0,05	5×10^{-7}	50
	10	0,01	10^{-7}	10
	1	0,001	10^{-8}	1
10^{-6}	100	0,10	10^{-7}	10
	50	0,05	5×10^{-8}	5
	10	0,01	10^{-8}	1
	1	0,001	10^{-9}	0,1

Pri vsaki preizkušeni metodi smo delali ponovitve iz istega vzorca, pripravljenega iz iste OS. Tako smo preverjali ponovljivost metode in vpliv odvzema različnih delov suspenzije istega vzorca. Le pri metodi CLSI, ki smo jo kasneje tudi izbrali za merjenje rasti, smo preizkusili še vpliv različnih vzorcev ali natančneje eksperiment smo začeli z več različnimi OS.

Rezultate preizkušanja metod smo statistično obdelali s primernimi izračuni po Košmelj (2001). Pri vseh preizkušenih metodah (razen pri ekometrični metodi, ki smo jo zaradi zelo čudnih rezultatov interpretirali le opisno, saj je bila ravno zaradi tega izključena) smo računali standardno deviacijo (s), koeficient variacije (KV), pri nekaterih metodah še absolutne odklone in relativne odklone od povprečja, ter razpon odklonov. Formule so sledeče (x = meritev, $\bar{x}$ = povprečje vseh meritev):

$$s = \sqrt{\left(1 / (n-1)\right) \times ((x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2)} \quad \dots(3)$$

$$KV (\%) = 100 \times s / \bar{x} \quad \dots(4)$$

$$\text{Absolutni odklon} = x_i - \bar{x}, (i = 1, 2, \dots, n) \quad \dots(5)$$

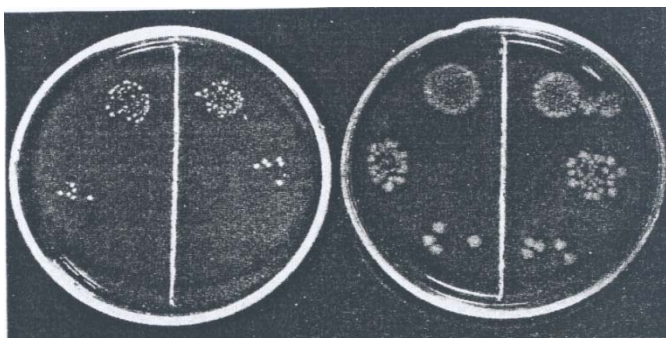
$$\text{Relativni odklon} (\%) = 100 \times \text{absolutni odklon} / \bar{x} \quad \dots(6)$$

$$\text{Razpon odklonov} = \text{maksimalni odklon} - \text{minimalni odklon} \quad \dots(7)$$

3.2.2.2.3 Preverjanje metod

3.2.2.2.3.1 Metoda Miles & Misra (Stokes, 1975)

Na eno agarško ploščo nanašamo več različnih redčin enakega volumna v obliki kratkih elips, v premeru velikih okrog 1 cm (slika 1). Za nacepitev smo izbrali volumen 10 μ l in ga nanašali s kalibrirano bakteriološko zanko. V preizkusu bi ugotavljali padec rasti z izginjanjem kolonij v elipsi z najnižjim TI. Poleg MH agarja smo za vsak slučaj nacepili še agarja CLED in MAC.



Slika 1: Rast kolonij na plošči, cepljeni po metodi Miles & Misra

Nanesli smo 6 redčin osnovne suspenzije in sicer:

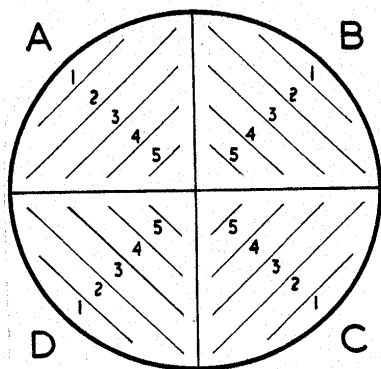
- 10^{-1} s TI 100000,
- 10^{-2} s TI 10000,
- 10^{-3} s TI 1000,
- 10^{-4} s TI 100,
- 10^{-5} s TI 10 in
- 10^{-6} s TI 1.

Naredili smo 3 ponovitve vsakega agarja, da smo lahko primerjali in preverili natančnost metode.

3.2.2.2.3.2 Ekometrična metoda (Hyde, 1989)

Opisan je standardni postopek ekometrične metode po Mossell-u (Mossell's ecometric technique). Plošča z gojiščem se optično razdeli na 4 kvadrante: A, B, C in D. V vsakem kvadrantu je 5 črt, številke od 1 do 5 si sledijo proti notranjosti plošče. Z 1 μ l bakteriološko zanko se nacepi osnovna suspenzija po črtah oz. poljih, brez vmesnega zajemanja te suspenzije. To pomeni, da z bakteriološko zanko samo enkrat pomočimo v OS. Črte nacepitve so narisane tudi na šabloni (slika 2):

A1→B1→C1→D1→A2→B2→C2→D2→A3→B3→C3→D3→A4→B4→C4→D4→A5→B5→C5→D5.



Slika 2: Šablona za nacepitev po ekometrični metodi

Vsako polje je določeno z indeksom in glede na pojav rasti v nekem polju se določi indeks rasti. Gleda se zadnje poraslo polje.

Indeksi si sledijo:

A1=5 B1=10 C1=15 D1=20

A2=25 B2=30 C2=35 D2=40

A3=45 B3=50 C3=55 D3=60

A4=65 B4=70 C4=75 D4=80

A5=85 B5=90 C5=95 D5=100

Po indeksih se lahko izračuna razmerje rasti med ploščami kot AGI (absolutni rastni indeks ali angl. absolute growth index):

$$AGI = 100 \times (\text{indeks testa})/(\text{indeks kontrole}) \quad \dots(8)$$

Kontrola naj bi bila gojišče, kjer se rast poljubno bliža maksimalni rasti, v našem primeru preizkusa bi bila kontrola prva nacepljena serija svežih gojišč, s katero bi primerjali vsa ostala nacepljena gojišča, ki bi predstavljala test. Zmanjševanje AGI bi nakazalo padec rasti.

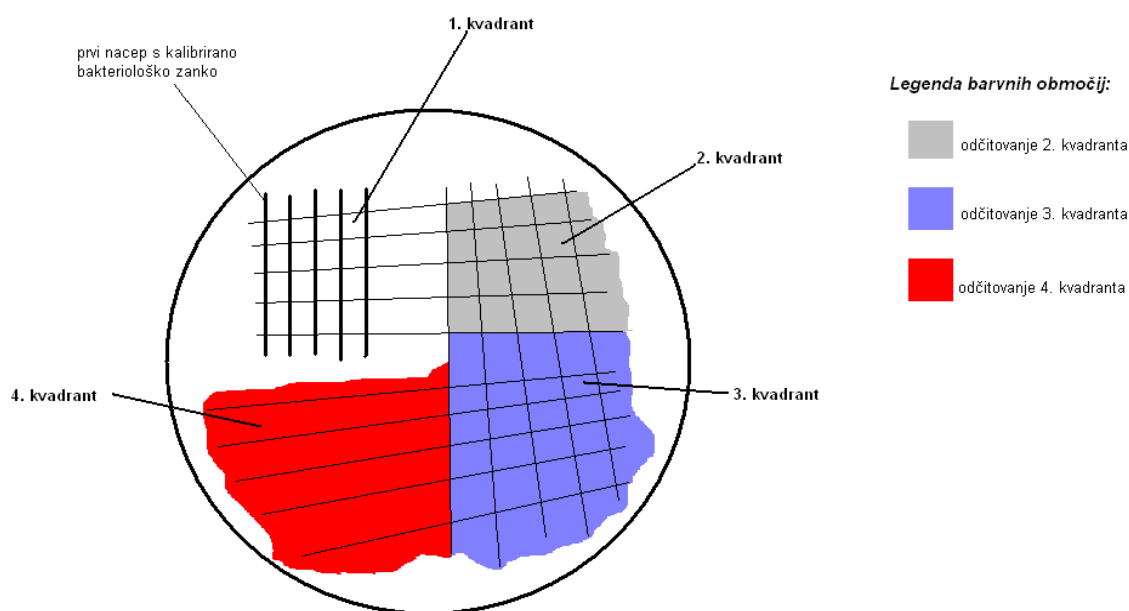
Opazovali smo rast pri nacepiti različnih redčin, da smo preverili, če pri nižjem številu bakterij v suspenziji dobimo tudi nižji indeks, kot bi se godilo pri padanju rasti. Vse redčine so nacepljene v duplikatih.

3.2.2.2.3.3 Washingtonova metoda (Washington, 1985)

Pri Washingtonovi metodi se po standardnem opisu nacepi redčino 10^{-2} OS. Volumen nacepitve je 1 μ l, zato se inokulum nanese s kalibrirano bakteriološko zanko tako, da se razmaže po celi plošči. TI znaša 1000 CFU na plošči. Po inkubaciji preštejemo kolonije, v našem primeru vseh 5 ponovitev. Padec rasti se zazna z zmanjševanjem števila CFU.

3.2.2.2.3.4 Metoda 5 črt

Gre za metodo 4 kvadrantov, ki so optična razdelitev plošče na 4 enake dele. Nacepitev plošče v 4 kvadrante je prikazan na sliki 3. V 1. kvadrant nanesemo s kalibrirano bakteriološko zanko 5 črt po 1 μ l OS, to je skupno nacepljenih 5 μ l OS. Nato v 2. kvadrant povlečemo 5 črt s sterilno kovinsko inokulacijsko bakteriološko zanko, ki je vmes ne ožigamo. Ožgemo bakteriološko zanko in isto naredimo še iz 2. v 3. kvadrant, spet ožgemo in na koncu še povlečemo iz 3. v 4. kvadrant. Po inkubaciji iščemo rast v določenem kvadrantu in štejemo kolonije v števnih kvadrantih (števni kvadrant je tisti, kjer ni konfluentne ali semikonfluentne rasti). Območja štetja posameznih kvadrantov so na sliki 3 prikazani z različnimi barvami. Prvi kvadrant je območje z prvo nacepitvijo 5 črt, ki je ponavadi konfluentne rasti. Padec rasti bi pokazal manjšanje števila kolonij ali njihovo izginotje v zadnjem števnem kvadrantu.



Slika 3: Nacepitev po metodi 5 črt

Nacepili smo 5 plošč gojišča MH z OS bakterije *E. coli*, poleg tega pa še 5 plošč MHR agarja z OS bakterije *S. pneumoniae*, ker nas je zanimalo kako se metoda obnese pri različnih koeficientih rasti.

Cepili pa smo še 5 plošč MH (*E. coli*) po metodi 5 črt in sicer tako, da smo imeli pripravljene različne redčine OS za nanos na plošče. Preverjali smo, če pojav rasti v zadnjih kvadrantih sovпада z nanešeno redčino oziroma gostoto suspenzije.

3.2.2.2.3.5 Metoda CLSI (NCCLS, 1996)

3.2.2.2.3.5.1 Osnovni opis metode CLSI

Metoda CLSI je v CLSI, prej NCCLS dokumentu (NCCLS, 1996) določena tako, da pripravimo OS bakterij in jo redčimo 10^{-2} ali redkeje. Postopek redčenja ni določen. Na ploščo nacepimo 10 μl s kalibrirano bakteriološko zanko ali s pipeto, nato razmažemo po celi plošči dvakrat z razmikom 60° . Pri redčini 10^{-2} poraste približno 10^4 kolonij na plošči. Če se ne da šteti, se lahko nacepi redkeje ali manjši volumen. Pri metodi CLSI so torej možne modifikacije. Pomembno je spet število CFU, ki začne padati pri padcu bakterijske rasti.

Osnovni opis metode: 10^{-2} redčina, nacepitev z 10 μl kalibrirano bakteriološko zanko. Izkazala se je za popolnoma neštevno, zato smo nacepili naslednjo modifikacijo s $\text{TI} = 1000 \text{ CFU}$ na ploščo: 10^{-3} redčina, 10 μl bakteriološka zanka. Metodo smo preizkušali s 5 ponovitvami plošč.

3.2.2.2.3.5.2 Ugotavljanje vpliva odmerjanja volumnov pri metodi CLSI

Izvedli smo interno kalibracijo merilcev volumnov s tehtanjem destilirane vode. Upoštevali smo, da je 1 ml destilirane H_2O enako 1 g. Ni nas zanimala absolutna vrednost volumna, le odstopanja med odmerki, zato nismo mase pretvarjali v volumne.

Preverjali smo samo pipete, ker za preverjanje volumnov manjših od 25 μl naša tehtnica ni dovolj natančna. Preverjanje bakterioloških zank smo torej izpustili in posledično opustili nanos vzorcev z njimi.

3.2.2.2.3.5.3 Nova modifikacija metode CLSI

Preverili smo nanos volumnov 50 μl in 100 μl s pipetami in temu primerno modificirali metodo CLSI tako, da smo nacepili izbrane volumne z redčino 10^{-4} . Naredili smo 3 ponovitve. TI je znašal 500 CFU na ploščo pri izbranem volumnu 50 μl in 1000 CFU na ploščo pri izbranem volumnu 100 μl .

3.2.2.2.3.5.4 Ugotavljanje vpliva redčenja pri metodi CLSI

Poskus smo zastavili tako, da smo cepili 50 μl 10^{-4} redčine iste OS (TI = 500 CFU na ploščo), vendar pa smo za prvo serijo 5 ponovitev naredili 10-kratne razredčine:

($10^{-1} \times 10^{-1} \times 10^{-1} \times 10^{-1} = 10^{-4}$), za drugo serijo 5 ponovitev pa 100-kratne razredčine:

($10^{-2} \times 10^{-2} = 10^{-4}$). Način redčenja je podrobneje opisan v poglavju »3.2.2.2.2 Definicije«.

3.2.2.2.3.5.5 Ugotavljanje vpliva različnih osnovnih suspenzij pri metodi CLSI

Pripravili smo 5 OS (gostote 0,5 po McFarlandu) za vsak eksperiment in vse redčili na enak način, t.j. z 10-kratnimi razredčinami. Zaradi boljšega pregleda nad odstopanji priprave OS, smo preizkušali z dvema različnima redčinama:

- redčina 10^{-4} , volumen nacepitve je 50 μl in TI znaša 500 CFU na ploščo
- redčina 10^{-5} , volumen nacepitve je 100 μl in TI znaša 1000 CFU na ploščo.

Za vsako redčino smo naredili duplikat eksperimenta, tako da smo dobili po dva enaka preizkusa iste redčine in za oba smo uporabili istih 5 OS.

3.2.2.3 Določitev gostote za nacepitev inokuluma glede na rastni koeficient za izbrana bakteriološka gojišča

Izbrana gojišča *Campylobacter*, CLED, MacConkey, ORSAB, SS in XLD smo preizkušali s čistimi kulturami ustreznih sevov po modificirani metodi CLSI: cepitev z pipeto, volumen 100 μl , redčina 10^{-5} , pripravljena po koralih 10^{-1} . TI je v tem primeru enak 1000 CFU na ploščo. S pomočjo metode Miles & Misra in metode 5 črt smo določali razmerja koeficientov rasti, ki je samo podatek o rasti izbranega kontrolnega seva na določenem gojišču. Za preizkus ne rabimo absolutne vrednosti koeficienta rasti, ki se drugače izračuna s primerjavo rezultatov rasti po CLSI metodi s TI. Absolutnih koeficientov rasti nismo posebej določali, le razmerja med njimi. Z upoštevanjem teh razmerij smo slabše rastoče seve na nekaterih gojiščih cepili večkrat po 100 μl , da bi dobili končno število približno 100 – 200 CFU na ploščo, ki je optimalna za štetje in za redukcijo napak rezultatov. Natančno cepljenje je prikazano v preglednici 9.

Pri sevih, kjer je na izbranih gojiščih rast inhibirana, se po CLSI metodi praviloma preizkuša rast tako, da se nacepi 10 μl 10^{-1} redčine osnovne suspenzije (NCCLS, 1996). Zaradi lažjega izvajanja smo se odločili, da bomo v tem primeru cepili 100 μl 10^{-2} redčine osnovne suspenzije, kar je teoretično enak inokulum.

Preglednica 9: Končne določitve cepljenja za vsako gojišče in vsak sev posebej po metodi CLSI; oznaka R-5 v preglednici pomeni redčino 10^{-5} , R-4 redčino 10^{-4} in številka zraven pomeni volumen nacepitve v μl , I pomeni nacepitev inhibiranega seva po standardnem opisu, x pa pomeni, da kombinacije nismo preizkušali

	Campy	CLED	MAC	ORSAB		SS	XLD
<i>E. coli</i> ATCC 25922	I	R-5, 100	R-5, 200	x	x	I	I
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	x	R-5, 100	I	x	x	x	x
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	x	R-5, 100	x	x	x	I	x
<i>P. mirabilis</i> RLS	x	R-5, 100	R-5, 100	x	x	x	x
<i>S. flexneri</i> RLS	x	x	R-5, 200	x	x	R-5, 300	R-5, 300
<i>S. Typhimurium</i> RLS	x	x	R-5, 100	x	x	R-5, 300	R-5, 300
<i>C. jejuni</i> ATCC 29428	R-5, 100	x	x	x	x	x	x
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	x	x	x	I	x	x	x
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	x	x	x	R-5, 100	R-4, 100	x	x

3.2.2.4 Osnova za interpretacijo rezultatov rasti bakterij na gojiščih

Gojišče je zadovoljivo, če je rast na njem zadostna. Pri selektivnih gojiščih je pomembno, da se ohrani inhibicija, medtem ko mora biti dobra rast zelenega seva.

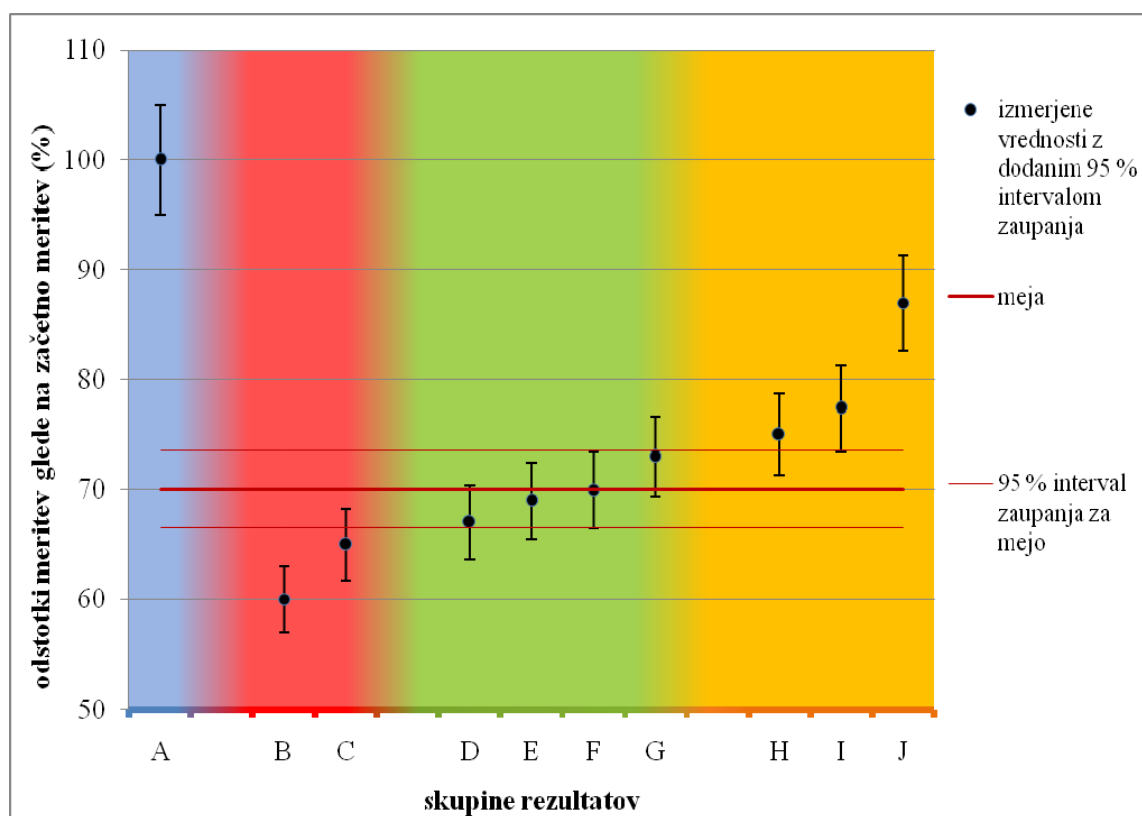
Rezultate merjenj rasti na izbranih gojiščih, ki smo jih pridobili z uporabo CLSI metode, smo statistično obdelali in upoštevali 95 % interval zaupanja oziroma merilne negotovosti. Tako smo za vsako meritev izračunali ta interval in ga prikazali v grafih. Intervali zaupanja za štetje mikroorganizmov so le teoretični in so izračunani na osnovi standarda (SIST EN ISO 8199, 2007) po formuli, kjer C pomeni izmerjena vrednost oz. število kolonij:

$$95 \% = C + 2 \pm 2\sqrt{(C + I)} \quad \dots(9)$$

Ob upoštevanju 70 % meje (Nichols, 1999, Ulisse in sod., 2006) za določitev, da je neko gojišče še uporabno, kot je določeno v večini pregledane literature, smo rezultate z njo primerjali in tudi tukaj z njenim 95 % intervalom zaupanja. Za 100 % rast smo vzeli prvo meritev, tik po pripravi gojišča, ko je gojišče sveže. Glede na % vseh naslednjih merjenj rasti in postavljeno mejo, smo opredelili rezultate v naslednje skupine sklepanja o uporabnosti gojišč:

- skupina rezultatov, za katere smo opredelili, da je gojišče neustrezno
- skupina rezultatov, za katere smo opredelili, da je gojišče verjetno neustrezno
- skupina rezultatov, za katere smo opredelili, da je gojišče ustrezno

Določene skupine so grafično prikazane s sliko 4, kjer so lepo vidna razmerja rezultatov in določene 70 % meje. Tako meja, kot rezultati, imajo vsi prikazan 95 % interval zaupanja, ki je pri interpretaciji in uvrščanju v skupine tudi upoštevan.



Slika 4: Osnovni graf za interpretacijo, kjer so rezultati A – J prikazani v odstotkih in imajo dodane 95 % intervale zaupanja; glede na mejo so postavljeni v skupine, ki so različno obarvane:

- ❖ modro:sveže gojišče z določeno 100 % rastjo: A
- ❖ rdeče: skupina rezultatov, ki določajo, da je gojišče neustrezno: B in C
- ❖ zeleno: skupina rezultatov, ki določajo, da je gojišče verjetno neustrezno: D, E, F in G
- ❖ rumeno: skupina rezultatov, ki določajo, da je gojišče ustrezno: H, I in J

3.2.3 Preverjanje trajnosti testnih gojišč

Pripravili smo sveža gojišča po navodilih proizvajalca in naredili kontrolo kakovosti. Uporabili smo že pripravljen MHS. S pripravljenimi svežimi sevi smo nacepili ustrezne kombinacije gojišč. Prav tako smo tudi tukaj upoštevali pogoje inkubacije za vsako kombinacijo seva in izbranega gojišča. Skupaj s pričakovanimi rezultati so sevi za vsako gojišče posebej prikazani v preglednicah 10 – 13. Testna gojišča smo cepili po standardnem postopku direktno iz kolonij pripravljenih sevov. Navodila za izvedbo testov so opisana v Weissfeld in Bartlett (1994), antibiogram pa smo naredili po navodilih iz CLSI (2006a). Vse skupaj z gojišči za izolacijo in kultivacijo smo ustrezno inkubirali in po inkubaciji odčitali rezultate. Proces smo izvedli enkrat tedensko in ga ponavljali vsak teden do konca testiranja. Rezultati so kazali neko izraženo lastnost kot pozitivno ali negativno. Ker je šlo za znane seve in s tem tudi vnaprej znane lastnosti, smo le opazovali, ali so se testi z njimi skladali. Rezultati antibiogramov so bili odčitani milimetri inhibicijskih con, ki so morali ostati znotraj določenih mej odstopanja [interpretacija antibiogramov je napisana v CLSI (2006b)].

Preglednica 10: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar DNAA

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
DNAA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	DNAA pozitivna - bister halo okrog rasti
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	DNAA pozitivna - bister halo okrog rasti
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	DNAA pozitivna - bister halo okrog rasti
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	DNAA negativna - ni pojava haloja

Preglednica 11: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za GOI gojišče

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
GOI	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	pozitivni rezultat na gibrjivost, ornitin, ter indol
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RLS	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	negativni rezultat na gibrjivost, ornitin, ter indol

Preglednica 12: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar King B

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
King B	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast brez obarvanosti in brez fluorescence
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	zrak, (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast rumenozelenih kolonij s fluorescenco

Preglednica 13: Standardni sevi s pogoji inkubacije in pričakovanim rezultatom za agar MHS

gojišče	kontrolni sev	pogoji inkubacije	čas inkubacije	pričakovani rezultat
MHS	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	CO ₂ , (35 ± 2) °C	18h do 24h	rast kolonij z α hemolizo in ustrezna vidna disk difuzija

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI PREVERJANJA GOJIŠČ ZA IZOLACIJO IN KULTIVACIJO

4.1.1 Rezultati preverjanja metod za merjenje rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo

4.1.1.1 Metoda Miles & Misra

Rezultati preizkusa metode Miles & Misra so prikazani v preglednici 14 in preglednici 15. Število kolonij je zelo variiralo pri nacepiti nizkega TI, pri visokem TI pa porasla elipsa ni bila števna.

Preglednica 14: Rezultati metode Miles & Misra, kjer število CFU ponazarja rast v vsaki nacepljeni elipsi; kjer se kolonij ni dalo prešteti, je rast opisana kot konfluentna ali semikonfluentna

	teoretični inokulum	število CFU			
		1. plošča	2. plošča	3. plošča	povprečje
MH	100000	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno
	10000	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno
	1000	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno
	100	52	51	84	62,3
	10	2	9	3	4,7
	1	0	0	2	0,7
CLED	100000	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno
	10000	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno
	1000	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno
	100	71	33	77	60,3
	10	16	5	8	9,7
	1	1	0	1	0,7
MAC	100000	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno
	10000	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno
	1000	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno
	100	41	48	62	50,3
	10	5	3	1	3
	1	1	1	1	1

Preglednica 15: Rezultati števila kolonij metode Miles & Misra, prikazani po posameznih nacepljenih elipsah s specifičnim TI (teoretični inokulum), in njihovi statistični izračuni (ST. DEV. pomeni standardna deviacija, KV pa pomeni koeficient variacije)

TI = 100 CFU / ml				TI = 10 CFU / ml				TI = 1 CFU / ml			
agar	MH	CLED	MAC	agar	MH	CLED	MAC	agar	MH	CLED	MAC
1.plošča	52	71	41	1.plošča	2	16	5	1.plošča	0	1	1
2.plošča	51	33	48	2.plošča	9	5	3	2.plošča	0	0	1
3.plošča	84	77	62	3.plošča	3	8	1	3.plošča	2	1	1
povprečje	62	60	50	povprečje	5	10	3	povprečje	1	1	1
min	51	33	41	min	2	5	1	min	0	0	1
max	84	77	62	max	9	16	5	max	2	1	1
ST. DEV.	18,8	23,9	10,7	ST. DEV.	3,8	5,7	2,0	ST. DEV.	1,2	0,6	0,0
KV v %	30,3	39,8	21,4	KV v %	75,7	56,9	66,7	KV v %	115,5	57,7	0,0

4.1.1.2 Ekometrična metoda

Rezultati ekometrične metode so prikazani v preglednici 16, kjer smo opazovali rast pri nacepiti različnih redčin. Redčine so nacepljene v duplikatih, ki so v preglednici 16 prikazani kot 2 paralelki, kjer je tudi lepo vidno kako se le – ti med seboj razlikujejo. Pri odčitavanju rezultatov nismo imeli težav, vendar pa je nemogoče določiti zadnje poraslo polje, ker velikokrat vmes ni rasti.

Preglednica 16: Rast v posameznih poljih na plošči, ki je označena z +; če ni rasti, pa je označeno z – (OS v tabeli pomeni osnovno suspenzijo)

		OS		OS, redčena 10 ⁻¹		OS, redčena 10 ⁻²	
		1. paralelka	2. paralelka	1. paralelka	2. paralelka	1. paralelka	2. paralelka
polje	A1	+	+	+	+	+	+
	B1	+	+	+	+	+	+
	C1	+	+	+	+	+	+
	D1	+	+	+	+	+	+
	A2	+	+	+	+	+	+
	B2	+	+	+	+	+	+
	C2	+	+	+	+	-	+
	D2	+	+	+	+	-	+
	A3	+	+	+	+	+	+
	B3	+	+	+	+	-	+
	C3	+	+	+	+	-	+
	D3	+	+	+	+	+	-
	A4	+	+	-	+	-	+
	B4	+	+	-	+	-	+
	C4	+	+	+	+	-	+
	D4	+	+	-	+	-	-
	A5	+	+	-	-	-	-
	B5	-	+	-	+	-	-
	C5	-	+	-	-	-	-
	D5	-	+	-	+	+	-

*Opomba: Oba poskusa z isto redčino (2 paralelki) sta bila izvedena iz istega vzorca.

4.1.1.3 Washingtonova metoda

Rezultati so z ustreznimi statističnimi izračuni za lažje določanje natančnosti metode prikazani v preglednici 17.

Preglednica 17: Rezultati petih ponovitev Washingtonove metode z izračunanim povprečjem, standardno deviacijo, koeficientom variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	1700	1	-302	-21,6
2	1144	2	254	18,2
3	1364	3	34	2,5
4	1332	4	66	4,7
5	1452	5	-54	-3,8
povprečje	1398,4	maksimalni pozitivni odklon	254	18,2
standardna deviacija	202,6	maksimalni negativni odklon	-302	-21,6
koeficient variacije v %	14,5	razpon odklonov	556	39,8

4.1.1.4 Metoda 5 črt

Rezultati metode 5 črt so prikazani v preglednici 18 in v preglednici 19, ki na prvi pogled kažejo na dobro ponovljivost, kar je ovrgla skupna statistična obdelava obeh bakterij (preglednica 20).

Preglednica 18: Rezultati metode 5 črt; uporabljeno gojišče MH (Mueller Hinton) in kontrolni sev *E. coli*, prikazani kot rast po kvadrantih ali števila CFU v njih

	plošče (rast ali število CFU)				
	1	2	3	4	5
1. kvadrant	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno
2. kvadrant	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno
3. kvadrant	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno	semikonfluentno
4. kvadrant	67	88	87	62	6

Preglednica 19: Rezultati metode 5 črt; uporabljeno gojišče MHR (rdeči Mueller Hinton) in kontrolni sev *S. pneumoniae*, prikazani kot rast po kvadrantih ali števila CFU v njih

	plošče (rast ali število CFU)				
	1	2	3	4	5
1. kvadrant	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno	konfluentno
2. kvadrant	37	42	21	35	82
3. kvadrant	2	1	1	0	2
4. kvadrant	0	0	0	0	0

Preglednica 20: Statistični izračuni za rezultate preizkusa metode 5 črt, ki so prikazani v preglednicah 18 in 19 (ST. DEV. pomeni standardna deviacija, KV pa pomeni koeficient variacije)

	4. kvadrant MH	2. kvadrant MHR
povprečje	62	43,4
ST. DEV.	33,4	22,9
KV v %	53,9	52,9

V preglednici 21 rezultati preizkusa metode 5 črt prikažejo, kako sovпада gostota nanosenih redčin z rastjo v določenih kvadrantih.

Preglednica 21: Preizkus metode 5 črt z različno gostoto nanosenih redčin bakterije *E. coli* na agar MH

	rast ali število CFU pri naslednjih gostotah redčine				
	10 ⁸ CFU/ml	10 ⁷ CFU/ml	10 ⁶ CFU/ml	10 ⁵ CFU/ml	10 ⁴ CFU/ml
1. kvadrant	konfluentno	konfluentno	konfluentno	322	58
2. kvadrant	konfluentno	650	166	12	3
3. kvadrant	500	48	4	0	0
4. kvadrant	70	3	1	0	0

4.1.1.5 Metoda CLSI

4.1.1.5.1 Rezultati prvotnega preizkusa metode CLSI

Rezultati prve modifikacije metode CLSI z ustrezno statistično obdelavo (preglednica 22) imajo 14,1 % koeficient variacije.

Preglednica 22: Rezultati petih ponovitev modifikacije metode CLSI z TI = 1000 CFU na ploščo pri nacepitu 10 µl redčine 10⁻³; poleg so še izračunano povprečje, standardna deviacija, koeficient variacije in ustrezni odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	1298	1	-37	-2,9
2	967	2	294	23,3
3	1264	3	-3	0,2
4	1444	4	-183	-14,5
5	1332	5	-71	-5,6
povprečje	1261	maksimalni pozitivni odklon	294	23,3
standardna deviacija	177,7	maksimalni negativni odklon	-183	-14,5
koeficient variacije v %	14,1	razpon odklonov	477	37,8

4.1.1.5.2 Rezultati ugotavljanja vpliva odmerjanja volumnov pri metodi CLSI

V preglednici 23 so rezultati interne kalibracije merilcev volumnov. Rezultati so le od preverjanja pipet, bakterioloških zank nismo preverjali, ker nam preglednica 23 prikazuje, da so majhni volumni manj natančni (bakteriološka zanka je kalibrirana na 10 µl).

Preglednica 23: Izmerjeni volumni s pomočjo tehtanja destilirane H₂O in izračunana standardna deviacija, ter koeficient variacije za vsako pipeto posebej

25 µl pipeta		50 µl pipeta		100 µl pipeta	
meritev	µL	meritev	µL	meritev	µL
1	23,5	1	49	1	99,5
2	23	2	49	2	99,5
3	24	3	48	3	99
4	24	4	49	4	98,5
5	23	5	48	5	99,5
povprečje	23,5	povprečje	48,6	povprečje	99,2
standardna deviacija	0,5	standardna deviacija	0,5	standardna deviacija	0,4
koeficient variacije (%)	2,1	koeficient variacije (%)	1,1	koeficient variacije (%)	0,5

4.1.1.5.3 Rezultati drugega preizkusa metode CLSI

Rezultati druge modifikacije metode CLSI z uporabo večjih volumnov in z ustrezno statistično obdelavo imajo 2,4 % (preglednica 24) in 7 % (preglednica 25) koeficient variacije.

Preglednica 24: Rezultati treh ponovitev modifikacije metode CLSI z TI = 500 CFU na ploščo pri nacepiti 50 µl redčine 10⁻⁴; poleg so še izračunano povprečje, standardna deviacija, koeficient variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	480	1	13,3	2,7
2	499	2	-5,7	-1,1
3	501	3	-7,7	-1,6
povprečje	493,3	maksimalni pozitivni odklon	13,3	2,7
standardna deviacija	11,6	maksimalni negativni odklon	-7,7	-1,6
koeficient variacije v %	2,4	razpon odklonov	21	4,3

Preglednica 25: Rezultati treh ponovitev modifikacije metode CLSI z $TI = 1000$ CFU na ploščo pri nacepiti 100 μ l redčine 10^{-4} ; poleg so še izračunano povprečje, standardna deviacija, koeficient variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	873	1	19	2,1
2	841	2	51	5,7
3	962	3	-70	-7,8
povprečje	892	maksimalni pozitivni odklon	51	5,7
standardna deviacija	62,7	maksimalni negativni odklon	-70	-7,8
koeficient variacije v %	7	razpon odklonov	121	13,5

4.1.1.5.4 Rezultati ugotavljanja vpliva redčenja pri metodi CLSI

Kako redčenje OS vpliva na končno število kolonij, je razvidno v preglednici 26 in v preglednici 27.

Preglednica 26: Število CFU na ploščah z različnim načinom redčenja OS ob uporabi modificirane metode CLSI

redčenje	plošče (rast ali število CFU)				
	1	2	3	4	5
10-kratne razredčine	488	517	506	555	497
100-kratne razredčine	410	441	433	466	443

Preglednica 27: Statistični izračuni za rezultate vpliva redčenja na natančnost, ki so v preglednici 26 (ST. DEV. pomeni standardna deviacija, KV pa pomeni koeficient variacije)

	10-kratne razredčine	100-kratne razredčine	vse meritve
povprečje	512,6	438,6	475,6
ST. DEV.	26,0	20,2	44,8
KV v %	5,1	4,6	9,4

4.1.1.5.5 Rezultati ugotavljanja vpliva različnih osnovnih suspenzij pri metodi CLSI

Rezultati so za vsako redčino (iz 5 OS) prikazani kot dva enaka preizkusa. Poleg števila kolonij so v rezultatih še statistični izračuni o vplivu različnih osnovnih suspenzij (preglednice 28 - 31).

Preglednica 28: Prvi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepitvijo 50 μ l redčine 10^{-4} , narejene iz petih različnih OS, TI = 500 CFU na ploščo; poleg so še izračunano povprečje, standardna deviacija, koeficient variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	364	1	16,4	4,3
2	349	2	31,4	8,3
3	363	3	17,4	4,6
4	405	4	-24,6	-6,5
5	421	5	-40,6	-10,7
povprečje	380,4	maksimalni pozitivni odklon	31,4	8,3
standardna deviacija	30,9	maksimalni negativni odklon	-40,6	-10,7
koeficient variacije v %	8,1	razpon odklonov	72	19

Preglednica 29: Drugi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepitvijo 50 μ l redčine 10^{-4} , narejene iz petih različnih OS, TI = 500 CFU na ploščo; poleg so še izračunano povprečje, standardna deviacija, koeficient variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	410	1	-29,6	-8
2	344	2	36,4	9,8
3	347	3	33,4	9
4	373	4	7,4	2
5	387	5	-6,6	-1,8
povprečje	372,2	maksimalni pozitivni odklon	36,4	9,8
standardna deviacija	27,7	maksimalni negativni odklon	-29,6	-8
koeficient variacije v %	7,5	razpon odklonov	66	17,8

Preglednica 30: Prvi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepitvijo 100 μ l redčine 10^{-5} , narejene iz petih različnih OS, TI = 100 CFU na ploščo; poleg so še izračunano povprečje, standardna deviacija, koeficient variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	64	1	11	14,7
2	72	2	3	4
3	86	3	-11	-14,7
4	70	4	5	6,7
5	83	5	-8	-10,7
povprečje	75	maksimalni pozitivni odklon	11	14,7
standardna deviacija	9,2	maksimalni negativni odklon	-11	-14,7
koeficient variacije v %	12,3	razpon odklonov	22	29,4

Preglednica 31: Drugi preizkus: rezultati modificirane metode CLSI z nacepitvijo 100 μ l redčine 10^{-5} , narejene iz petih različnih OS, TI = 100 CFU na ploščo; poleg so še izračunano povprečje, standardna deviacija, koeficient variacije in ustreznimi odkloni za razlago natančnosti

plošče ponovitev	število CFU	plošče ponovitev	absolutni odklon od povprečja	relativni odklon od povprečja (%)
1	85	1	-4,2	5,2
2	67	2	13,8	17,1
3	95	3	-14,2	-17,6
4	84	4	-3,2	-4
5	73	5	7,8	9,7
povprečje	80,8	maksimalni pozitivni odklon	13,8	17,1
standardna deviacija	11	maksimalni negativni odklon	-14,2	-17,6
koeficient variacije v %	13,6	razpon odklonov	28	34,7

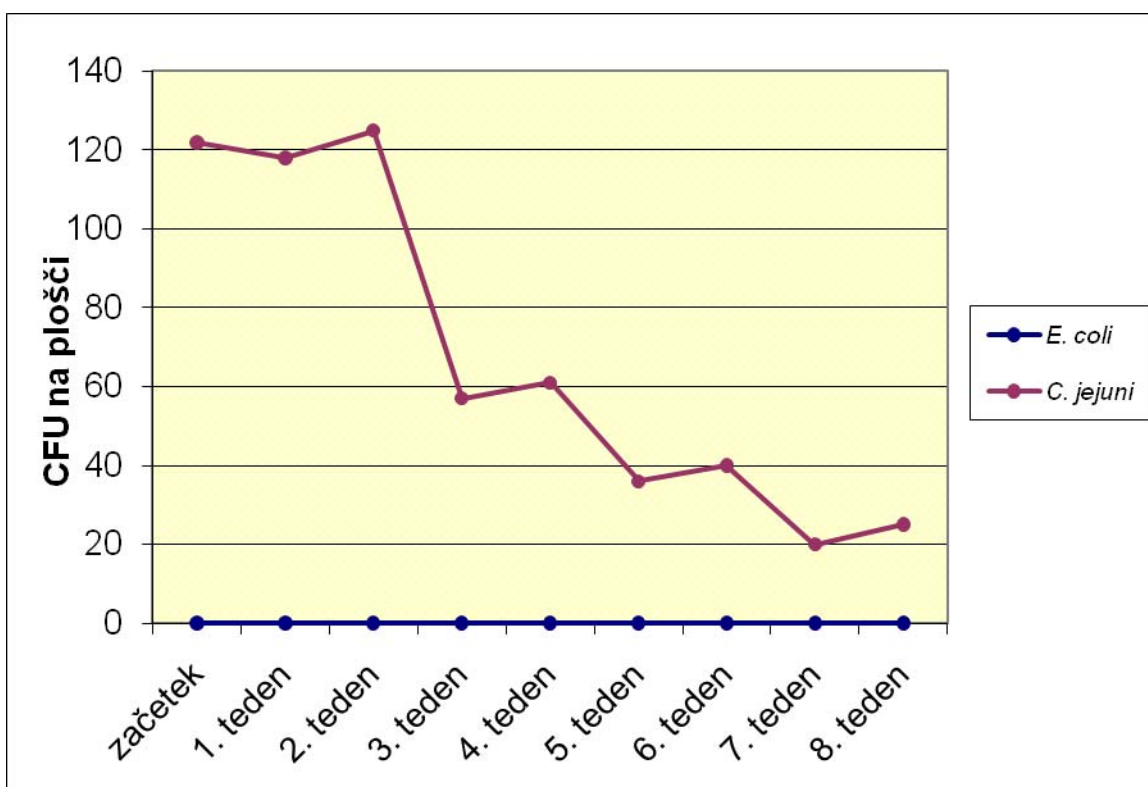
4.1.2 Rezultati rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo

4.1.2.1 Prikaz rezultatov preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo

V preglednicah 32 – 37 so rezultati preverjanja trajnosti za vsako gojišče posebej; prikazani so kot število kolonij kontrolnih sevov na plošči po koncu inkubacije. Spremembe števila kolonij skozi čas preizkušanja so prikazane tudi s slikami 5 - 10.

Preglednica 32: Rezultati preverjanja trajnosti agarja Campy z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov

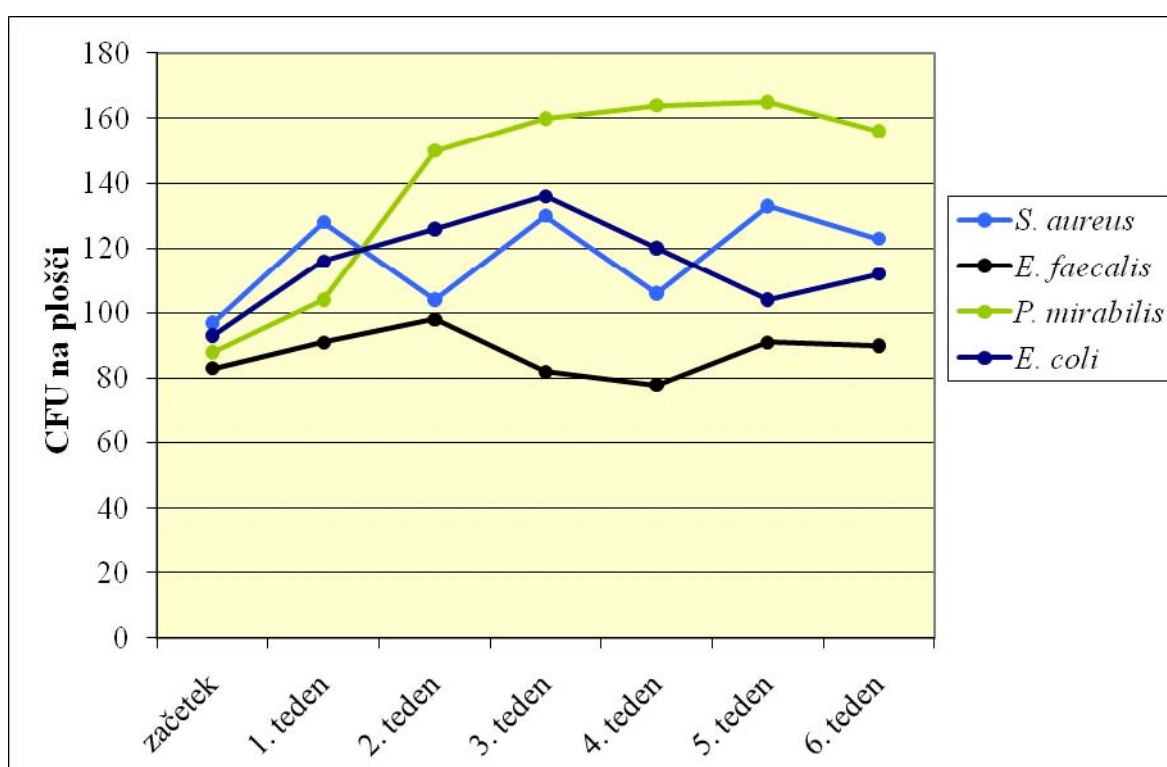
sev	število CFU glede na starost Campy agarja								
	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden	7. teden	8. teden
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. jejuni</i>	122	118	125	57	61	36	40	20	25



Slika 5: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja Campy

Preglednica 33: Rezultati preverjanja trajnosti agarja CLED z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov

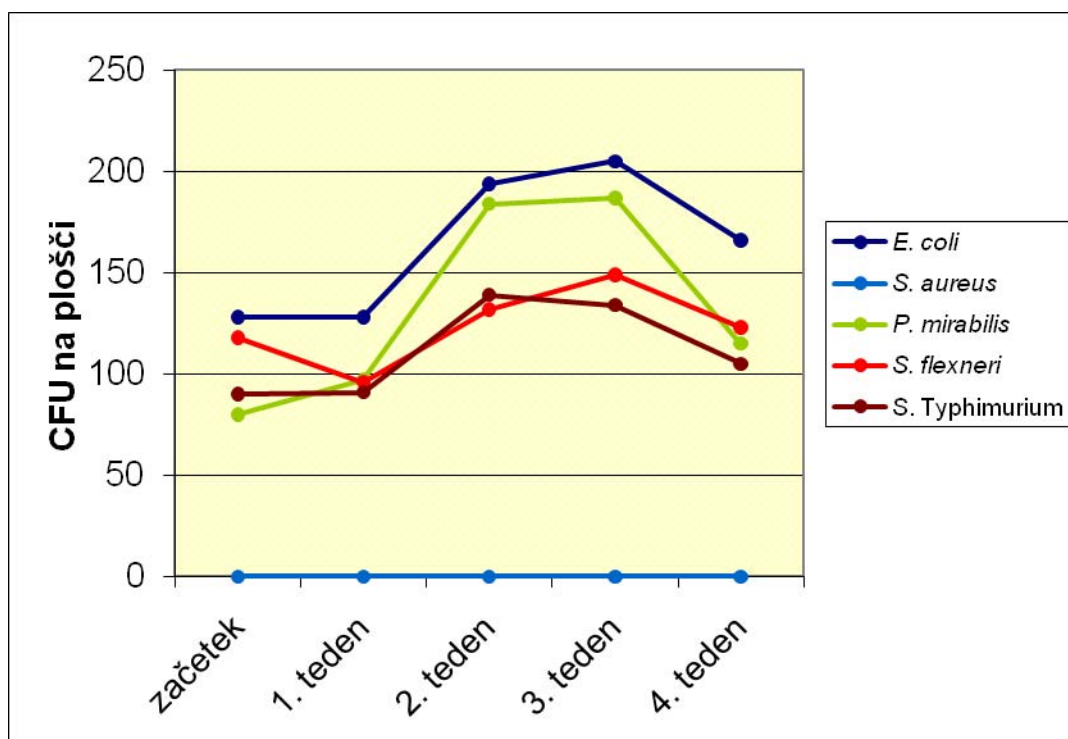
število CFU glede na starost CLED agarja							
sev	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden
<i>S. aureus</i>	97	128	104	130	106	133	123
<i>E. faecalis</i>	83	91	98	82	78	91	90
<i>P. mirabilis</i>	88	104	150	160	164	165	156
<i>E. coli</i>	93	116	126	136	120	104	112



Slika 6: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja CLED

Preglednica 34: Rezultati preverjanja trajnosti agarja MAC z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov

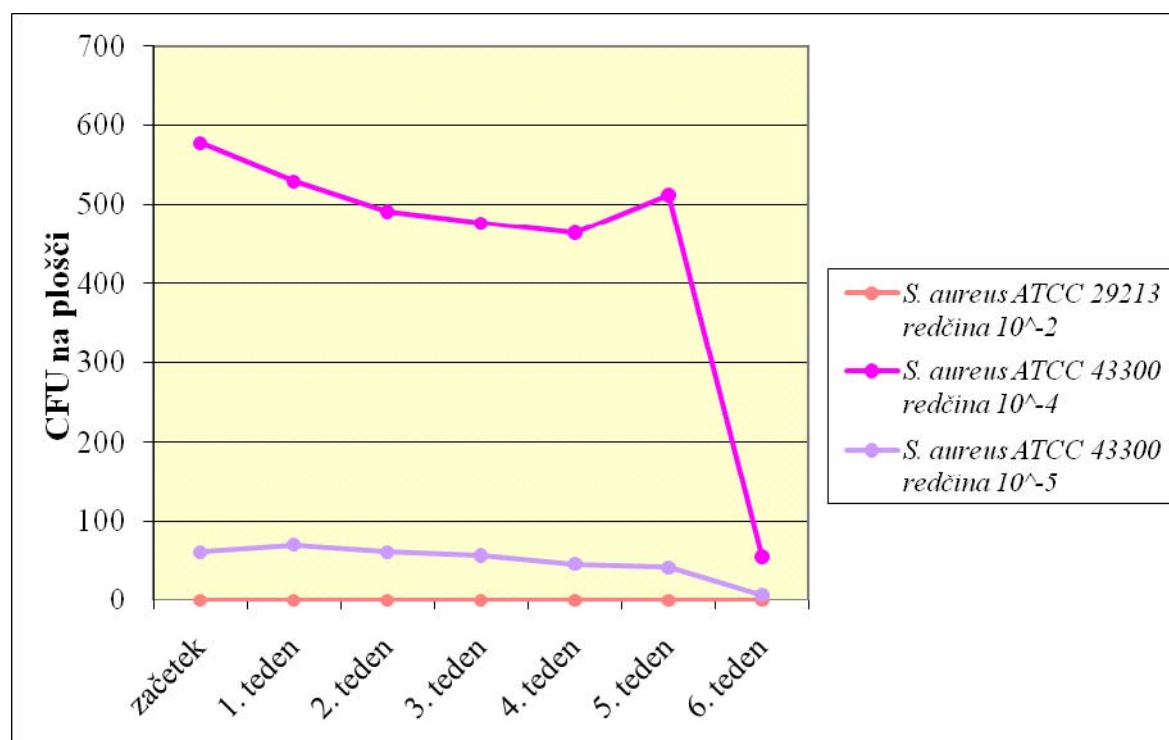
število CFU glede na starost MAC agarja					
sev	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden
<i>E. coli</i>	128	128	194	205	166
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	80	97	184	187	115
<i>S. flexneri</i>	118	96	132	149	123
<i>S. Typhimurium</i>	90	91	139	134	105



Slika 7: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja MAC

Preglednica 35: Rezultati preverjanja trajnosti agarja ORSAB z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov

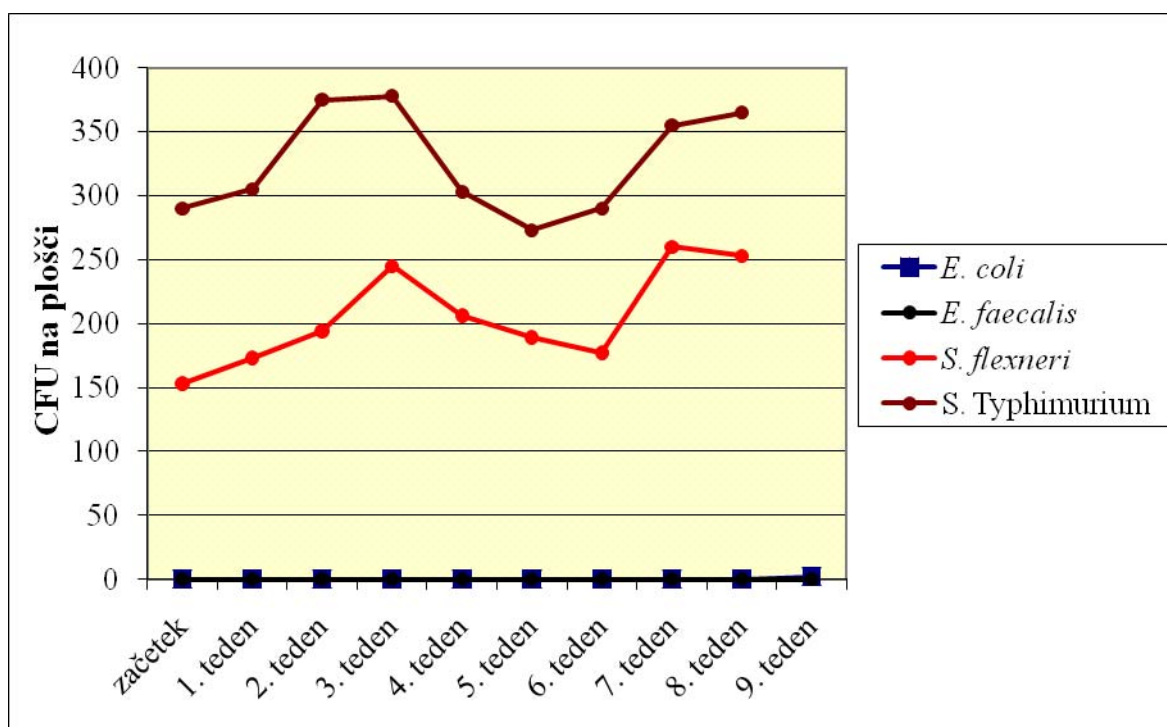
		število CFU glede na starost ORSAB agarja						
sev	redčina	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	redčina 10^{-2}	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	redčina 10^{-4}	577	529	491	476	464	512	55
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	redčina 10^{-5}	61	70	61	57	46	42	7



Slika 8: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja ORSAB

Preglednica 36: Rezultati preverjanja trajnosti agarja SS z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov

sev	število CFU glede na starost SS agarja									
	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden	7. teden	8. teden	9. teden
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. flexneri</i>	153	173	194	245	206	189	177	260	253	
<i>S. Typhimurium</i>	290	305	375	378	303	273	290	355	365	

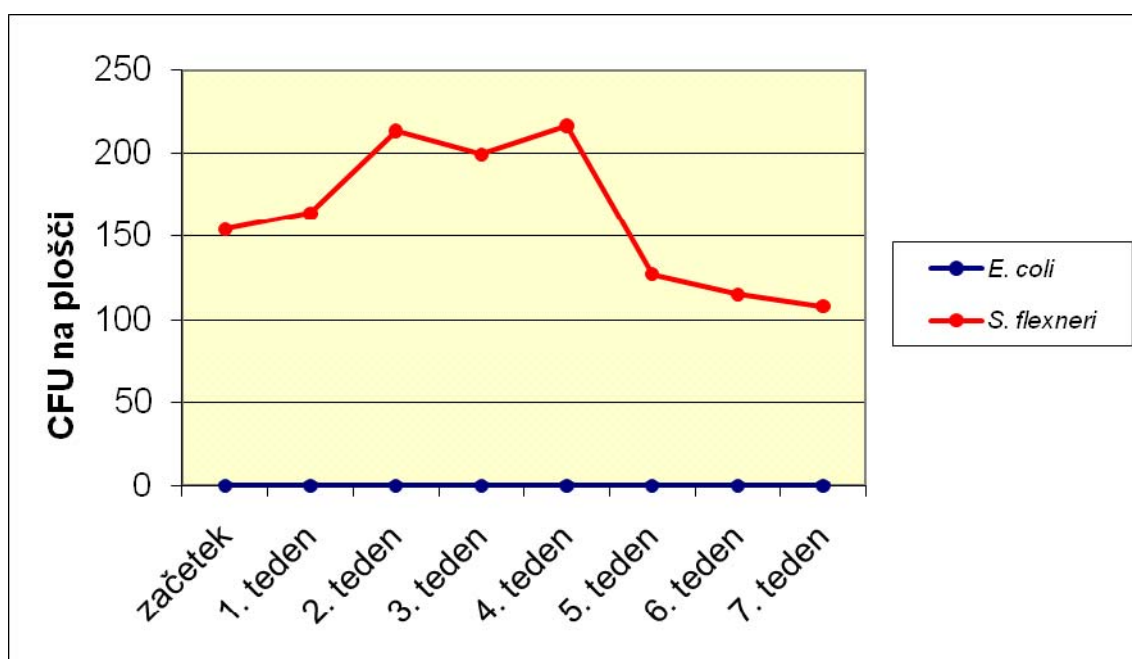


Slika 9: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja SS

Preglednica 37: Rezultati preverjanja trajnosti agarja XLD z merjenjem rasti posameznih kontrolnih sevov

sev	število CFU glede na starost XLD agarja							
	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden	7. teden
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. flexneri</i>	154	164	213	199	216	127	115	108
<i>S. Typhimurium</i>	>500	>500	>500	>500	>500	350	311	325

V nadaljevanju smo rezultate za bakterijo *S. Typhimurium* izpustili, ker zaradi prevelikega števila kolonij v prvih tednih nismo mogli določiti vrednosti.



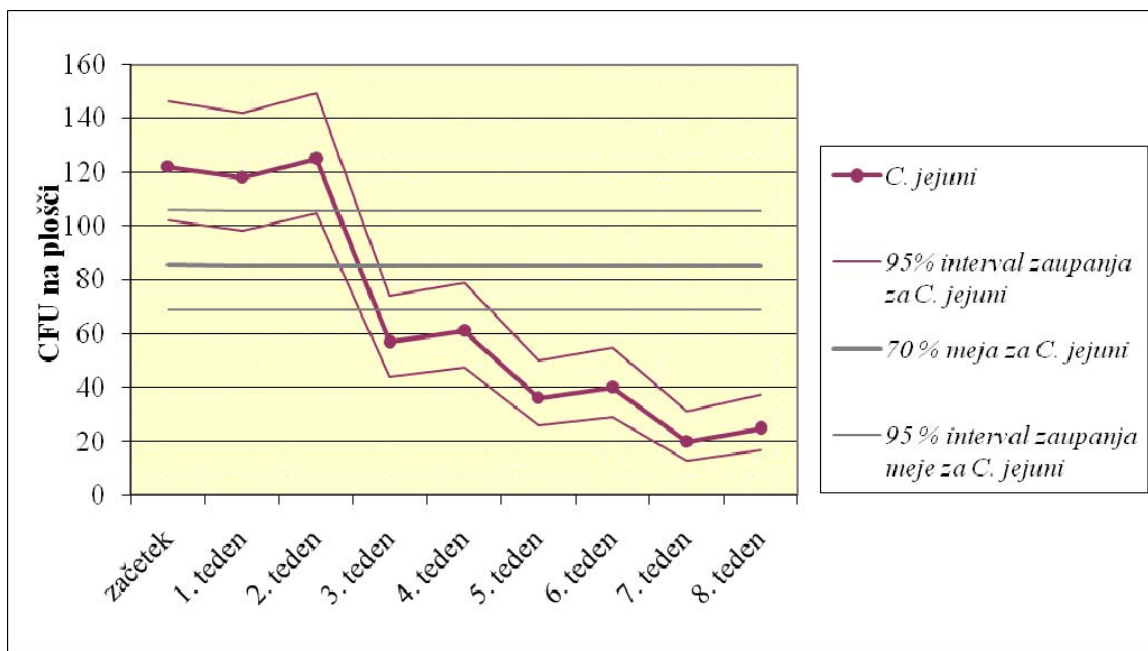
Slika 10: Prikaz rezultatov rasti kontrolnih sevov pri preverjanju trajnosti agarja XLD

4.1.2.2 Rezultati preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo s statistično analizo

Rezultati so število kolonij kot pokazatelj rasti, so statistično obdelani in prikazani v grafih (slike 11 – 24). Za boljšo preglednost vsaka slika prikazuje posamezno kombinacijo gojišča in kontrolnega seva, s tem, da rezultatov inhibiranih sevov nismo dodajali (ti so prikazani v prejšnjem poglavju »4.1.2.1 Prikaz rezultatov preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo«).

4.1.2.2.1 Statistično obdelani rezultati agarja Campy

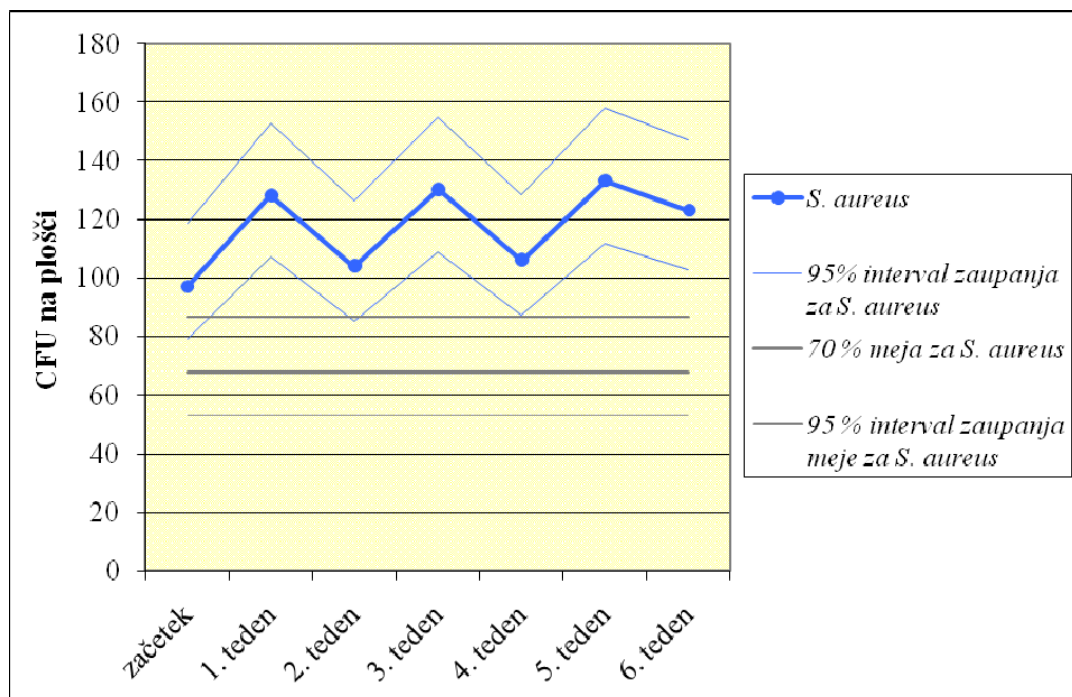
Rezultati agarja Campy so prikazani s sliko 11, ki določa, da je glede na postavljene kriterije ustreznosti (slika 4) gojišče ustrezno do 2. tedna po pripravi, od 3. tedna dalje pa je neustrezno.



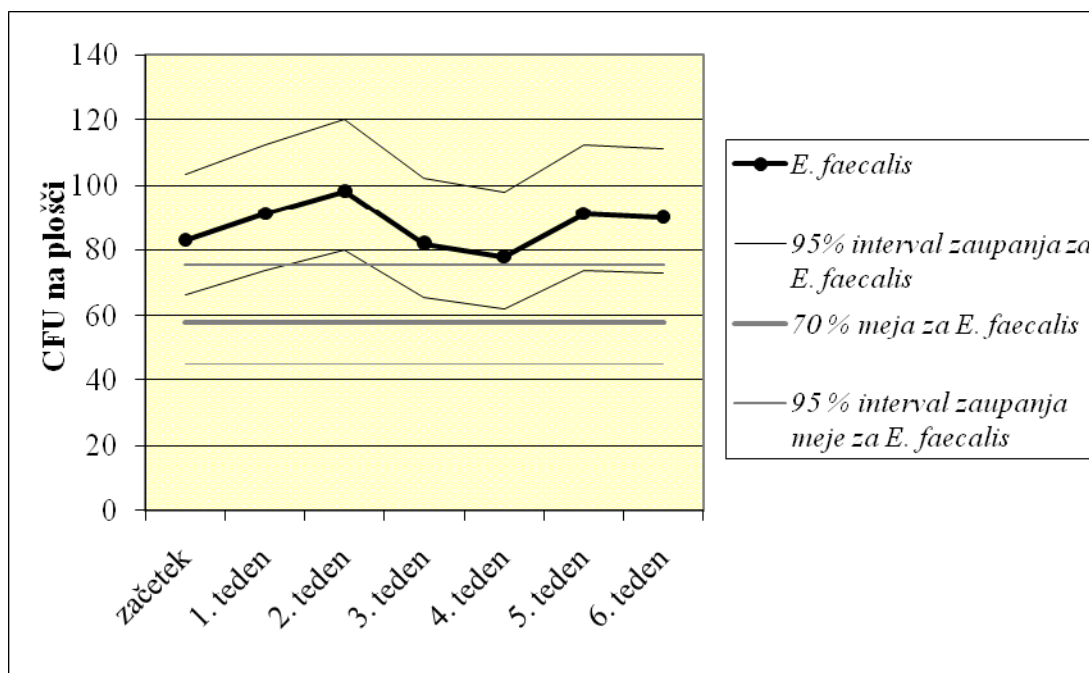
Slika 11: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar Campy in kontrolni sev *Campylobacter jejuni*

4.1.2.2.2 Statistično obdelani rezultati agarja CLED

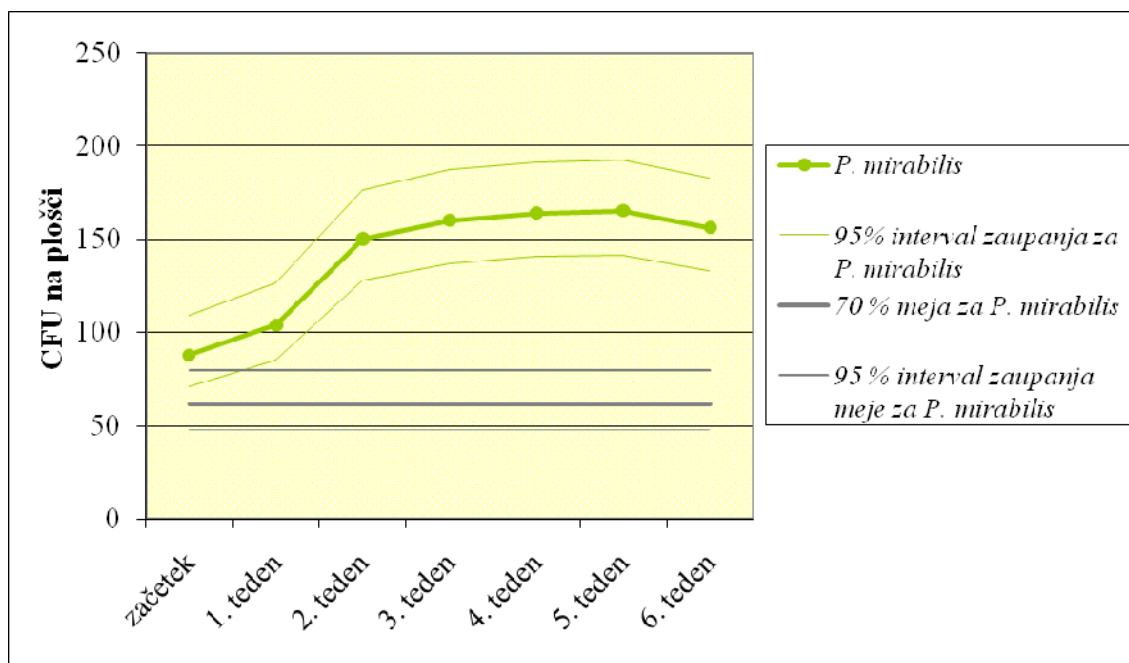
Rezultati vseh kontrolnih sevov za agar CLED so prikazani s slikami 12 - 15, ki določajo, da je glede na postavljene kriterije ustreznosti (slika 4) gojišče ustrezno do 6. tedna po pripravi.



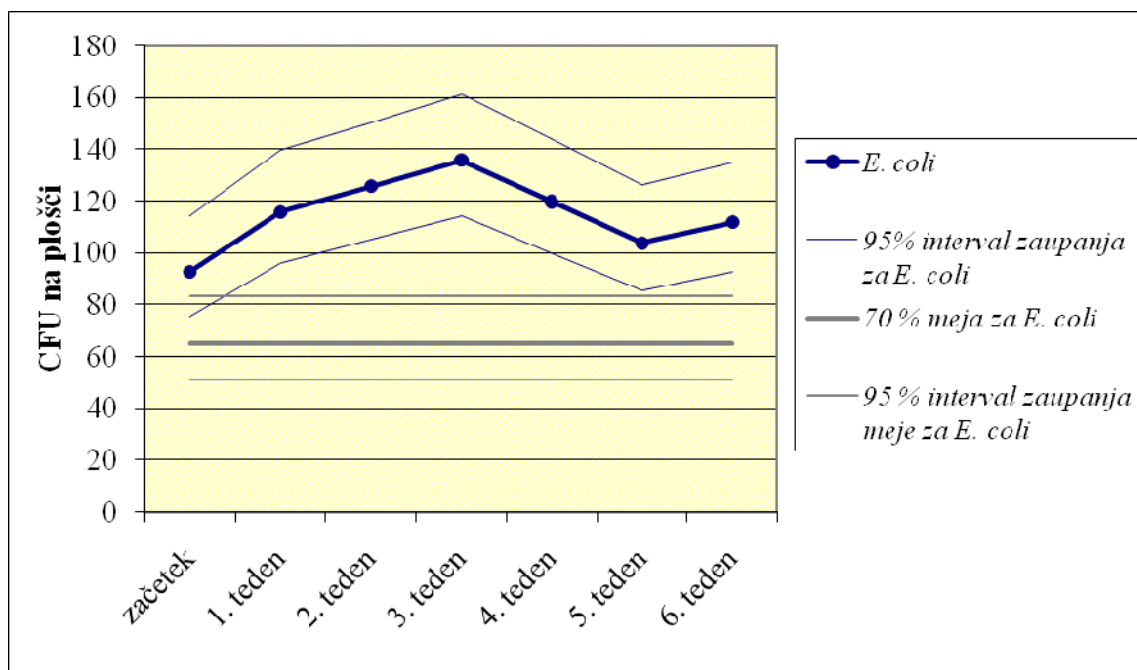
Slika 12: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev *Staphylococcus aureus*



Slika 13: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev *Enterococcus faecalis*



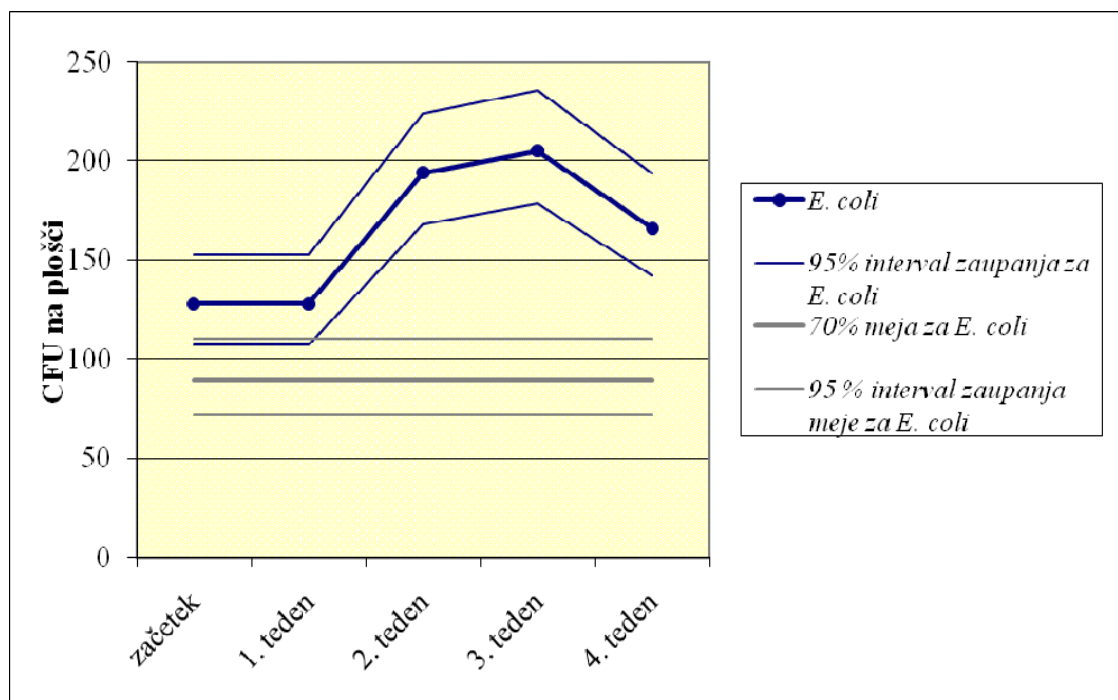
Slika 14: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev *Proteus mirabilis*



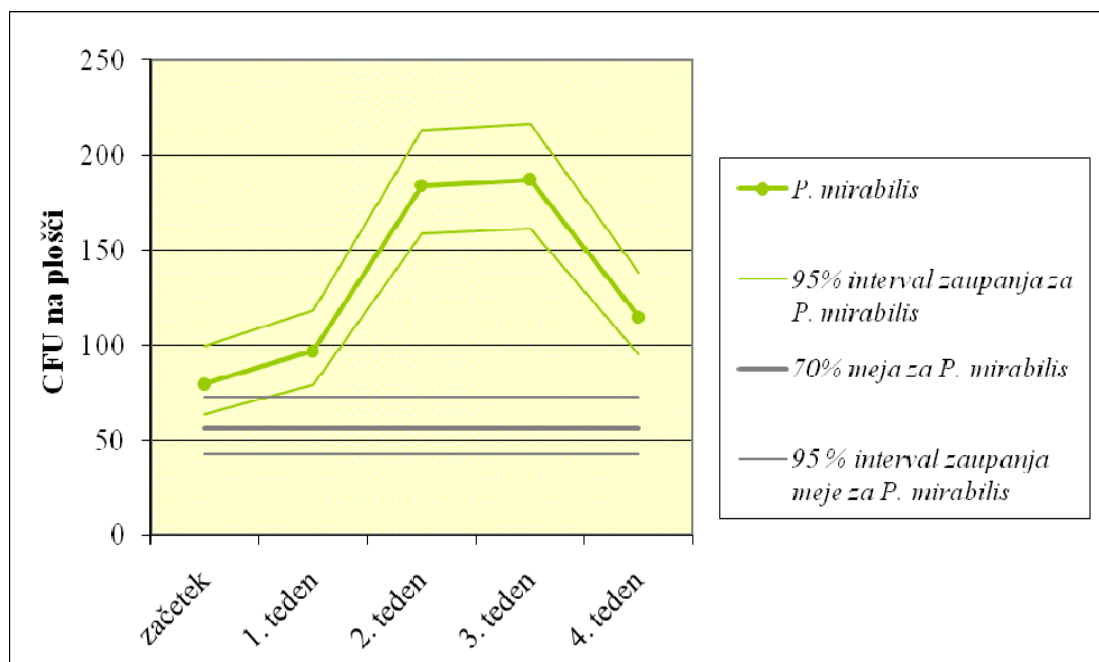
Slika 15: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar CLED in kontrolni sev *Escherichia coli*

4.1.2.2.3 Statistično obdelani rezultati agarja MAC

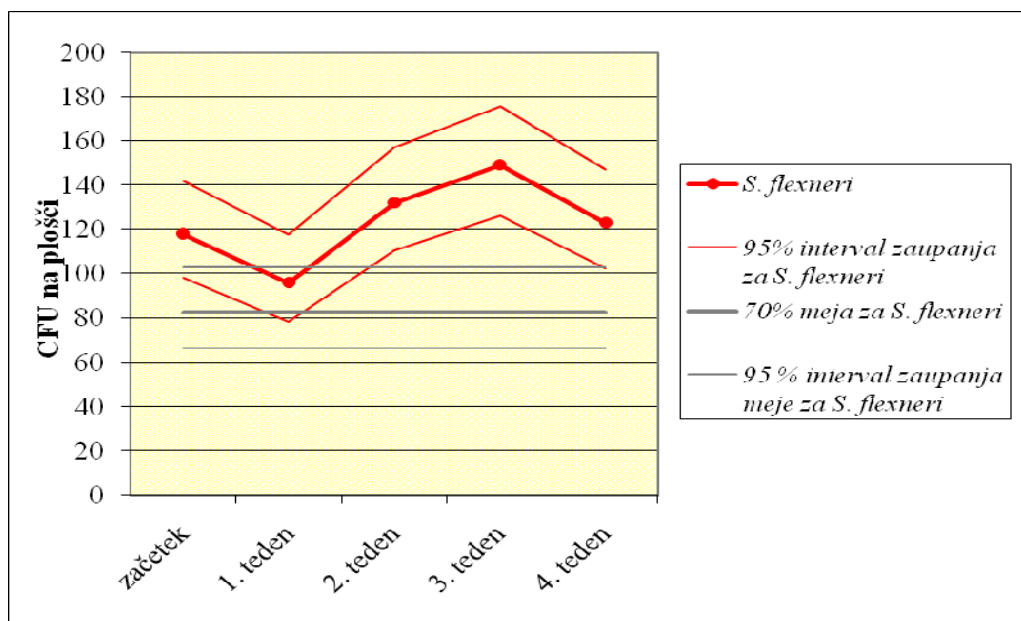
Rezultati vseh kontrolnih sevov za agar MAC so prikazani s slikami 16 – 19. Glede na postavljene kriterije ustreznosti (slika 4) je gojišče MAC ustrezno do 4. tedna po pripravi, kar so pokazali rezultati vseh kontrolnih sevov; izjema je bakterija *Shigella flexneri*, ki v 1. tednu pade v skupino, katera določa, da je gojišče verjetno neustrezno.



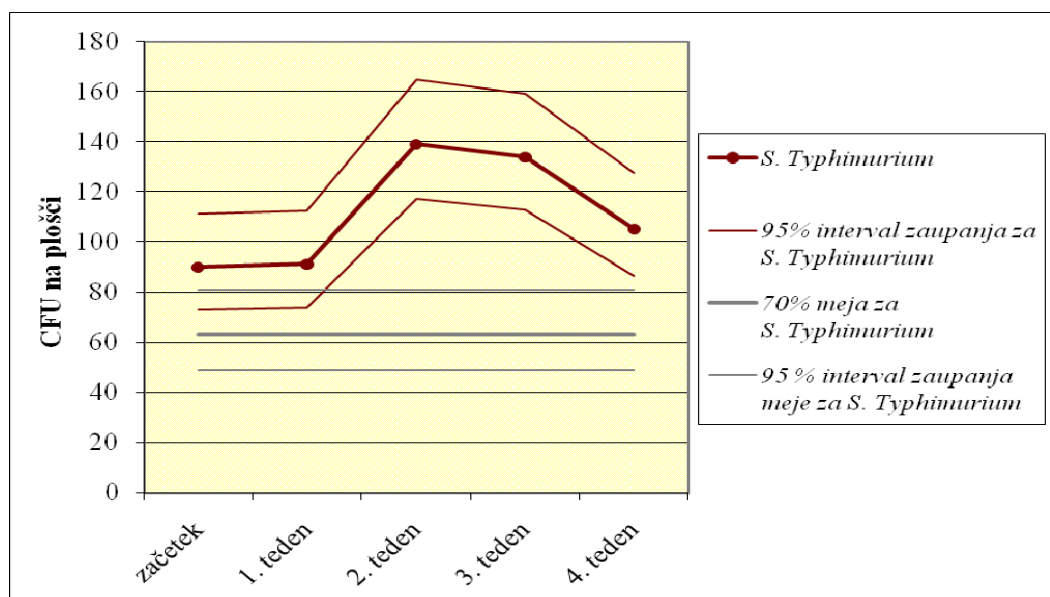
Slika 16: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni sev *Escherichia coli*



Slika 17: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni sev *Proteus mirabilis*



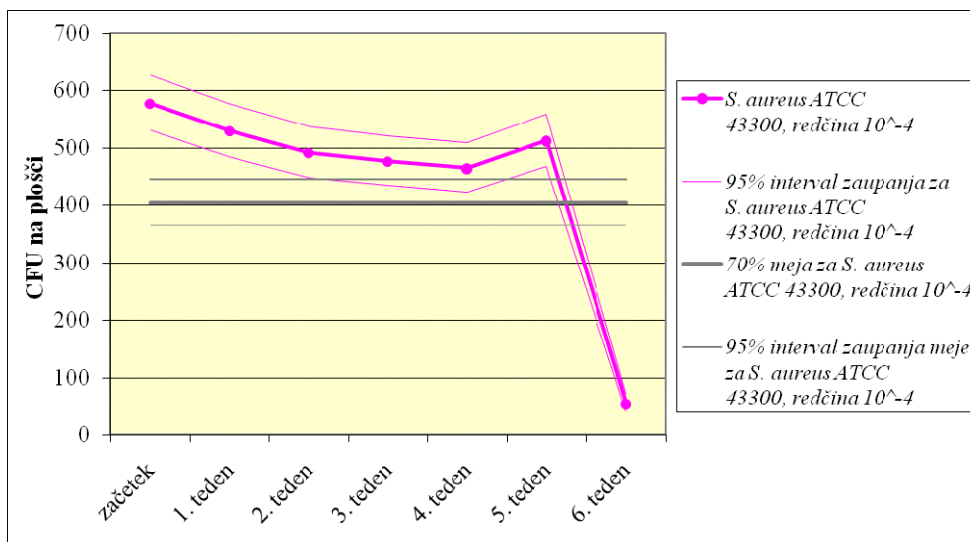
Slika 18: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni sev *Shigella flexneri*



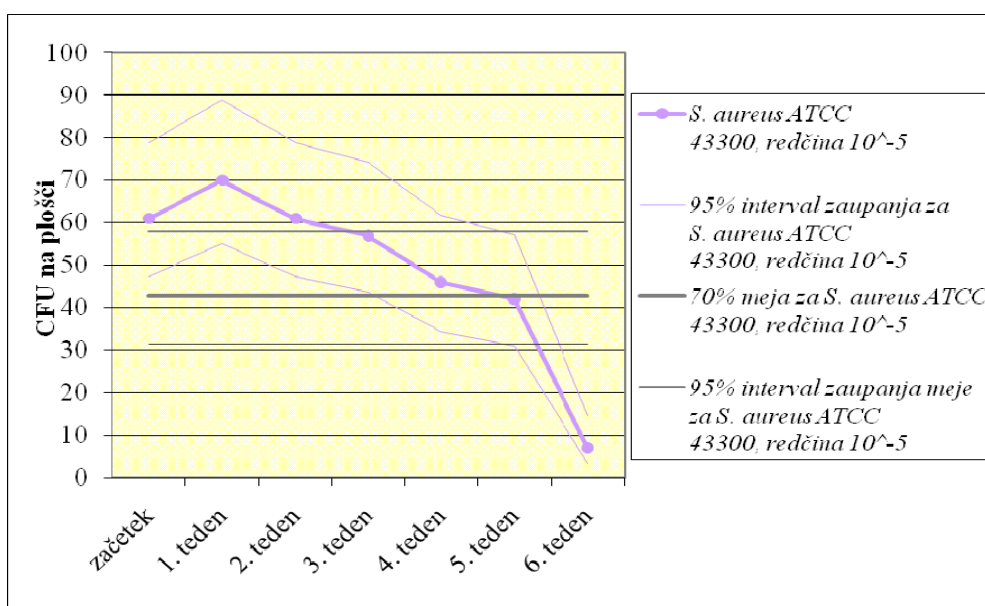
Slika 19: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar MAC in kontrolni sev *Salmonella Typhimurium*

4.1.2.2.4 Statistično obdelani rezultati agarja ORSAB

Rezultati gojišča ORSAB prikazujejo, da je gojišče po močnem padcu rasti v 6. tednu neustrezno (glede na sliko 4). Rezultati rasti pri manj redčenem kontrolnem sevu (slika 20) prikazujejo, da je glede na kriterije ustreznosti na sliki 4, gojišče ustrezno do 5. tedna po pripravi, medtem ko rezultati bolj redčenega istega seva (slika 21) že v 3. tednu padejo v skupino, katera določa, da je gojišče verjetno neustrezno.



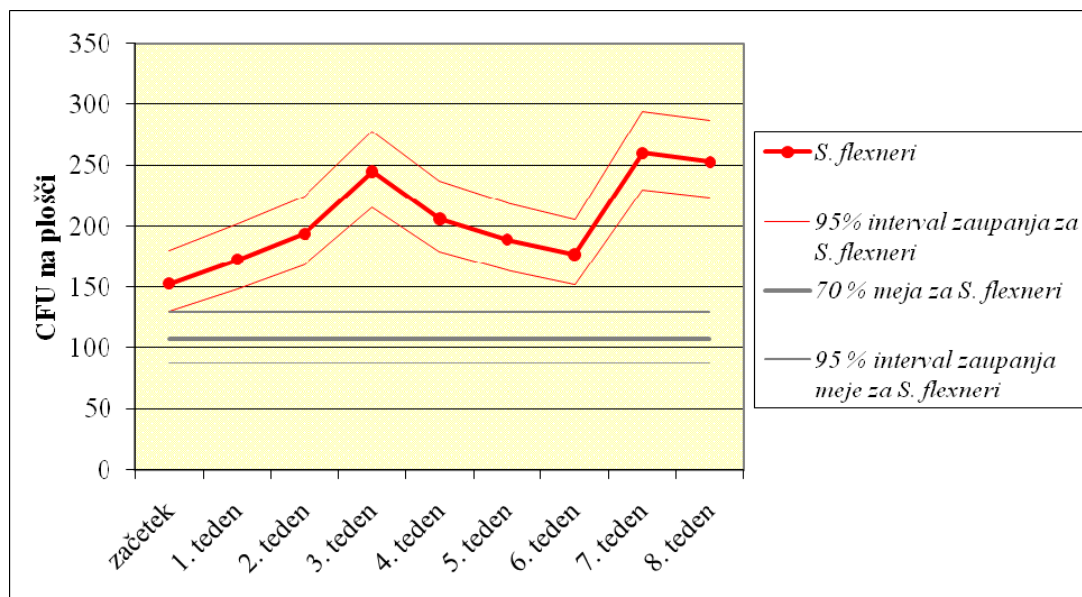
Slika 20: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar ORSAB in kontrolni sev *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, redčine 10^{-4}



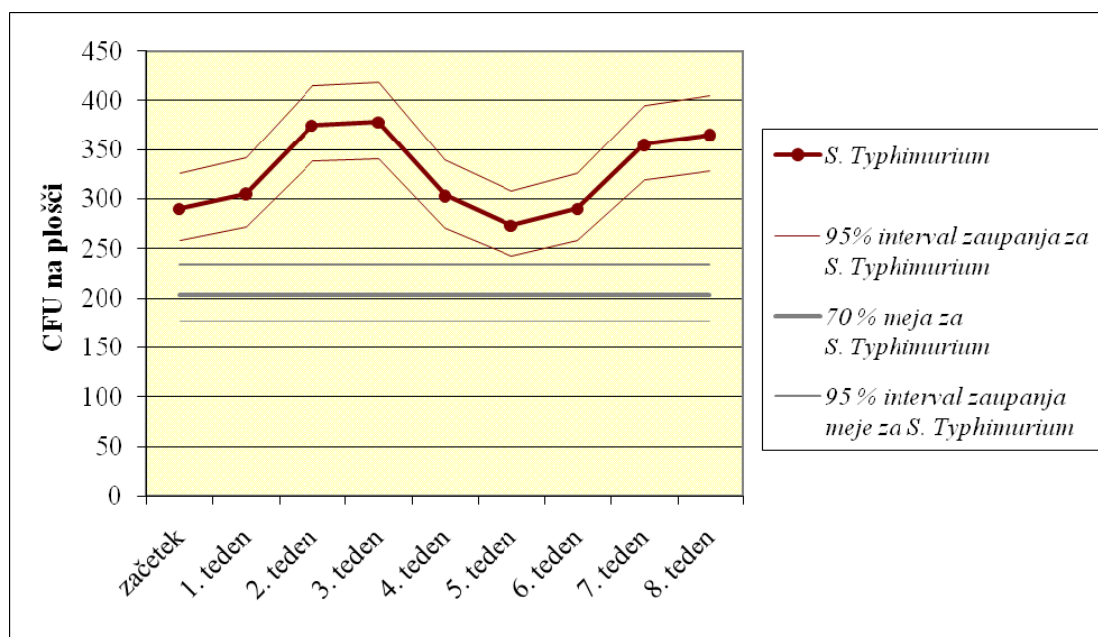
Slika 21: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar ORSAB in kontrolni sev *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, redčine 10^{-5}

4.1.2.2.5 Statistično obdelani rezultati agarja SS

Rezultati obeh kontrolnih sevov za agar SS so prikazani s slikama 22 in 23, ki določata, da je glede na postavljene kriterije ustreznosti (slika 4) gojišče ustrezno do 8. tedna po pripravi.



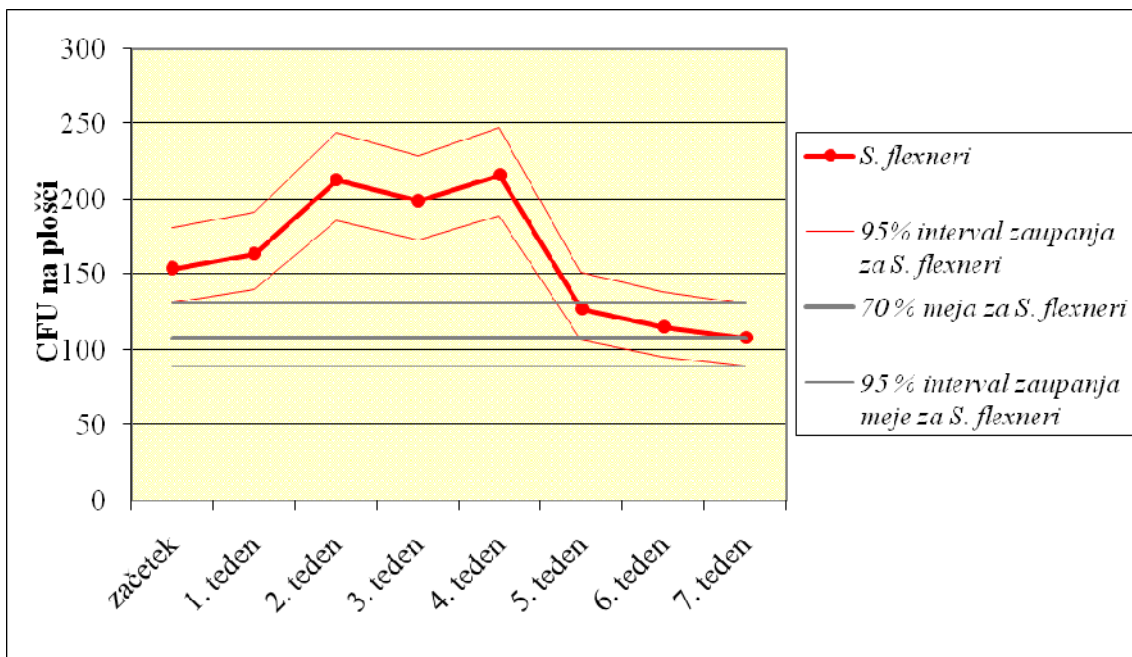
Slika 22: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar SS in kontrolni sev *Shigella flexneri*



Slika 23: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar SS in kontrolni sev *Salmonella Typhimurium*

4.1.2.2.6 Statistično obdelani rezultati agarja XLD

Rezultati agarja XLD so prikazani s sliko 24, ki določa, da je glede na postavljene kriterije ustreznosti (slika 4) gojišče ustrezno do 4. tedna po pripravi, potem pa rast po sunkovitem padcu sodi v skupino rezultatov, ki določajo, da je gojišče verjetno neustrezno.



Slika 24: Statistično obdelani rezultati z določeno mejo uporabnosti za agar XLD in kontrolni sev *Shigella flexneri*

4.2 REZULTATI PREVERJANJA GOJIŠČ ZA IDENTIFIKACIJO IN GOJIŠČ ZA DOLOČANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA ANTIBIOTIKE

V preglednicah 38 – 40 so rezultati testov preverjanja testnih gojišč za identifikacijo. Preglednica 41 vsebuje podatke o izmerjenih conah testiranih antibiotikov z MHS agarjem. Na slikah 25 – 28 pa je grafični prikaz velikosti inhibicijskih con vseh štirih antibiotikov antibiograma na gojišču MHS.

Preglednica 38: Rezultati preverjanja trajnosti agarja DNAA z izvedbo DNA-znega testa posameznih kontrolnih sevov

rezultati testnega gojišča DNAA										
sev	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden	7. teden	8. teden	9. teden
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i> RLS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica 39: Rezultati preverjanja trajnosti gojišča GOI z izvedbo treh vsebovanih testov: G – gibljivost, O – ornitinska dekarboksilaza in I – indol, in sicer z vsakim posameznim kontrolnim sevom

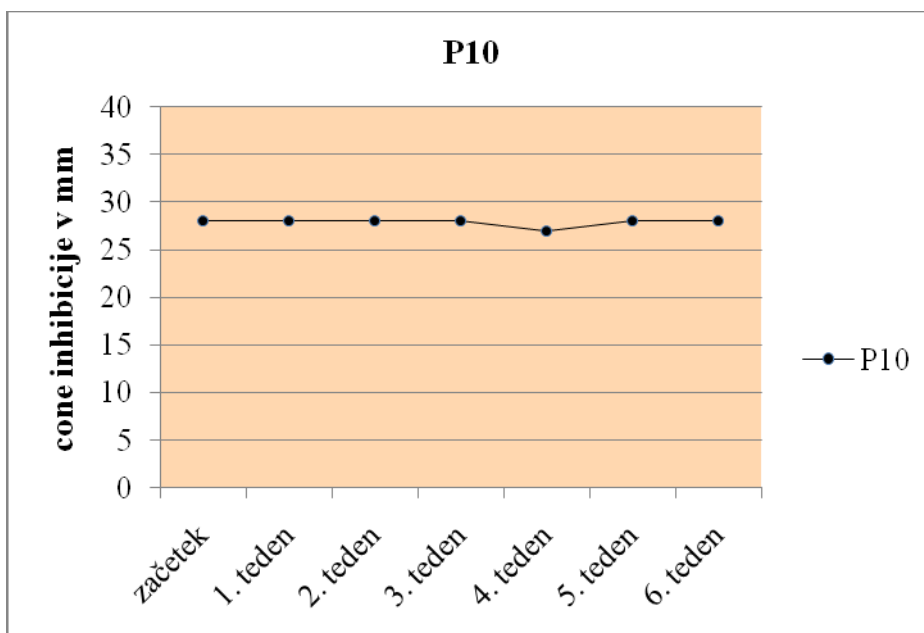
	rezultati testnega gojišča GOI													
sev	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden	7. teden	8. teden	9. teden	10. teden	11. teden	12. teden	13. teden
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>K. pneumoniae</i> RLS	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Preglednica 40: Rezultati preverjanja trajnosti agarja King B kot testa na nastanek pioverdina pri posameznih kontrolnih sevih

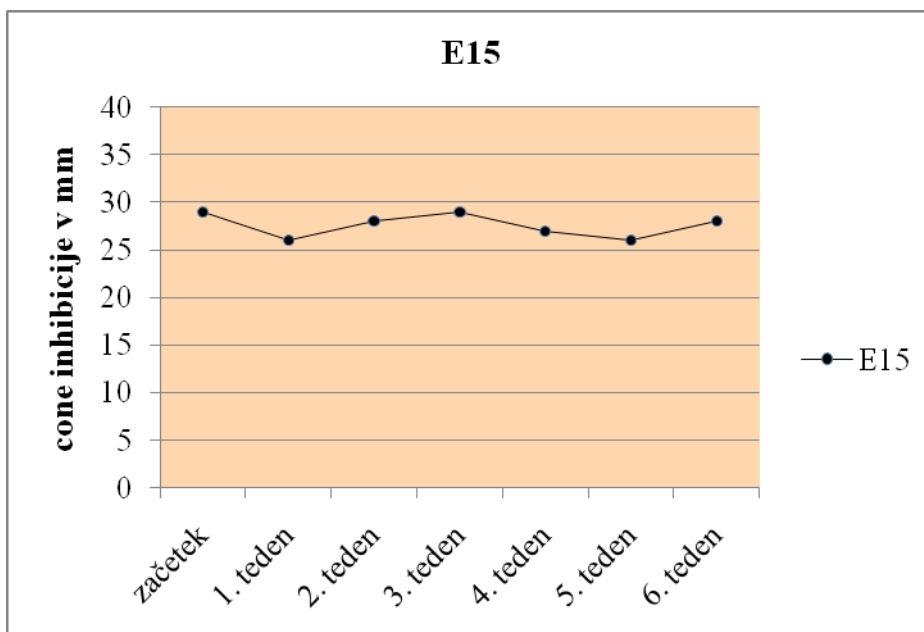
	rezultati testnega gojišča King B													
sev	začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden	7. teden	8. teden	9. teden	10. teden	11.teden	12. teden	13. teden
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Preglednica 41: Rezultati preverjanja trajnosti agarja MHS z izvedbo antibiogramskega testa štirih antibiotikov

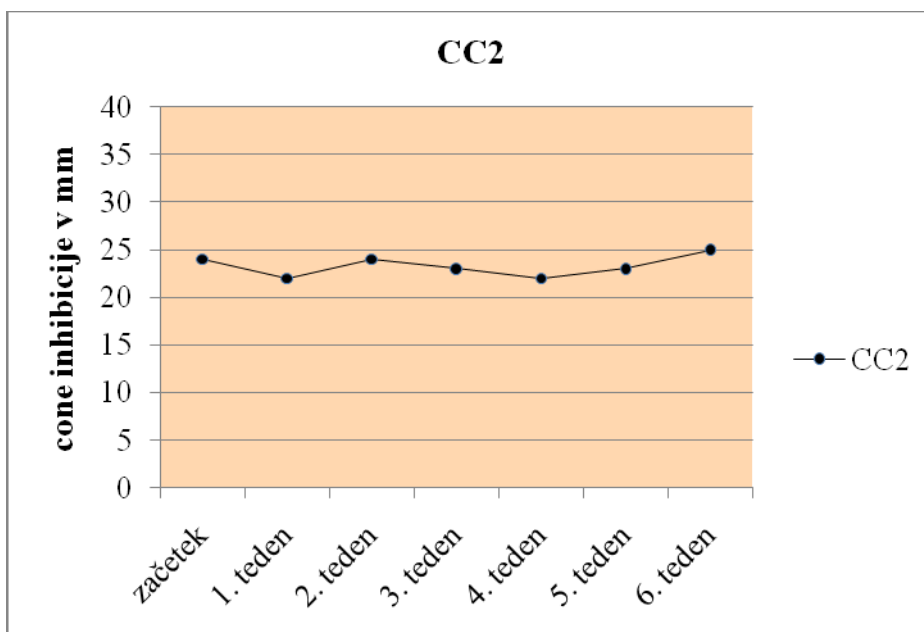
meritev		čas eksperimenta						
		začetek	1. teden	2. teden	3. teden	4. teden	5. teden	6. teden
P10	cone inhibicije v mm	28	28	28	28	27	28	28
E15		29	26	28	29	27	26	28
CC2		24	22	24	23	22	23	25
OX1		9	8	10	9	8	7	7



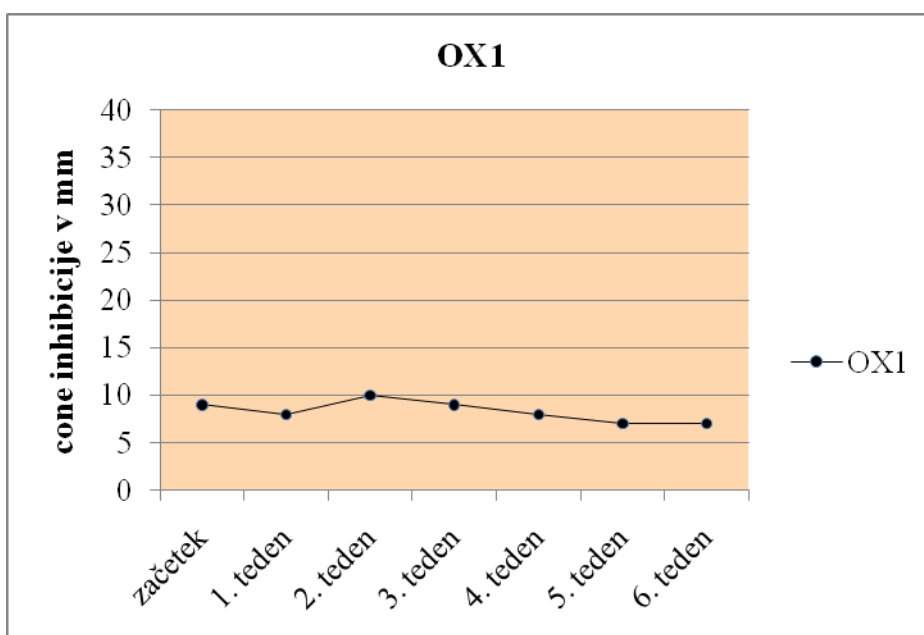
Slika 25: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik penicilin (disk P10) preverjanja trajnosti agarja MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)



Slika 26: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik eritromicin (disk E15) preverjanja trajnosti agarja MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)



Slika 27: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik klindamicin (disk CC2) preverjanja trajnosti agarja MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)



Slika 28: Prikaz rezultatov antibiograma za antibiotik oksacilin (disk OX1) preverjanja trajnosti agarja MHS (proizvajalčevo ime za rdeči Mueller Hinton)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Preverjanje gojišč za izolacijo in kultivacijo

5.1.1.1 Metode za merjenje rasti bakterij na gojiščih za izolacijo in kultivacijo

5.1.1.1.1 Metoda Miles & Misra

Metodo Miles & Misra smo takoj opustili, ker pri nizkih redčinah ni možno šteti kolonij (konfluentna in semikonfluentna rast v preglednici 14). Pri visokih redčinah pa je bil prevelik koeficient variacije: v povprečju 30 % pri TI = 100, pri nižjih TI pa še dosti večji (preglednica 15, zadnja vrstica). Kljub temu smo z njeno pomočjo lažje določali začetni inokulum pri naslednjih opisanih metodah (točneje pri metodi CLSI).

5.1.1.1.2 Ekometrična metoda

Rezultati nam niso dali prave vrednosti dejanskega stanja. Zadnja porasla polja se med duplikati (dveh paralelk) zelo različno pojavijo, čeprav gre za isti vzorec (preglednica 16). Velikokrat manjka rast v vmesnih poljih (preglednica 16, tretji stolpec v poljih A4 in B4 in zadnja dva stolpca, kjer se polje brez rasti vmes večkrat pojavi). Tako ni mogoče natančno odčitati rezultata. Opazi se upad rasti z višanjem redčine, vendar ni enakomeren in ni zadosti za merjenje padca rasti glede na staranje gojišča. Metodo smo kljub njeni enostavnosti in hitri izvedbi opustili, čeprav je zelo priljubljena metoda in se je pri drugih avtorjih (Hyde, 1989, Ulisse in sod., 2006) zelo dobro obnesla.

5.1.1.1.3 Washingtonova metoda

Dobili smo visok koeficient variacije, ki znaša 14,5 % (preglednica 17), kar kaže na slabo ponovljivost te metode.

5.1.1.1.4 Metoda 5 črt

Metoda 5 črt se je izkazala kot zelo dobra, vendar pa vmes zataji, kar je vidno v preglednici 18 pri 5. plošči, kjer je v zadnjem kvadrantu zraslo le 6 kolonij, medtem ko je na ostalih ploščah povsod okrog 70 ali 80. To je posledično zvišalo koeficient variacije, ki je pri obeh preizkusih z različnimi sevi in gojišči znašal nekaj nad 50 % (preglednica 20). Vendar pa je metoda primerna, ko nas zanima približek količine CFU na ml, saj je opazna korelacija med gostoto suspenzije in metodo 5 črt. Tako nam je v pomoč pri izbiri prave koncentracije za cepitev na plošče (začetnega inokuluma) ali vmesni kontroli gojišč in sevov. Pove nam tudi nekaj o rasti organizma na določenem gojišču, torej o relativnem koeficientu rasti, kot je prikazala nastala razlika med obema preizkusoma različnih parov gojišč in kontrolnih sevov (preglednica 18 in preglednica 19).

5.1.1.1.5 Metoda CLSI

5.1.1.1.5.1 Prvotni preizkus metode CLSI

Rezultati so pokazali, da imamo kljub nacepitvi iz iste OS in tako tudi iz iste redčine (istega vzorca) zelo velik koeficient variacije (preglednica 22). Razlog je v neenakomernem nanosu s kalibrirano bakteriološko zanko, kjer se že na oko vidi, da so kapljice v bakterioloških zankah zelo raznolike, zato smo poskusili nanašati redčine s pipetami, potem ko smo ugotovili, kako natančno je njihovo odmerjanje različnih volumnov.

5.1.1.1.5.2 Vpliv odmerjanja volumnov pri metodi CLSI

Kljub upoštevanju, da tehtnica dela napake zaradi velike občutljivosti na zunanje vplive, je koeficient variacije zelo nizek pri vseh treh pipetah. Določili smo sprejemljiv volumen: 50 μ l in 100 μ l (preglednica 23), zato smo v nadaljnje na posamezne plošče nanašali najmanj 50 μ l izbrane redčine. Če smo že volumen 25 μ l izločili, smo tudi manjše volumne opustili, kajti tam bi bile napake verjetno še večje.

5.1.1.1.5.3 Drugi preizkus metode CLSI

Drugi preizkus metode CLSI se od prvotnega razlikuje v tem, da smo povečali volumen nacepa na 50 μ l zaradi ugotovitve v predhodnem preizkusu, da je manj napak pri nacepu večjih volumnov. Tako smo ustrezno tudi zvišali redčino, da smo dobili sprejemljiv TI. Koeficienta variacije števila CFU na plošči pri nacepitvi s pipetami modificirane CLSI sta bila oba sprejemljiva (preglednici 24 in 25), saj sta bila vsaj 2 $\times$ manjša od prejšnjega koeficienta pri nanašanju 10 μ l z bakteriološko zanko (preglednica 22) ali pa od koeficienta variacije pri Washingtonovi metodi (preglednica 17). Večji kot je volumen nacepitve, manjši je koeficient variacije, zato so pipete bolj natančne pri višjih volumnih kot pri nižjih. Natančneje je, če cepimo večje volumne, vendar pa s tem povečamo redčino in tako povečamo število korakov redčenja, ter možnost napake. Zaradi tega smo preizkusili še vpliv redčenja na rezultate.

5.1.1.1.5.4 Vpliv redčenja pri metodi CLSI

V drugem preizkusi metode CLSI smo metodo modificirali s povečanjem redčine in s številom korakov redčenja, zato smo preverili, pri katerem načinu redčenja nastane najmanjša napaka. Opazna je rahla razlika v številu CFU na plošči pri različnem načinu redčenja (preglednica 26). Z redčenjem 10-kratne razredčine je do 50 kolonij več na ploščah, kot pa na ploščah redčenja 100-kratne razredčine. Razliko pokaže tudi visok koeficient variacije, če ga izračunamo za vse meritve skupaj, ne glede na način redčenja (preglednica 27, zadnji stolpec, zadnja vrstica). Koeficient variacije je pri posameznem načinu redčenja za polovico manjši in približno enak 5 %, zato ne moremo trditi, da je en način redčenja boljši od drugega, torej je pri obeh dobra ponovljivost. Razlika je v

primerjavi z ostalimi dejavniki variabilnosti dovolj majhna, da način redčenja bistveno ne spremeni rezultate, zato ni pomembno, kako pridemo do končne želene redčine; sicer pa bomo izbrali enega od načinov in ga uporabljali skozi celoten eksperiment, saj je le pomembno, kako se rezultati iste metode primerjajo med seboj. Če primerjamo rezultate z TI, lahko sklepamo, da je redčenje 10-kratne razredčine bolj točno, čeprav je teh korakov več in s tem večja možnost nastanka napake.

5.1.1.1.5.5 Vpliv različnih osnovnih suspenzij pri metodi CLSI

Preizkus smo naredili, da bi ugotovili, kolikšen delež napake doprinese priprava OS. Rezultati so pokazali, da se je koeficient variacije povišal za približno 5 % pri obeh volumnih nacepitve (preglednice 28 – 31). Priprava OS vpliva na rezultat, vendar se napakam ne moremo izogniti v našem preverjanju trajnosti gojišč, kjer je potrebno vsak teden preizkusa znova pripravljati OS iz sveže kulture standardnih sevov. Najmanjši je bil ta koeficient pri nacepitvi s 50 μ l pipeto redčine 10^{-4} , ki je znašal približno 8 % (preglednica 28 in preglednica 29); maksimalni relativni odklon pa je zaokroženo ± 10 %. Če upoštevamo in izboljšamo vse predhodne faktorje, je vpliv priprave OS minimalen.

5.1.1.1.6 Izbira metode

Za preverjanje trajnosti izbranih bakterioloških gojišč smo izbrali metodo CLSI, ker je pri njej bil sprejemljiv koeficient variacije kljub vsem vplivom na točnost rezultatov. Zaradi nanašanja z bakteriološko zanko sta ekometrična in Washingtonova metoda manj natančni. Metoda Miles & Misra je odpadla zaradi tega, ker ni mogoče prilagajati volumna nacepitve, kajti manjši volumni so pokazali večjo variabilnost rezultatov. Težavno odčitavanje rezultatov je bil tudi problem metode Miles & Misra, saj se ni dalo prešteti kolonij v gosti rasti nižjih redčin OS. Rezultate se je težje odčitati tudi pri ostalih metodah, razen pri ustrezni modifikaciji metode CLSI in metodi 5 črt; kjer so bile lepo števne kolonije do števila 500 na ploščo oziroma 150 na en kvadrant.

Metodo CLSI smo modificirali za optimalno izvajanje preizkusov gojišč, in sicer tako: cepitev s pipeto, volumna 100 μ l redčine 10^{-5} , ki smo jo pripravili z redčenjem 10-kratne razredčine. Modificirana metoda se bolje sklada s koeficienti rasti vseh uporabljenih parov sev – gojišče. Nanos 50 μ l bi dal premajhno število kolonij in s tem večje napake; pri večjem številu kolonij, če so le-te števne, so napake znatno manjše.

Z metodo Miles in Misra smo si pomagali pri določitvi gostote nacepitve. Metodo 5 črt smo uporabljali za vmesne kontrole in tudi lažje določili razmerja med koeficienti rasti za vse kombinacije sevov in gojišč. Omenjenih kontrol v nalogi nismo posebej obravnavali.

5.1.1.2 Interpretacija rezultatov preverjanja gojišč za izolacijo in kultivacijo

5.1.1.2.1 Agar Campy

C. jejuni je zahtevna bakterija in izkazalo se je, da je zelo občutljiva na staranje gojišča. Rast na selektivnem agarju Campy je upadla tako, da smo zaključili, da je bilo gojišče od 3. tedna po pripravi neustrezno, čeprav se je inhibicija seva *E. coli* ohranila ves čas testiranja (slika 11, ter slika 5).

5.1.1.2.2 Agar CLED

Agar CLED smo testirali s štirimi kontrolnimi sevi za opazovanje padca rasti tekom šest tednov. Izkazalo se je, da je gojišče ustrezno celotni čas testiranja. Rast ni upadala pri nobenem sevu (slike 12 – 15), le pri bakteriji *E. faecalis* se rast v 4. tednu zelo približa meji (slika 13), vendar še vedno rezultat uvrstimo v skupino, ki po kriterijih ustreznosti določa, da je gojišče ustrezno. *E. faecalis* je zahtevnejša bakterijska vrsta in ima na agarju CLED manjši koeficient rasti, poleg tega so opazna visoka naključna nihanja vseh rezultatov agarja CLED. Zaradi tega je prišlo tudi do pojava naraščajoče rasti pri bakteriji *P. mirabilis* (slika 14).

5.1.1.2.3 Agar MAC

Tudi agar MAC smo testirali s štirimi sevi za rast, dodali pa smo še en sev za preverjanje inhibicije. To je bakterija *S. aureus*, katera je prikazana v poglavju »4.1.2.1 Prikaz rezultatov preverjanja rasti gojišč za izolacijo in kultivacijo« na sliki 7. Pri vseh kontrolnih sevih rasti, to so *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, *S. Typhimurium*, rast ni upadla, kaže, da je celo narasla, saj je na slikah 18 – 19 slika krivulje enaka. Po dveh tednih je torej gojišče najbolj ugodno, kar pa ne bi mogli trditi če bi se tak vzpon pojavil naključno pri enem samem sevu, kot se je to zgodilo pri *P. mirabilis* na agarju CLED. Pri bakteriji *S. flexneri* rast v 1. tednu celo pade v skupino, ki določa, da je gojišče verjetno neustrezno (slika 18 v primerjavi s sliko 4). Glede na nadaljnje rezultate istega seva, interpretiramo, da je gojišče še ustrezno, saj se rast do konca testiranja potem več ne zniža. Ob upoštevanju, da izbrana metoda dopušča velika nihanja med rezultati, zaključujemo, da je agar MAC uporaben do 4. tedna po pripravi. Dodatni test za to, je potrditev inhibicije seva *S. aureus* (slika 7).

5.1.1.2.4 Agar ORSAB

Agar ORSAB smo testirali s sevom *S. aureus* ATCC 29213 (sev MSSA), ki bi moral ostati inhibiran in s sevom *S. aureus* ATCC 43300 (sev MRSA), s katerim smo merili rast. Slednjega smo uporabili v 2 različnih redčinah 10^{-4} in 10^{-5} , ker smo lažje šteli kolonije pri višji redčini. Inhibicija se je ohranila skozi vseh šest tednov preizkusa (slika 8), rast pa je zelo upadla po petem tednu (slika 20 in slika 21). Glede na postavljene kriterije ustreznosti (slika 4), so rezultati nižje redčine seva MRSA (slika 20) pokazali, da je gojišče ustrezno do 5. tedna, kar pa ne moremo trditi za rezultate višje redčine istega seva (slika 20). Pri

višji redčini seva MRSA se rezultati namreč že v 3. tednu opredelijo po sliki 4 v skupino, ki določa, da je gojišče verjetno neustrezno. Do tega pojava morda pride zaradi tega, ker pri nižjem številu kolonij (torej pri nižjem TI preizkusa) dobimo dosti večje intervale zaupanja. Poleg tega manjša količina kolonij na plošči bolj hitro pokaže neustreznost, saj npr. tukaj odsotnost ene kolonije zajame večji odstotek celotnega števila poraslih kolonij. Ta preizkus je še dodaten dokaz, zakaj smo se v celotni raziskavi trudili, da bi cepili čim nižje redčine. Uporabnost agarja ORSAB smo zaključili glede na rezultate nižje redčine (slika 20), zato trdimo, da je gojišče ustrezno do 5. tedna po pripravi.

5.1.1.2.5 Agar SS

Kljub velikim nihanjem rezultatov rasti sevov *S. flexneri* in *S. Typhimurium*, je gojišče SS agar ustrezno do konca testiranja, to je do 8. tedna po pripravi (glede na sliko 4). Gojišče je selektivno, tako da inhibira rast sevov *E. coli* in *E. faecalis*, s katerima smo prav tako preizkušali agar SS, še celo en teden dlje (slika 9). Omenjena seva sta po osmih tednih bila popolnoma inhibirana, deveti teden pa je bakterija *E. coli* tvorila 2 koloniji. To je zapisano le v preglednici 36, ker na sliki 9 pojav rasti sploh ni opazen. Zaključimo, da je gojišče osem tednov po pripravi še uporabno, 9. teden pa se selektivnost zmanjša.

5.1.1.2.6 Agar XLD

Agar XLD je glede na rast bakterije *S. flexneri* ustrezno do 4. tedna po pripravi (slika 24), potem pa rast po sunkovitem padcu sodi v skupino rezultatov, ki določajo, da je gojišče verjetno neustrezno. Sev za preizkus inhibicije *E. coli* vseh sedem tednov ni tvoril kolonij, kar pomeni, da se je inhibicija ohranila skozi celotni čas testiranja (slika 10). Zadnje tri rezultate bomo tukaj interpretirali kot pokazatelje, da je gojišče neustrezno, čeprav smo pri isto uvrščenem rezultatu pri agarju MAC (slika 18) storili ravno obratno. Pri agarju MAC so vsi nadaljnji rezultati in vsi rezultati ostalih sevov kazali na ustreznost gojišča, pri agarju XLD pa je prišlo do očitnega padca rasti. Če povzamemo vse rezultate, lahko zaključimo, da je gojišče agar XLD še uporabno 4. teden po pripravi. Izpustili smo rezultate seva *S. Typhimurium*, vendar je ravno tako v preglednici 37 vidno, da rast upade v 5. tednu.

5.1.2 Interpretacija rezultatov preverjanja testnih gojišč

5.1.2.1 Agar DNAA

Rezultati so bili ustrezni skozi celotni čas testiranja, torej zaključimo, da je gojišče ustrezno vsaj 9 tednov po pripravi (preglednica 38).

5.1.2.2 Gojišče GOI

Rezultati so bili ustrezni skozi celotni čas testiranja, torej zaključimo, da je gojišče ustrezno vsaj 13 tednov po pripravi (preglednica 39).

5.1.2.3 Agar King B

Rezultati so bili ustrezni skozi celotni čas testiranja, torej zaključimo, da je gojišče ustrezno vsaj 13 tednov po pripravi (preglednica 40).

5.1.2.4 Agar MHS

Rezultati vseh 4 testiranih antibiotikov so bili ustrezni skozi celotni čas testiranja. Cone inhibicije (slike 25 – 28) so vsakokrat bile znotraj mej, ki so standardno določene v CLSI (2006b):

- penicilin 24 – 30 (mm)
- eritromicin 25 – 30 (mm)
- klindamicin 19 – 25 (mm)
- oksacilin ≤ 12 mm

Gojišče MHS agar je uporabno vsaj 6 tednov po pripravi.

5.1.3 Možne izboljšave metod za preverjanje trajnosti in kriteriji za ustreznost gojišč

Pri testiranju življenjske dobe gojišč za izolacijo in kultivacijo smo se omejili samo na preverjanje rasti kontrolnih sevov. Velikokrat pa se testirajo zraven še drugi parametri. Tako so Ullisse in sod. (2006) v svojem preizkusu merili še pH vrednost na vsaki točki, ko so merili tudi rast. Prav tako so vsakokrat gojišče stekali, da bi določili izgubo vode. V naši nalogi smo se oklepali mnenja, da sproti preverjanje pH in vsebnosti vode v gojiščih ni toliko pomembno, dokler le-to ne začne vplivati na rast. Vpliv smo hitro opazili ob kvantitativnem merjenju rasti, saj smo se s tem osredotočili le na delovanje gojišča. Ob merjenju rasti smo se zanašali še na ostale lastnosti gojišča za optimalno delovanje, katerih kakovost smo preverili takoj po pripravi gojišča. To kakovost naj bi gojišče ohranilo do konca svoje trajnosti (ustreznosti). MHS gojišče je prestalo tovarniško kontrolo kakovosti. Zavedati se moramo, da obširno testiranje kakovosti še ne zagotavlja, da bo vsak sev oživel na taki stopnji, da bo sposoben tvoriti kolonije in tudi to, da se rast divjih tipov na naših izbranih gojiščih lahko zelo razlikuje od rasti standardnih sevov, ki smo jih mi uporabili za raziskavo.

Za nekatera gojišča za izolacijo in kultivacijo bi bilo dobro, da bi jih testirali še z mešano kulturo kontrolnih sevov, da bi lahko opazovali, kako se neka bakterijska vrsta obnaša poleg ostalih vrst v populaciji in kako se to spreminja s staranjem gojišča. V naravi so poleg povzročitelja še pridružene bakterije ali bakterije normalne flore, čeprav v majhnem številu. Uporaba mešane kultura pri preverjanju trajnosti bi ponazorila tudi naravno kompeticijo med mikroorganizmi. Takšno testiranje pa ima tudi nekatere slabosti: manj natančni rezultati zaradi težje priprave raztopin mešanice sevov in njihovih redčin, kar je bilo ključno za odločitev za delo s čistimi kulturami.

Da bi zmanjšali nihanja rezultatov merjenja rasti pri gojiščih za izolacijo in kultivacijo, bi bilo najboljšje uporabiti točno določen inokulum. Tako bi imeli vsi preizkusi enako izhodišče. Možno je nabaviti zamrznjene kulture, ki vsebujejo točno določeno število bakterij (ali CFU), vendar iz finančnih razlogov tega nismo uporabljali.

Meja 70 % začetne rasti pri gojiščih za izolacijo in kultivacijo je bila izbrana, ker so tudi drugi avtorji uporabljali to mejo. Če bi uporabili nižjo mejo, npr. 50 %, bi pomenilo, da pol manj CFU na ploščah še zadostuje, da bi ocenili gojišče kot ustrezno. To bi bilo v redu, ko je kolonij veliko število; če pa je malo CFU v vzorcu (1 ali 2), pa se bakterija lahko »izgubi«. Tako bi se mogli ozirati na uporabnost določenih agarjev: npr. CLED agar za izolacijo urinskih patogenih bakterij bi lahko testirali z 50 % mejo, saj so bakterije v urinu zelo različne, medtem, ko gojišča, na katere se cepijo kužnine z manjšim številom takih bakterij (kar pa je tudi že okužba), ne moremo obravnavati enako.

5.2 SKLEPI

- Vsa enostavna gojišča za izolacijo in kultivacijo so uporabna vsaj 4 tedne, gojišča z dodanimi antibiotiki pa 2 tedna po pripravi (razen ORSAB agarja, ki je prav tako ustrezen do 5. tedna po pripravi).
- Nekatera gojišča so bila uporabna tudi dlje od 4 tednov, vendar smo življenjsko dobo prilagodili občutljivejšim sevom in občutljivejšemu delu populacije. Tako smo dobili tudi varnostni faktor za napake, ki se lahko zgodijo med shranjevanjem.
- Obstočnost gojišč je boljša, kot jo zagotavljajo standardi.
- Življenjska doba gojišč za identifikacijo je vsaj 13 tednov ali vsaj 9 tednov, če je testno gojišče agar v petrijevki, kot je gojišče DNAA.
- Gojišče za določanje bakterijske občutljivosti za antibiotike MHS je uporabno vsaj 6 tednov po pripravi. Datum roka trajanja se določi interno, glede na datum priprave svežih gojišč.

6 POVZETEK

Gojišča za izolacijo in kultivacijo bakterij, ter gojišča za identifikacijske teste in antibiogramе morajo omogočati optimalne pogoje za rast bakterij. Pri zagotovitvi kakovosti se vrši kontrola takoj po pripravi gojišč in določi se življenjska doba. Življenjska doba gojišča je maksimalni čas, v katerem gojišče ohrani vse fizikalno-kemijske lastnosti, esencialne za pravilno rast in karakterizacijo mikroorganizmov.

V pregledani literaturi je življenjska doba določena zelo različno oz. so podatki o tem zelo skopi. Za trdna gojišča vse od 10 dni do 16 tednov. Za gojišča v epruvetah pa od 2 ali 3 tedne do 12 mesecev.

Naše delo je bilo preizkusiti trajnost izbranih bakterioloških gojišč. Izbrali smo 11 gojišč. 6 za izolacijo in kultivacijo: Campy, CLED, MAC, ORSAB, SS in XLD, ter 3 gojišča za identifikacijo: DNAA, GOI, King B in gojišče za določanje občutljivosti bakterij za antibiotike: MHR.

Gojišča smo testirali s čisto kulturo kontrolnih sevov, ki smo jih izbrali po priporočilih skupine PHLS in po lastni presoji smo določene seve dodali. Uporabili smo zamrznjene standardne seve. Pripravili smo jih tako, da so bili za vsak preizkus na novo odmrznjeni v svežih kolonijah čiste kulture.

Preden smo se lotili testiranja gojišč, smo za to izbrali ustrezno metodo. Preizkusili smo jih več in izbrali metodo CLSI, saj je imela najnižji koeficient variacije: 14,1 % oz. 2,4 % po modifikaciji z zvišanjem volumna nacepitve. Metodo smo preizkusili tudi tako, da smo preverili, kako vpliva redčenje in priprava osnovnih suspenzij na variabilnost rezultatov. Testna gojišča smo testirali s testi za neko izraženo lastnost, za določanje katere so gojišča namenjena.

Raziskavo smo začeli s pripravo izbranih bakterioloških gojišč in kontrolo kakovosti po pripravi. Vsak teden smo jih testirali z izbrano metodo ali ustreznim testom. Po nacepiti smo gojišča inkubirali in drugi dan odčitati rezultate. Pri gojiščih za izolacijo in kultivacijo je bil rezultat število kolonij kot merilo rasti, pri testnih gojiščih pa smo opazovali spremembo rezultata testa. Rezultate rasti smo statistično obdelali in določili 95 % interval zaupanja. Izračunali smo 70 % mejo za ustreznost gojišč od 100 % rasti, za katero smo vzeli število kolonij, ki so zrastle ob prvem nacepiti na sveže pripravljeno gojišče. Glede na to mejo smo uvrstili rezultate rasti in jih tako interpretirali, da smo določili kako dolgo je gojišče uporabno. S tem smo določili novo življenjsko dobo gojišč.

Zaključili smo, da je življenjska doba trdnih gojišč za izolacijo in kultivacijo vsaj 4 tedne in vsaj 2 tedna, če so dodani antibiotiki. Življenjska doba testnih gojišč je vsaj 13 tednov

ali vsaj 9 tednov, če je testno gojišče trdno, kot je gojišče DNAA. Življenjska doba gojišča MHS je vsaj 6 tednov.

Rok trajanja je datum, do katerega je gojišče ustrezno za namen uporabe in se določi interno glede na datum priprave svežih gojišč. Če gojišča pripravi že proizvajalec, tudi ta določi rok trajanja.

7 VIRI

- Bio-Rad. 2000. Culture media manual. 10th ed. Marnes la coquette, Bio-Rad: 207 str.
- Biolife. 2003. Biolife manual. 3rd ed. Milano, Biolife: 195 str.
- CLSI. 2006a. M2-A9: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 9th ed. Approved Standard. Wayne, CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute: 37 str.
- CLSI. 2006b. M100-S16: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 16th Informational Supplement. Wayne, CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute: 89 str.
- Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media. 2003. Zimbro M. J., Power D. A. (eds.). Sparks, Becton Dickinson and Co.: 696 str.
- Hyde W. A. 1989. Quality control. V: Medical bacteriology: A practical approach. Hawkey P. M., Lewis D. A. (eds.). Oxford, IRL press: 235-246
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 249 str.
- Mikrobiološki slovar. 1994. 1. izd. Banič S. (ur.). Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 248 str.
- Miller J. M. 1991. Quality control of media, reagents, and stains. V: Manual of clinical microbiology. 5th ed. Balows A., Hausler W. J. Jr., Herrmann K. L., Isenberg H. D., Shadomy H. J. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1203-1225
- NCCLS. 1996. M22-A2: Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. 2nd ed. Approved Standard. Wayne, NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards: 18 str.
- Nichols E. 1999. Quality control of culture media. V: Quality assurance principles and practice in the microbiology laboratory. Snell J. J. S., Brown D. F. J., Roberts C. (eds.). London, Public Health Laboratory Service: 119-140
- Oxoid. 2009a. Campylobacter blood-free selective medium (modified CCDA – Preston). V: Dehydrated culture media. Cambridge, Oxoid Ltd.
- http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0739&c=UK&lang=EN (12. oktober, 2009): 1 str.
- Oxoid. 2009b. Oxacillin resistance screening agar base – ORSAB. V: Culture media supplements. Cambridge, Oxoid Ltd.

http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0195&c=UK&lang=EN (12. oktober, 2009): 1 str.

Sewell D. L. 1992. Quality control. V: Clinical microbiology procedures handbook. Vol 2. Isenberg H. D. (ed.). Washington, American Society for Microbiology: 13.2.1-13.2.35

SIST EN ISO 8199. Kakovost vode: Splošno navodilo za štetje mikroorganizmov v gojišču. 2007: 38 str.

SIST ENV ISO 11133-1. Mikrobiologija živil in krme: Navodila za pripravo in pridobivanje gojišča – 1. del: Splošna navodila o zagotavljanju kakovosti priprave gojišča v laboratoriju. 2002: 17 str.

Sneath P. H. A., Johnson R. 1972. The influence of taxonomic similarities of errors in microbiological tests. Journal of General Microbiology, 72: 377-392

Stokes E. J. 1975. Clinical bacteriology. 4th ed. London, Edward Arnold: 394 str.

Ulisse S., Peccio A., Orsini G., Di Emidio B. 2006. A study of the shelf – life of critical culture media. Veterinaria Italiana, 42, 3: 237-247

Vandepitte J., Verhagen J., Engbaek K., Rohner P., Piot P., Heuck C. C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. Geneva, World Health Organization: 167 str.

Washington J. A. 1985. Laboratory procedures in clinical microbiology. 2nd ed. New York, Springer – Verlag: 885 str.

Weissfeld A. S., Bartlett R. C. 1987. Quality control. V: Clinical and pathogenic microbiology. Howard B. J., Klaas J., Rubin S. J., Weissfeld A. S., Tilton R. C. (eds.). St. Louis, CV Mosby Co.: 35-65. Cit. po: Westwell A. 1999. Quality control of bacterial characterisation tests. V: Quality assurance principles and practice in the microbiology laboratory. Snell J. J. S., Brown D. F. J., Roberts C. (eds.). London, Public Health Laboratory Service: 141-150

Weissfeld A. S., Bartlett R. C. 1994. Quality management. V: Clinical and pathogenic microbiology. 2nd ed. Howard B. J., Smith T.F., Weissfeld A.S., Tilton R.C., Keiser J.F. (eds.). St. Louis, Mosby – Year Book: 47-82