

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

Tadej Malovrh
Peter Hostnik
Vojka Bole Hribovšek
Irena Zdovc

MIKROBIOLOGIJA Z IMUNOLOGIJO

navodila za vaje



♦ splošna bakteriologija ♦ virologija
♦ serološke metode ♦ molekularna biologija

Ljubljana 2009

KAZALO

1. VAJE: Uvod v delo z mikrobi	3
2. VAJE: Izolacija bakterij v čisti kulturi	7
3. VAJE: Barvanje bakterij	10
4. VAJE: Gojenje bakterij in antibiogram	14
5. VAJE: Biokemijska preiskava in čitanje antibiograma	19
6. VAJE: Osnove mikologije	26
7. VAJE: Odvzem vzorcev za virološko preiskavo, gojenje virusov v poskusnih živalih in zarodkih kokošjih jajc	37
8. VAJE: Celična kultura, tripsinizacija, izolacija in dokaz virusov	43
9. VAJE: Aglutinacija in precipitacija. Sterilizacija in razkuževanje	51
10. VAJE: Seronevtralizacijski test in test reakcija vezave komplementa	58
11. VAJE: Imunofluorescenčni in imunoperoksidazni test	63
12. VAJE: Encimsko imunski test	68
13. VAJE: Molekularna diagnostika živalskih bolezni	73

1. VAJE:

UVOD V DELO Z MIKROBI

Uvod:

Na uvodnih vajah predstavimo program vaj, vse sodelujoče pri vajah, predstavi se priporočena literatura, študente pa se seznani tudi s študijskimi pravili (pogoji za priznanje vaj, obiskovanje vaj, kolokviji, ocenjevanje)

Obnašanje v laboratoriju:

Ko vstopimo v vajalnico se preoblečemo v halje in ko jo zapustimo, halje obesimo na obešalnik in jih ne nosimo ven. Na delovnem pultu med delom z mikrobi ne smemo imeti knjig in zvezkov, po opravljenem delu počistimo in razkužimo delovno površino. Ker delamo z biološkim materialom moramo paziti na osebno varnost. Po končanem delu v laboratoriju si umijemo, osušimo in nato razkužimo roke.

Pravilno delo in postopanja v laboratoriju

Za pravilno in varno delo v laboratoriju je potrebno poznati pojem aseptičnega dela ter se praktično seznani z njim. Za uspešno delo z mikrobi moramo spoznati in se naučiti osnovnih tehnik za delo z njimi. Mikrobo gojimo na različnih gojiščih. Bakterijska gojišča delimo po izvoru na naravna (ne poznamo popolnoma kemične sestave: krompir, korenje, mleko, riž) in umetna (poznamo kemično sestavo); umetna gojišča pa lahko razdelimo glede na trdnost (tekoča, poltrdna in trdna) in pa na namen uporabe (osnovna, obogatena, bogatitvena in posebna ali specialna gojišča, ki jih naprej delimo na selektivna in diferencialna). Trdna gojišča pripravimo v Petrijevih ploščah (petrijevke) ali v epruvetah, agar kot osnova pa daje temu gojišču trdost in konsistenco. Morfološke značilnosti mikrobov opazujemo s prostim očesom, ko opazujemo kolonije ali pa z mikroskopom. Zato moramo poznati in osvojiti pravilno

rokovanje z mikrobi, saj tako lahko preprečimo različne kontaminacije in okužbe. Pravilno delo z mikroskopom nam omogoča natančno opazovanje naravnih in obarvanih preparatov bakterij, izognemo pa se tudi poškodbi drage opreme. Po vsakem delu v laboratoriju moramo material, ki ga obdelujemo narediti neškodljivega za okolico, kar naredimo z razkuževanjem in sterilizacijo.

PRAKTIČNO DELO

Gojišča, ki jih bomo uporabili na vajah primerno označimo. Petrijevke označimo tako, da na dnu, čimbolj ob robu z alkoholnim pisalom napišemo datum, ime in priimek, skupino ter vrsto materiala, ki smo ga nacepili na gojišče.

Ugotavljanje mikroorganizmov v zraku

S sedimentacijsko metodo določamo količino mikroorganizmov zraku. V ta namen na delovno površino postavimo za 60 minut odprto petrijevko s krvnim agarjem. Mikroorganizme (bakterije in plesni), ki padejo na površino gojišča nato inkubiramo 18 do 24 ur (čez noč) na 37°C, ter preštejemo število zasevkov bakterij in plesni.

Ugotavljanje mikroorganizmov na različnih telesnih površinah

Prisotnost mikrobov pa lahko dokažemo tudi na prstih pred in po umivanju. S konicami prstov, najprej umazanih, nato pa še umitih rok nežno podrgnemo po površini gojišča. Inkubiramo 18 do 24 ur (čez noč) na 37°C in nato opazujemo različne kolonije mikroorganizmov in njihovo gostoto. Izolacijo bakterij iz žrela naredimo z vatenko, s katero se previdno dotaknemo nebnic, nežno »povrtamo« ter nato z vatenko razmažemo po površini gojišča. Po inkubaciji na 37°C opazujemo bakterijske kolonije.

Razpredelnica za opisovanje makroskopskih značilnosti bakterijskih kolonij po izolaciji mikrobov iz kužnine.

vrsta kužnine	makroskopski opis kolonij na gojišču	število kolonij
Označi tiste bakterijske kolonije iz kužnine, ki se bodo uporabljale za izolacijo v čisti kulturi		

Zaradi tedenskega razporeda vaj, trdna gojišča po inkubaciji shranimo v nepredušno zaprtih vrečkah na temperaturi od 4°C do 7°C. Pri takem shranjevanju se lahko na samem gojišču in na bakterijskih kolonijah pojavijo neznčilne spremembe, zato se v vsakdanji praksi tak način le redko uporablja.

Namen vaje

V praktičnem delu vaj naj bi študent s pomočjo vodje vaj osvojil osnovne tehnike za izolacijo mikrobov iz različnih vrst kužnine. Pri svojem delu študent zapisuje svoja opažanja, ki jih na koncu vaj strne v protokol, ki ga bo uporabil kot osnovo za naslednje vaje.

2. VAJE:

IZOLACIJA BAKTERIJ V ČISTI KULTURI

Uvod:

Pregledamo gojišča na katerih so zrasle bakterijske kolonije. Po zunanjem izgledu, se pravi makroskopsko, opazujemo in primerjamo bakterijske kolonije in kolonije plesni, ki so zrasle po nasaditvi iz različnih kužnin. Poudarek je na opazovanju števila, gostote in prekrivanja kolonij, velikosti, barve, oblike in profila kolonij, opazovanje sprememb na in v gojišču, kot posledica rasti bakterij.

Makroskopsko opazovanje kolonij

Izgled bakterijske kolonije na površini trdnega bakterijskega gojišča (agarja): velikost (premer v mm), oblika (okrogle, nepravilne, filamentozne, rizodne) barva (prozorne, sivobebe, rumene, oranžne, vijolične), površina (gladka, mokra, suha, nagubana, motna, zrnata, svetleča), rob kolonije (gladek-S, hrapav-R, valovit, narezan, nazobčan), konsistenca (trdne, gumene, drobtinaste, maslene, vlečljive), profil (ploske, dvignjene, konveksne, umbilicirane). Bakterijske kolonije lahko vraščajo v gojišče, nekatere ustvarjajo pigment, nekatere tvorijo toksine, ki lizirajo eritrocite (nepopolna-alfa hemoliza in popolna beta-hemoliza)

Kako izoliramo čisto kulturo

Na plošči s primarno mešano bakterijsko kulturo izberemo kolonijo, ki jo želimo izolirati v čisti kulturi (subkulturi). Z mikrobiološko zanko se izbrane kolonije le dotaknemo in jo precepimo na sveže trdno gojišče. Pri tem pazimo, da se z zanko dotaknemo resnično samo ene značilne kolonije, ki jo cepimo po načinu redčenja. Tako nam bodo po inkubaciji na gojišču zrasle kolonije dovolj redko,

da jih lahko preštejemo in določimo njihovo čistost. S prostim očesom tako lahko opazujemo njihove morfološke značilnosti in jih opisujemo.

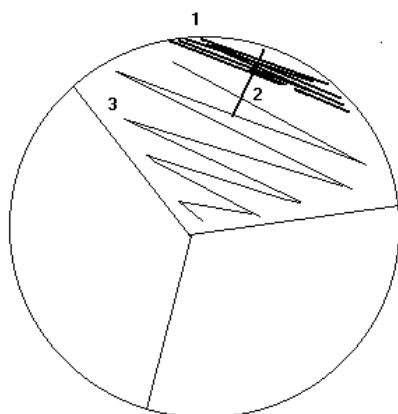
PRAKTIČNO DELO

Makroskopsko razločevanje bakterijskih kolonij in izolacija čiste kulture

Po inkubaciji gojišč, na katera smo na prvih vajah nanesti kužnino, lahko opazujemo bakterijske kolonije. S prostim očesom opiši značilnosti bakterijskih kolonij in jih preštej, če gostota kolonij to dopušča, svoja opažanja opiši v tabelo na koncu opisa 1. vaje (stran 4). Po pregledu gojišča in makroskopskem opisu kolonij se odloči za štiri različne kolonije, ki jih boš kasneje izoliral v čisti kulturi. Kadar število kolonij ni pomembno, gostoto rasti izrazimo opisno: posamezne kolonije (nekaj kolonij), dobra rast (v 3. potegu redčenja na skici so posamezne kolonije), gosta rast (v 3. potegu redčenja na skici ni posameznih kolonij).

Uporabi sveže trdno gojišče (krvni agar), ga razdeli na toliko delov, kolikor kolonij v čisti kulturi boš izoliral. Uporabljal cepljenje z redčenjem tako, da za vsak poteg, ki je označen s številko na skici, uporabi sterilno mikrobiološko zanko.

Skica: cepljenje z redčenjem



vrsta kužnine	morfološki opis kolonije	število kolonij ali opisni izraz

Namen vaje

Študent naj bi v množici kolonij na gojišču prepoznal različne kolonije in opisal njihov izgled. Z uporabo mikrobiološke zanke naj bi izbrane in opisane kolonije precepil na novo gojišče, z namenom izolacije čiste kulture. Študent se seznani tudi z metodami redčenja bakterijske kulture. Izvedene postopke si zabeleži kot gradivo za naslednje vaje in za pripravo protokola.

3. VAJE:

BARVANJE BAKTERIJ

A. Opazovanje rasti bakterij na gojiščih - nadaljevanje poskusa iz 2. vaje

Preglej cepljena gojišča iz prejšnje vaje in opiši rast mikrobov na gojiščih. Pri tem opazuj:

Pri posameznem trdnem gojišču:

Koliko različnih vrst kolonij je na gojišču

Koliko kolonij posamezne vrste je na gojišču (gosta rast, zmerna rast, posamezne)

Pri posamezni koloniji (opiši najpogostejšo vrsto kolonij z vsakega gojišča, če so na več gojiščih enake najpogostejše kolonije, opiši z vsakega gojišča drugačne kolonije):

velikost (oceni premer v mm)

obliko (okrogle, nepravilne, filamentozne, rizoidne, kot film)

barvo (prosojne, sive, rumene, z metalnim leskom),

površino (gladka, hrapava, nagubana),

rob (gladek, nazobčan, razvejan)

profil (ploščata, izbočena, z izbočenim centrom in ploščatim robom, vdrta, nagubana)

konsistenco (suhe, drobljive, mazave, vraščene),

hemolizo (na krvnem agarju - popolna, nepopolna, zeleneča)

Vzorec 1: Vrsta vzorca:	Oznaka:
Gojišče:	
Opis kolonij:	
Vzorec 2: Vrsta vzorca:	Oznaka:
Gojišče:	
Opis kolonij:	
Vzorec 3: Vrsta vzorca:	Oznaka:
Gojišče:	
Opis kolonij:	
Vzorec 4: Vrsta vzorca:	Oznaka:
Gojišče:	
Opis kolonij:	

B. Obarvani mikroskopski preparati

Izberi eno kolonijo in z bakteriološko zanko suspendiraj delček kolonije v kapljici fiziološke raztopine na predmetnem stekelcu. Če je suspenzija pregosta, kani kapljico fiziološke raztopine na novo predmetno stekelce in z bakteriološko zanko prenesi vanjo kapljico pregoste suspenzije, da jo razredčiš. Okrog razmaza naj ostane vsaj 2 mm prazne površine.

Oznaka vzorca in gojišče:

--

Opis kolonije:

--

Počakaj, da se preparat posuši, nato ga fiksiraj tako, da stekelce trikrat potegneš skozi plamen. Razmaz pobarvaj po Gramu. Preglej pod mikroskopom z imerzijskim oljem. Opazuj barvo (grampozitivni - vijolična, gramnegativni - rdeča), obliko (paličke: npr. dolge, kratke, tanke, široke; koki, spirili), okvirno velikost (velike, srednje, majhne), razporejanje (posamezne, verižice, skupki, pod kotom, ena ob drugi)

Barvanje po Gramu (Merckov komplet):

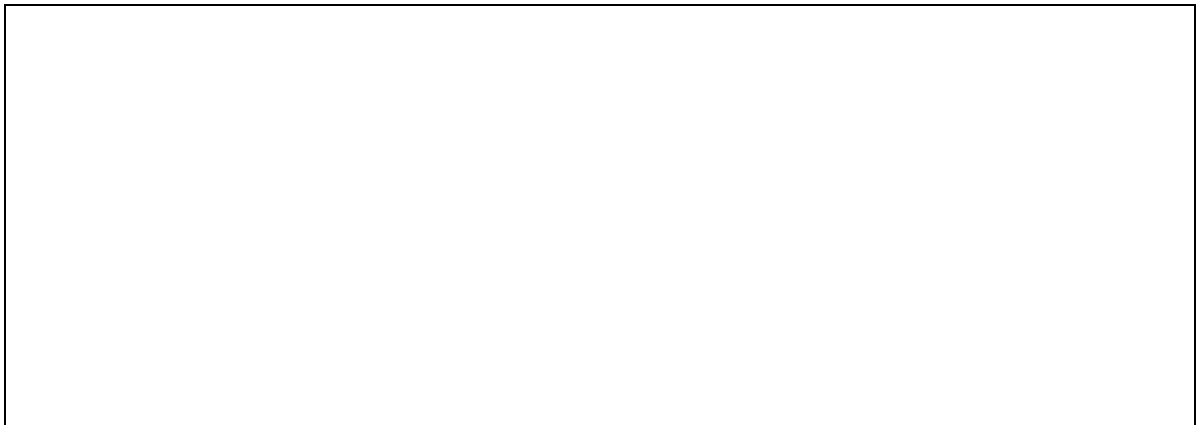
1. Prelj s karbol gencianskim vijoličnim in barvaj 1 minuto, nato odlij barvilo
2. Speri razmaz z lugolom, ga prelij z njim in ga pusti delovati 1 minuto
3. Odlij lugol
4. Spiraj z destilirano vodo ca. 5 sekund
5. Prelj z alkoholno raztopino (raztopino za razbarvanje) in jo 5 - 10 sekund nežno prelivaj po preparatu tako, da ga s pinceto nagibaš v različnih

smereh. Čas je odvisen od debeline razmaza - dokler odpušča barvo.

Razmaz postane sivkasto moder.

6. Spiraj z destilirano vodo ca. 5 sekund.
7. Prelij z 1% raztopino safranina in barvaj 1 minuto.
8. Spiraj z destilirano vodo ca. 5 sekund.
9. Posuši na zraku ali popivnaj z vpojnim papirjem.

Opis obarvanega preparata:



Barvanje po Löfflerju (metilensko modrilo v alkoholu + KOH):

1. Pripravimo razmaz, ga posušimo na zraku ter fiksiramo nad plamenom
2. Prelijemo ga z barvilom po Löfflerju in barvamo 3 do 5 minut
3. Speremo pod vodovodno vodo in ga posušimo
4. Opazujemo pod mikroskopom, mikrobi se obarvajo modro, pri mikrobih s tem barvanjem dokazujemo tudi kapsulo (pri tem preparata ne smemo fiksirati nad plamenom, temveč za fiksacijo uporabimo metanol 3-5 min).

4. VAJE:

GOJENJE BAKTERIJ IN ANTIBIOGRAM

A. Testiranje gojišč

Pripravi preskus primerjave rasti bakterije *Escherichia coli* na dveh gojiščih: nevtralni agar (NA) ali agar po Drigalskem (DA). Vsaka skupina (4 mize) testira 2 NA in 2 DA.

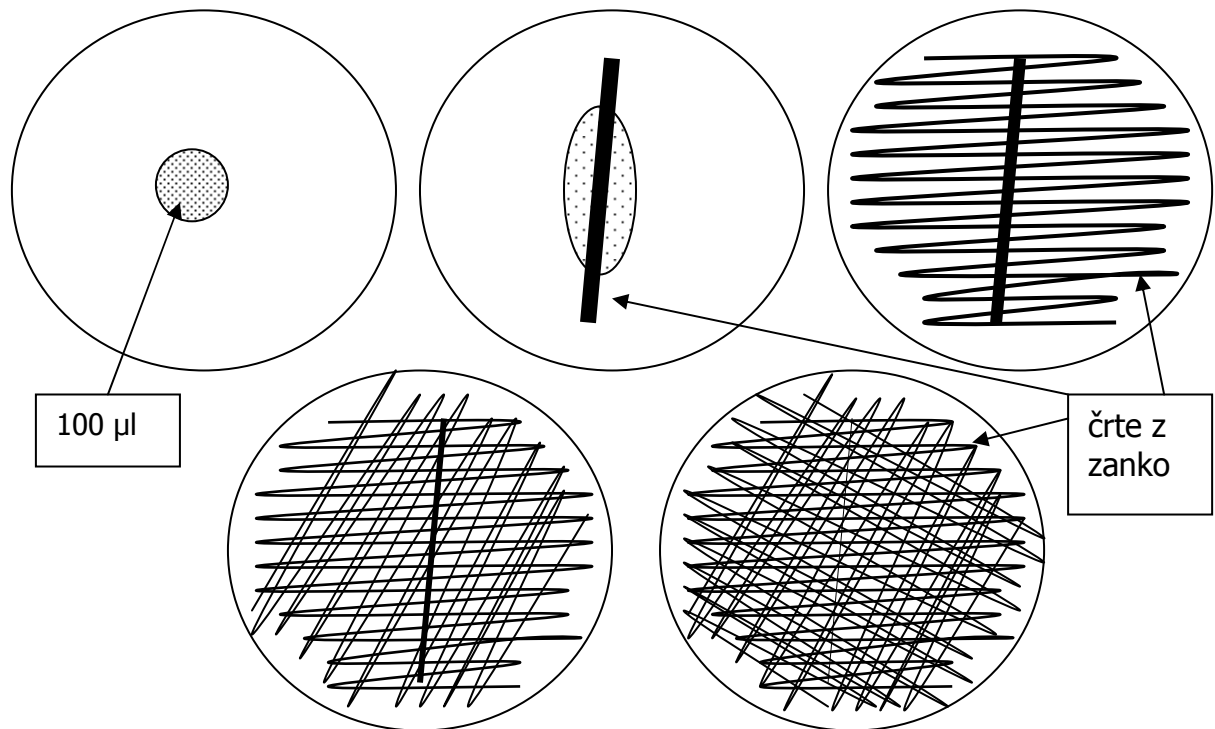
Iz začetne suspenzije bujonske kulture razredčene 10^{-4} pripravi še 3 razredčine: 10^{-5} , 10^{-6} in 10^{-7} .

Pripravi 3 epruvete s po 4,5 ml sterilne fiziološke raztopine in jih označi z oznakami: »-5«, »-6« in »-7«.

S pipetorjem in nastavki za pipetiranje prenesi 0,5 ml suspenzije razredčene 10^{-4} v 4,5 ml sterilne fiziološke raztopine, označene z »-5«. Zavrzi nastavek. Z novim nastavkom za pipetiranje premešaj tako, da trikrat potegneš suspenzijo v nastavek in iztisneš iz njega. Prenesi 0,5 ml suspenzije razredčine 10^{-5} v 4,5 ml sterilne fiziološke raztopine, označene z »-6«. Zavrzi nastavek. Z novim nastavkom za pipetiranje premešaj tako, da trikrat potegneš suspenzijo v nastavek in iztisneš iz njega. Prenesi 0,5 ml suspenzije razredčene 10^{-6} v 4,5 ml sterilne fiziološke raztopine, označene z »-7«. Zavrzi nastavek. Z novim nastavkom za pipetiranje premešaj tako, da trikrat potegneš suspenzijo v nastavek in iztisneš iz njega. Pripravi po 2 gojišči NA (miza 1 in 3) ali DA (miza 2 in 4) in ju označi: številka skupine (rimska) / številka mize (arabska) / razredčina (»-6« ali »-7«) / študent (kratica)

Iz razredčine 10^{-6} cepi po 100 μ l na eno gojišče, označeno z »-6« ter iz razredčine 10^{-7} cepi po 100 μ l na gojišče, označeno z »-7«.

Za vsako razredčino vzemi novo bakteriološko zanko in razsadi *E. coli* po vsej površini čim bolj enakomerno, tako da greš v »cik-caku« čez ploščo v treh različnih smereh (glej skico). Gojišče odpri poleg plamena (nekaj cm proč), tako da je površina obrnjena proti plamenu in čim bolj pokončna (da je čim manjša površina, na katero bi lahko padali mikrobi iz zraka). Za vsako smer zasukaj gojišče za ca. 60°.



Inkubiraj pri 37°C ± 1°C 24 ur ± 3 ure. Nato shrani v hladilniku do naslednjih vaj. Na naslednjih vajah preštej število kolonij (n) na vsaki plošči in izračunaj povprečno število kolonij v 1 ml suspenzije 10⁻⁶ za NA in DA po spodnji formuli.

$$\text{Povprečno število v 1 ml} = \frac{n_{\text{iz prve } 10^{-6}} + n_{\text{iz druge } 10^{-6}} + n_{\text{iz prve } 10^{-7}} + n_{\text{iz druge } 10^{-7}}}{0,1 \times (2 + 0,1 \times 2)}$$

Primerjaj število kolonij na obeh gojiščih

Gojišče	10^{-6}	10^{-7}	Povprečje
NA	miza 1:	miza 1:	
	miza 3:	miza 3:	
			Skupaj:
DA	miza 2:	miza 2:	
	miza 4:	miza 4:	
			Skupaj:
NA + DA			Skupaj:

B. Cepljenje antibiograma - disk difuzijska metoda

V 3 ml sterilne fiziološke raztopine pripravi suspenzijo *E. coli* gostote 0,5 po Mc Farlandu. Dobro homogeniziraj. Označi z A.

Prenesi 1 kapljo (z bakteriološko zanko ali s pipetorjem) v sveže 3 ml sterilne fiziološke raztopine. Dobro homogeniziraj. Označi z B.

Namoči sterilno vatenko v suspenzijo B. Pusti, da se dobro navlaži in nato višek vlage odstrani s pritiskanjem na notranjo stran epruvete nad tekočino.

Označi gojišče: številka skupine (rimska) / številka mize (arabska) / študent (kratica)

Razdeli hrbtno stran gojišča z voodpornim pisalom na 4 dele in jih označi z 1 do 4 (glej spodnjo skico).

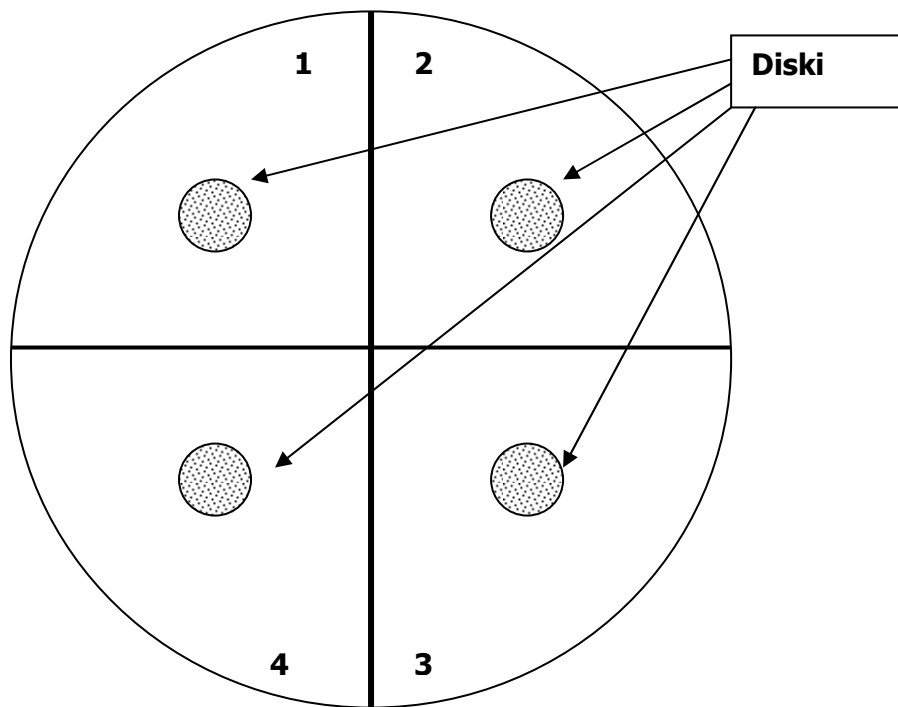
Odpri gojišče poleg plamena (nekaj cm proč), tako da je površina obrnjena proti plamenu in čim bolj pokončna (da je čim manjša površina, na katero bi lahko padali mikrobi iz zraka). Z vatenko premaži površino gojišča Mueller-Hinton s cik-cak gibi v treh smereh (glej zgornjo skico). Za vsako smer zasukaj tako gojišče kot vatenko za ca. 60°.

Pusti pokrito gojišče ca. 10 minut, da se tekočina dobro vpije.

V spodnjo tabelo vpiši podatke o diskih s protimikrobno učinkovino (zdravilom).

Na vsak del aseptično (ob plamenu) nanesi s pinceto ustrezen disk s protimikrobno učinkovino (zdravilom). Da ne zamenjaš strani, ko odpreš gojišče, si pomagaj tako, da položiš kazalec na tisto četrtno gojišča, na katero želiš položiti disk.

Pusti pokrito gojišče ca. 10 minut na pultu, da protimikrobne učinkovine difundirajo v gojišče.



Inkubiraj pri $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 24 ur $\pm$ 3 ure. Nato shrani v hladilniku do naslednjih vaj.

Na naslednjih vajah izmeri cone inhibicije rasti v mm (če sega rast do diska, je cona 6 mm).

V tabeli poišči oceno občutljivosti za vsako protimikrobno učinkovino in jo označi s »S« za občutljiv (angl. sensitive), »I« za vmesen (angl. intermedium) in »R« za odporen (angl. resistant).

Zaporedna številka	Protimikrobna učinkovina	Oznaka diska	Cona inhibicije (mm)	Ocena občutljivosti
1				
2				
3				
4				

5. VAJE:

BIOKEMIJSKA PREISKAVA IN ČITANJE ANTIBIOGRAMA

A. Biokemijska preiskava

Z biokemijsko preiskavo ugotavljamo bakterijski metabolizem. Lahko ugotavljamo encime neposredno ali pa vmesne ali končne produkte metabolizma.

A.1 Ugotavljanje encimov neposredno:

Oksidaza: Na predmetno stekelce položi košček filtrirnega papirja in kani nanj kapljico reagenta za oksidazo. Z bakteriološko zanko prenesi eno kolonijo iz krvnega agarja na filtrirni papir in opazuj reakcijo. Če kolonija v ca. 10 sekundah pomodri, je reakcija pozitivna, če ostane barva nespremenjena je negativna.

Zabeleži rezultat:

Pseudomonas sp.: _____ *E. coli*: _____

Katalaza: Z bakteriološko zanko prenesi na predmetno stekelce kolonijo in nanjo kani kapljico 3% raztopine H_2O_2 . Če se na koloniji pojavijo mehurčki, pomeni, da je katalaza razgradila H_2O_2 na H_2O in O_2 . Reakcija je pozitivna. Če tudi po eni minuti ni mehurčkov, je reakcija negativna.

Zabeleži rezultat:

Streptococcus sp.: _____ *E. coli*: _____

A.2 Posredno ugotavljanje encimov:

Oksidacija-fermentacija glukoze: V trdnem gojišču v epruveti je glukoza in indikator bromtimol modro (v kislem rumen, v bazičnem moder). Cepimo dve gojišči hkrati. Eno inkubiramo aerobno, drugo prelijemo s parafinskim oljem, da so razmere v njem anaerobne. Po inkubaciji primerjamo spremembo barve v obeh gojiščih.

Ocena rezultata:

aerobno	anaerobno	rezultat
rumena površina	modro	oksidacija
rumeno	rumeno	oksidacija in fermentacija
modro	rumeno	fermentacija
rumeno dno	rumena površina	fermentacija - mikroaerofilne bakterije
modro	modro	ne razgrajuje glukoze

Zabeleži rezultat:

<i>Listeria sp.</i> : _____ <i>Pseudomonas sp.</i> : _____
<i>Clostridium sp.</i> : _____ <i>E. coli</i> : _____

Razkroj glukoze: V tekočem gojišču je glukoza, Andradejev indikator (v kislem rožnat, v bazičnem brezbarven) in Durhamova cevka. Ob razkroju glukoze se gojišče obarva rožnato. Če se razkroj nadaljuje do plina, se v Durhamovi cevki nabere mehurček.

Zabeleži rezultat:

<i>Pasteurella sp.:</i>
<i>E. coli:</i>
<i>Pseudomonas sp.:</i>

A.3 Identifikacija z biokemijskimi kompleti

Za identifikacijo bakterij in kvasovk so na voljo komercialni biokemijski kompleti. Narejeni so iz jamic, v katerih so dehidrirana gojišča. S suspenzijo mikrobov jih rehidriramo in po predpisani inkubaciji odčitamo reakcije po navodilih proizvajalca, na primer glede na spremembo barve, motnost, fluorescenco. V nekatere jamice moramo dodati tudi reagente, ki so del kompleta, da reakcija postane vidna. Na spremnem obrazcu zabeležimo, v katerih jamicah je bila reakcija pozitivna. Glede na shemo kompleta, dobi vsaka pozitivna reakcija določeno število točk, ki jih nato seštejemo po shemi in s tem spremenimo v številčno kodo. Rezultat, ki pripada posamezni kodi, poiščemo v priročniku ali v računalniškem programu. Podana je tudi zanesljivost rezultata, izražena v odstotkih. Pri zanesljivosti manj kot 90% so običajno potrebni še dodatni testi, ki so prav tako navedeni.

Oceni reakcije v komercialnem kompletu API 20 E po navodilih proizvajalca in zabeleži rezultat.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA OX

1 2 4 1 2 4 1 2 4

Številčna koda:

Rezultat:

B. Preverjanje občutljivosti za protimikrobne učinkovine - minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) z mikrodilucijsko metodo

V mikrotitrski plošči so v jamicah po spodnji shemi nanese različne količine protimikrobnih učinkovin. V jamice odpipetiramo bakterijsko suspenzijo in inkubiramo. Po inkubaciji ocenimo rast v vsaki jamici posebej. Rast je vidna kot motna suspenzija, zavrta rast pa kot bistra tekočina. MIK je tista najmanjša koncentracija protimikrobne učinkovine, ki še zavre rast. Preglej mikrotitrsko ploščo in zabeleži rezultate preiskovanega seva *E. coli*. Primerjaj svoje rezultate z rezultati predvidenimi za referenčni sev *E. coli*.

MIK

Oznaka	Protimikrobna u.	Oznaka	Protimikrobna u.
SMX	Sulfametoksazol	TMP	Trimetoprim
GEN	Gentamicin	CHL	Kloramfenikol
CIP	Ciprofloksacin	COL	Kolistin
AMP	Ampicilin	FFN	Florfenikol
FOT	Cefotaksim	KAN	Kanamycin
TAZ	Ceftazidim	NAL	Nalidiksinska ksl.
TET	Tetraciklin	NEG	neg kontrola
STR	Streptomycin	POZ	poz kontrola

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SMX 8	GEN 0,25	CIP 0,008	CIP 0,015	CIP 0,03	CIP 0,06	CIP 0,12	CIP 0,25	CIP 0,5	CIP 1	CIP 2	CIP 4
B	SMX 16	GEN 0,5	AMP 0,5	FOT 0,06	TAZ 0,25	TET 1	STR 2	TMP 0,5	CHL 2	FFN 2	KAN 4	CIP 8
C	SMX 32	GEN 1	AMP 1	FOT 0,12	TAZ 0,5	TET 2	STR 4	TMP 1	CHL 4	FFN 4	KAN 8	NAL 4
D	SMX 64	GEN 2	AMP 2	FOT 0,25	TAZ 1	TET 4	STR 8	TMP 2	CHL 8	FFN 8	KAN 16	NAL 8
E	SMX 128	GEN 4	AMP 4	FOT 0,5	TAZ 2	TET 8	STR 16	TMP 4	CHL 16	FFN 16	KAN 32	NAL 16
F	SMX 256	GEN 8	AMP 8	FOT 1	TAZ 4	TET 16	STR 32	TMP 8	CHL 32	FFN 32	KAN 64	NAL 32
G	SMX 512	GEN 16	AMP 16	FOT 2	TAZ 8	TET 32	STR 64	TMP 16	CHL 64	FFN 64	KAN 128	NAL 64
H	SMX 1024	GEN 32	AMP 32	FOT 4	TAZ 16	TET 64	STR 128	TMP 32	COL 8	COL 16	NEG KONT	POZ KONT

ANTIBIOTIK	<i>E. coli</i> ATTCC 25922	<i>E. coli</i> RDK 052	OCENA
	predpisana MIK vrednost	odčitana MIK vrednost	vrednosti znotraj dovoljenih mej (DA/NE)
Ampicilin	2,0 - 8		
Cefotaksim	0,03 - 0,12		
Ceftazidim	0,06 - 0,5		
Ciprofloksacin	0,004 - 0,015		
Florfenikol	2,0 - 8		
Gentamicin	0,25 - 1		
Kanamycin	1,0 - 4		
Kloramfenikol	2,0 - 8		
Kolistin	0,25 - 1		
Nalidikslinska kisl.	1,0 - 4		
Streptomycin	4,0 - 16		
Sulfonamidi	8,0 - 32		
Tetraciklin	0,5 - 2		
Trimetoprim	0,5 - 2		

C. Ocenjevanje antibiograma - disk difuzijska metoda

V spodnjo tabelo vpiši zaporedne številke protimikrobne učinkovine, njihova imena in oznake diskov.

Z merilom izmeri premer cone inhibicije rasti vmilimetrih (preko sredine diska) v dveh pravokotnih smereh okrog vsakega diska. Zaokroži številke na cela števila. Zapiši obe vrednosti, za oceno pa upoštevaj manjšo vrednost.

Če so znotraj cone inhibicije rasti kolonije, preveri, ali gre za preiskovano bakterijo ali za kontaminacijo z drugo vrsto. Če gre za preiskovano bakterijo,

upoštevaj razdaljo najbližje kolonije do sredine diska (radij) in pomnoži z dve. Če gre za bakterije druge vrste, jih zanemari.

Pri protimikrobnih učinkovinah, ki rast samo zavrejo, se velikost kolonij postopno zmanjšuje. Za meje inhibicije rasti upoštevaj točke, kjer je rast zavrta osemdeset odstotno. Če segajo drobne kolonije do diska, to zanemari.

Pri protimikrobnih učinkovinah, ki delujejo baktericidno, preveri da ni rasti v obliki filma znotraj cone inhibicije. V tem primeru upoštevaj kot cono inhibicije rob filma.

Po navodilih proizvajalca oceni občutljivost in jo označi s »S« za občutljiv (angl. sensitive), »I« za vmesen (angl. intermedium) in »R« za odporen (angl. resistant).

Zaporedna številka	Protimikrobna učinkovina	Oznaka diska	Cona inhibicije (mm)	Ocena občutljivosti

6. VAJE:

OSNOVE MIKOLOGIJE

Kaj so glive ?

Glive so evkariontski organizmi, ki so bili sprva razvrščeni v kraljestvo rastlin, vendar se od njih in drugih organizmov razlikujejo v nekaterih bistvenih lastnostih. Zato so jih, podobno kot živali in rastline, razvrstili v samostojno kraljestvo gliv (ang. Kingdom Fungi, lat. *Regnum Fungorum*). Glive nimajo klorofila, v celični steni pa imajo hitin. Glive so (tako kot živali in rastline) evkarionti, zato se razlikujejo od bakterij, ki so prokarionti. Zaradi tega imajo nekoliko drugače organizirano delovanje celice in drugačno sestavo celične stene in organelov.

MORFOLOGIJA

Medicinsko pomembne glive morfološko (po obliki) delimo na dve večji skupini, ki sicer nista taksonomski enoti, vendar ima taka delitev svoj praktični pomen.

PLESNI

Prva skupina so plesni (*Hyphomycetes*), ki rastejo kot dolga, vozlasta vlakna celic in oblikujejo makroskopsko vidne kolonije ali micelij. Del, ki vrašča v gojišče, imenujemo vegetativni micelij, tisti del, ki raste na površini gojišča, pa zračni ali aerialni micelij. Zračni micelij nosi tudi razmnoževalne strukture (spore). Pri filogenetsko mlajših vrstah so hife prečno predeljene s septami (septiran micelij), pri drugih pa ne (neseptiran micelij). Kolonije plesni so večinoma puhaste, zrele kolonije so lahko tudi obarvane, kar je večinoma odvisno od barve spor. Nekatere glive lahko v okolico izločajo pigmente, kar lahko vidimo na spodnji strani gojišča (reverz kulture).

KVASOVKE

Druga skupina pa so kvasovke (*Blastomycetes*), ki so enocelični organizmi in oblikujejo podobne kolonije kot bakterije. Celice so navadno okrogle ali ovalne oblike, razmnožujejo pa se z brstenjem. Mlada (hčerinska) celica se imenuje blastospora in se lahko popolnoma loči od starševske celice. Kadar celice po deljenju ostanejo skupaj, se lahko oblikuje dolga veriga celic. Včasih hčerinska celica ne tvori brstov, ampak se začne podaljševati, kot nekakšna cevka. Taka struktura spominja na hifo, zato se imenuje lažna hifa (pseudohifa) ter oblikuje lažni micelij (pseudomicelij). Na trdnih gojiščih kvasovke navadno rastejo v obliki homogenih voskastih kolonij, navadno bele ali krem barve, redkeje pa so pigmentirane. Nekatere pa imajo tudi značilen vonj po kvasu ali pa neprijetno zaudarjajo.

DIMORFNE GLIVE

Nekatere glive lahko rastejo v obliki plesni in kvasovk, zato jih imenujemo dimorfne glive (dvolične glive). Oblika je odvisna od pogojev rasti in tako poznamo glive, ki pri nižjih temperaturah rastejo v obliki plesni, pri višjih pa v obliki kvasovk. (thermally dimorphic fungi). Najdemo jih tudi med patogenimi glivami, ki v naravi pri 25-30°C rastejo kot plesni, v gostitelju pri temperaturi 35-37°C pa kot kvasovke.

Naravno okolje

Glive so mikroorganizmi, ki lahko živijo kot paraziti ali saprofiti. Večina gliv, ki povzročajo sistemske mikoze, živijo kot saprofiti v zemlji, v razpadajočem rastlinju in gnoju. Naravno okolje je primarni vir okužbe v večini primerov mikoz, ki se najpogosteje širijo z vdihavanjem povzročitelja, zaužitjem s hrano in preko poškodovanih tkiv, predvsem kože in sluznic.

Pogoji rasti

Optimalne razmere za rast gliv so v toplem in vlažnem okolju pri pH vrednosti okrog 6, vendar lahko tolerirajo tudi nekoliko bolj kisle in bazične pogoje. Glive

so striktni aerobi in večinoma dobro rastejo pri temperaturi 20 do 30°C. Patogene glive, ki povzročajo sistemske mikoze, pa lahko rastejo tudi pri 37°C. Na umetnih gojiščih jih večina raste razmeroma počasi. Zigomicete in glive iz rodu *Aspergillus* lahko zrastejo v 2-3 dneh, medtem ko dermatofiti rastejo 1-3 tedne ali celo dlje.

Razdelitev gliv

Morfološke lastnosti gliv na umetnih gojiščih in naravnem okolju so najpomembnejši temelj za razvrstitev in identifikacijo posameznih vrst gliv.

Glive najpogosteje razvrščamo v štiri klasične razrede, delitev pa temelji na obliki spolnih spor. Glive se razmnožujejo na nespolni ali spolni način, lahko pa tudi na oba načina. Glive, pri katerih je znan samo nespolni način razmnoževanja, imenujemo nepopolne glive (*Fungi imperfecti*) in jih uvrščamo med deuteromicete. Glive, pri katerih je znan tudi spolni način razmnoževanja, imenujemo popolne glive (*Fungi perfecti*) in jih uvrščamo bodisi med askomicete, bazidiomicete ali zigomicete. Večina gliv, ki povzročajo bolezni pri ljudeh in živalih, spada v skupini deuteromicet (*Deuteromycetes*) ali zigomicet (*Zygomycetes*) (glej tabelo 1).

Tabela 1: Razdelitev gliv na podlagi načina razmnoževanja oziroma oblike spolnih in nespolnih spor

	Nepopolne glive Fungi imperfecti	Popolne glive Fungi perfecti		
	<i>Deuteromycetes</i>	<i>Ascomycetes</i>	Basidiomycetes	<i>Zygomycetes</i>
Septirane hife	+	+	+	-
Spolna oblika razmnoževanja	Ni znana	+	+	+
Nespolne spore	Konidiji Arthrospore Klamidospore Blastospore	Konidiji Arthrospore Klamidospore	Konidiji Arthrospore	Sporangiospore
Spolne spore	Niso znane	Askospore	Bazidiospore	Zigospore

Pri nekaterih nepopolnih glivah je bil kasneje ugotovljen tudi spolni način razmnoževanja, zato so bile naknadno razvrščene med popolne glive, torej v ustrezno skupino glede na obliko spolnih spor. Večina patogenih gliv, ki so prej spadale med nepopolne glive, je bilo po odkritju spolnega načina razmnoževanja razvrščenih v skupino askomicet (*Ascomycetes*). Glede na to so dobile tudi novo ime in sicer kot anamorf za nespolni način in teleomorf za spolni način razvrščanja.

Primer poimenovanja:

Anamorf (<i>ana-</i> nazaj, prej, <i>morphe-</i> oblika) (glede na nespolni način)	Teleomorf (<i>tel-</i> končno popolno) (glede na spolni način)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Filobasidiella neoformans</i>

SPOLNO RAZMNOŽEVANJE

Pri spolnem načinu razmnoževanja pride do združitve citoplazme dveh kompatibilnih haploidnih celic (plazmogamija), temu pa sledi tudi zlitje jedrnega materiala (kariogamija). Po izmenjavi se dedni material razdeli v haploidne zarodne celice (spore). Te v ugodnih razmerah vzklijejo in oblikujejo micelij, na katerem se lahko razvijejo tudi razmnoževalne strukture oz. konidiji. Pri medicinsko pomembnih glivah poznamo tri različne načine spolnega razmnoževanja, ki se ločijo po različno oblikovanih strukturah (gametangijih), v katerih nastajajo zarodne celice.

Pri zigomicetah (npr. *Mucor sp.*) po združitvi dveh hif nastane večjedrna zigospora, ki ima precej debelo steno in lahko preživi v neugodnih razmerah. Ob kalitvi pride do mejoze in razvije se haploidni micelij.

Pri askomicetah in bazidiomicetah pa po mejozi nastanejo številne spore. Pri askomicetah nastajajo v vrečastih tvorbah (askusih), ki navadno vsebujejo 8 askospor. Kadar se askusi združujejo nastane askokarp. Pri bazidiomicetah pa na posebnem nosilcu (bazidiju) nastajajo številne bazidiospore.

NESPOLNO RAZMNOŽEVANJE

Glive se nespolno razmnožujejo z nespolnimi sporami ali konidiji, ki nastajajo na konidiogenih celicah z delitvijo haploidnega jedra. Pri nekaterih vrstah so konidiogene celice enake kot ostali del micelija, pri drugih pa imajo značilno obliko in jih imenujemo konidiofore. Glede na način nastanka konidijev poznamo talično in blastično konidiogenezo.

Splošne značilnosti glivičnih okužb

Med patogenimi glivami so le redke obligatno patogene (npr. dermatofiti). Ostale pa večinoma živijo v naravi kot saprofiti ali kot komenzali na živalih in ljudeh. Mnoge od njih so oportunistični patogeni in lahko povzročijo bolezen le ob vplivu določenih predispozicijskih faktorjev (npr. sprememba naravne bakterijske flore po dolgotrajnem delovanju antibiotikov, padec splošne odpornosti, druge bolezni, poškodbe kože in sluznic, povečana vlažnost tkiva, izpostavljenost veliki infektivni dozi itd.). Mikoze se navadno pojavljajo sporadično, lahko pa tudi v obliki večjih izbruhov, npr. dermatofitoze. V organizmu praviloma ne izločajo posebnih eksotoksinov ali endotoksinov. Znale so tudi kronične glivične okužbe, ki se kažejo v obliki granulomatoznih sprememb kot posledica obrambne reakcije organizma. Imunski odgovor po okužbi z glivami je predvsem na nivoju celične obrambe in manj na proizvodnji protiteles, ki večinoma ne omogočajo dobre zaščite. Pri nekaterih organizmih lahko pride tudi do preobčutljivostnih reakcij, kar lahko uporabljamo v diagnostične namene (npr. uporaba histoplazmina za diagnostiko histoplazmoze).

Glede na lokacijo sprememb lahko delimo mikoze na globoke (sistemske) in površinske (superficialne), čeprav imajo nekatere od njih lahko lastnosti obeh. Npr. *Candida albicans* in *Aspergillus fumigatus* lahko povzročata površinske in sistemske okužbe.

Glede na način delovanja delimo glive na:

Patogene glive, ki se naseljujejo in razmnožujejo v ali na tkivih gostitelja in povzročajo bolezenske spremembe. Nekatere glive, ki sicer niso patogene, pa lahko s svojimi sporami sprožijo zelo hude alergične reakcije.

Toksogene glive, ki se razmnožujejo v okolju ali krmi in izločajo toksične metabolite, s katerimi se lahko zastrupijo živali in ljudje.

Industrijske glive, ki sodelujejo pri različnih procesih, ki izboljšajo kvaliteto hrane (npr. kvasovke v pekovski ali vinski industriji) ali omogočajo nastanek novih, koristnih snovi (npr. *Penicillium notatum* v farmacevtski industriji).

Mikoze pri živalih povzročajo enaki ali podobni povzročitelji kot pri ljudeh, med njimi pa so nekateri bolj prilagojeni določenim živalskim vrstam. Mnoge bolezni se prenašajo med različnimi živalskimi vrstami in z živali na ljudi, redkeje pa z ljudi na živali.

PRAKTIČNO DELO

Opiši posebnosti naslednjih gojišč:

Sabouraud dekstrozni agar:
Sabouraud dekstrozni agar z antibiotiki:
Sabouraud dekstrozni agar z antibiotiki in antimikotiki:
Sabouraud dekstrozno tekoče gojišče:
Komercialna diferencialna gojišča:

PLESNI

Rast na umetnih gojiščih

Plesen	Makroskopski videz-opis kolonije	Mikroskopski videz-opis
<i>Microsporum sp.</i>		
<i>Aspergillus sp.</i>		
<i>Penicillium sp.</i>		

Opređeli pojme:

Hifa:

Konidij:

Reverz kulture:

Micelij:

Naštej nekaj oblik kolonij plesni:

KVASOVKE

Rast na umetnih gojiščih

Kvasovka	Makroskopsko-opis kolonije	Mikroskopsko-opis celice
<i>Candida sp.</i>		
<i>Malassezia sp.</i>		
<i>Cryptococcus sp.</i>		

Opređeli pojme:

Kvasovka:
Brst:
Pseudomicelij:

Neškodljivo odstranjevanje in sterilizacija materiala:

Varnost v mikološkem laboratoriju:

7. VAJE:

ODVZEM VZORCEV ZA VIROLOŠKO PREISKAVO, GOJENJE VIRUSOV V POSKUSNIH ŽIVALIH IN ZARODKIH KOKOŠJIH JAJC

Uvod

Povzročitelje virusnih okužb lahko dokazujemo neposredno ali posredno. Med neposredne metode spada izolacija in identifikacija virusa, diagnostika s pomočjo elektronske mikroskopije, dokaz virusnega antigena ali virusne nukleinske kisline. Med posredne metode pa štejemo metode, s katerimi dokazujemo specifična protitelesa, ki so prisotna v krvi živali ter v drugih telesnih tekočinah in nastanejo kot odgovor na virusni antigen.

Odvzem in pošiljanje vzorcev v virološko preiskavo.

Vzorci za virološko preiskavo lahko odvajamo živi ali mrtvi živali. Bolnim živalim se najpogosteje odvzame vzorec krvi za pridobitev seruma, vzorec krvi, ki mu dodamo antikoagulant, feces, nosni, vaginalni, prepucalni bris, vzorec laringotrahealne sluzi, mleko, sperma, pustule, bris kožnih sprememb, kornealni bris. Vzorec krvi (seruma) uporabimo tudi za dokaz specifičnih protiteles proti virusu. Pri odvzemu je potrebno biti pazljiv, da razkužilo ne pride v stik z vzorcem. V primeru poginjenih živali za virološko preiskavo odvajamo vzorce ob sekciji, kot so košček jeter, vranice, pljuč, ledvic, košček bezgavk, črevesja, vimena, kože, odvisno od ugotovljenih patoanatomskih sprememb. Vzorce odvajamo s sterilnimi pincetami in škarjami, pri čemer moramo paziti, da z vsebino enega vzorca ne kontaminiramo drugega. Odvzeti vzorci naj bodo velikosti oreha, krvni vzorci pa od 5 do 10 ml krvi. Vzorce organov iste živali je potrebno pakirati ločeno, v nepredušno zaprti posodi, pozornost pa moramo posvetiti tudi označevanju vzorcev, kot tudi celotne pošiljke. Vzorce je potrebno pošiljati v zaprtih transportnih torbah z vrečkami z ledom, da vzdržujemo ustrezno temperaturo. Glede na to, da je uspeh virološke preiskave

v veliki meri odvisen od načina odvzema vzorca, se je dobro držati naslednjih priporočil: material mora biti svež in hranjen pri temperaturi med 1 in 6°C. Preživetje virusa lahko podaljšamo, tako da nekatere vzorce damo v transportno gojišče, ki vsebuje visoke doze antibiotikov. Avtolizo organov upočasnimo tako, da vzorec damo v 30% glicerol.

Izolacija virusov

Tako kot druge mikroorganizme tudi viruse razmnožujemo v diagnostičnem laboratoriju predvsem zaradi postavitve etiološke diagnoze neke virusne bolezni. Kljub temu, da danes obstajajo mnoge diagnostične metode, ki omogočajo dokazovanje virusov neposredno v vzorcih bolnih živali, je običajno potrebno virus najprej namnožiti in šele nato lahko izvedemo identifikacijo izoliranega virusa. Izolacijo virusov iz vzorcev bolnih živali opravljamo predvsem takrat, ko smo z ostalimi hitrimi testi za dokaz virusa dobili negativen rezultat, oziroma se izolacija virusa in nadaljnja identifikacija običajno uporablja kot potrditveni test. Velike količine različnih virusov pa se množijo tudi v farmacevtski industriji za proizvodno cepiv proti virusnim boleznim. Prav tako potrebujemo večje količine virusa tudi za študij njegovih fizikalnih, kemičnih, bioloških in antigenskih lastnosti. Ker je razmnoževanje virusa vezano na presnovne procese celice, se lahko virus razmnožuje le v živi celici, zato za njegovo gojenje uporabljamo celične kulture, oplojena kokošja jajca in tudi poskusne živali. Uspeh izolacije virusa je torej odvisen od pravilnega in pravočasnega odvzema vzorcev, kar je v veliki meri odvisno tudi od prepoznavne kliničnih znamenj in poteka bolezni.

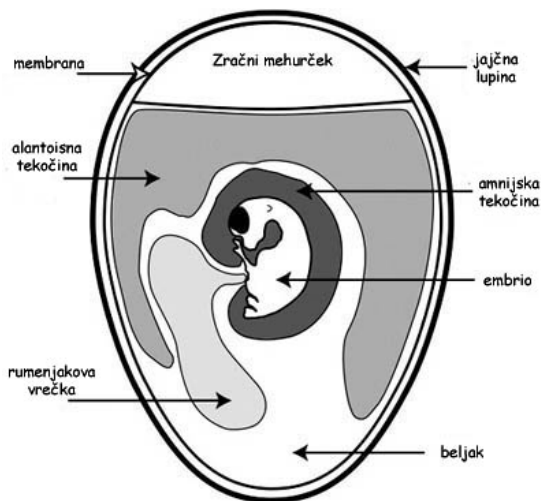
Biološki poskus

Biološki poskus na živalih se uporablja predvsem za študij kliničnih znamenj bolezni, patogeneze, manj pa v diagnostične namene, kjer so biološke poskuse nadomestili z drugimi sodobnejšimi laboratorijskimi metodami. Gojenje virusa v biološkem poskusu na živalih ima veliko pomanjkljivosti, saj je nehumano, odvisno je od dovzetnosti živali za določen virus, uspeh pa je odvisen tudi od že

obstoječe mikroflore živali v poskusu ter njihovega hormonalnega in imunskega stanja. Za poskuse v diagnostične namene se uporabljajo laboratorijske živali, kot so laboratorijske miši, morski prašički (budre) in kunci. V kolikor se je poskusna žival v svojem življenju že srečala z enakim ali sorodnim virusom, ima le ta v krvi lahko specifična protitelesa, kar bo vzrok neuspelega poskusa. Delo z živalmi v poskusu je torej zahtevno, okužene živali lahko izločajo virus z svojimi sekreti in ekskreti in na ta način lahko pride tudi do kontaminacije okolice in okužbe osebja, ki dela s takšnimi živalmi. Material, ki ga kot vzorec inokuliramo živalim v poskusu ne sme biti kontaminiran z drugimi mikrobi (bakterije, glivice), kar dosežemo tako, da vzorcu dodamo visoke doze antibiotikov ali pa vzorec filtriramo skozi mikro-filtre s porami velikosti 20 do 45 μm , ki prepuščajo le viruse, ne pa tudi bakterij.

Gojenje virusov v oplojenih kokošjih jajcih

V oplojenih kokošjih jajcih lahko razmnožujemo različne vrste virusov. V ta namen se uporabljajo jajca z zarodkom starim od 7 do 12 dni. Oplojena kokošja jajca običajno niso po naravni poti okužena z bakterijami in virusi. Pred inokulacijo vzorca v jajce moramo zagotoviti, da vzorec ni kontaminiran. Zagotoviti moramo tudi, da so zarodki v jajcu živi, kar preverimo z ovoskopom, posebno svetilko s katero lahko jajce presvetlimo. Pri jajcu z živim zarodkom opazimo njegovo gibanje, lahko ocenimo velikost zarodka, krvne žile jajčnih open pa so polne in nabrekle. V tako jajce običajno inokuliramo 0.1 ml vzorca, kjer je mesto aplikacije odvisno od vrste povzročitelja določene virusne bolezni. Po inokulaciji jajca inkubiramo (valimo) 2 do 5 dni. V kolikor je virus prisoten, plod pogosto odmre, kar opazimo pri ponovnem presvetljevanju, saj krvne žile niso več napete in plod miruje.



Shematski prerez skozi jajce

Aplikacija vzorca na horioalantoisno membrano

V celicah horioalantoisne membrane se dobro razmnožujejo virusi iz družine *Poxviridae*. Za to uporabljamo jajca z 10 do 12 dni starim zarodkom. Na področju ekvatorja jajca, na mestu kjer ni videti krvnih žil s svedrom naredimo odprtino v jajčno steno, tako da ne poškodujemo horioalantoisne membrane. Prav tako naredimo majhno odprtino nad zračnim mehurčkom in izsesamo zrak. Pri tem pa se horioalantoisna membrana na odprtini ekvatorja odlušči in nastane lumen, kamor z iglo apliciramo vzorec. Odprtine zalepimo in jajce nadalje inkubiramo.

Aplikacija vzorca v amnijsko votlino

Po aplikaciji v amnijsko votlino se virus razmnožuje v celicah amnijske opne, celicah epiderme in na sluznicah plodu. Filtrat vzorca apliciramo tako, da s svedrom naredimo odprtino na robu zračnega mehurčka. Aplikacijo izvajamo ob presvetljevanju jajca, tako da iglo zabodemo v smeri plodu, se ga dotaknemo in apliciramo 0,1 ml vzorca. Odprtino zalepimo, jajce pa inkubiramo nadaljnjih 5 dni. V amnijski tekočini se po končani inkubaciji nahajajo velike količine virusa

Aplikacija vzorca v alantiosno votlino

Alantiosno votlino pri 9 do 11 dni starem plodu predstavlja beljak. Na robu zračnega mehurčka s svedrom naredimo odprtino in vzorec apliciramo z iglo, tako da jo zabodemo 1,5 mm globoko, odprtino zalepimo in jajce naprej inkubiramo 3 do 5 dni. Virus se namnoži v celicah alantoisne opne.

PRAKTIČNO DELO

1. Obdelava in priprava vzorca za virološko preiskavo

Košček parenhimskega organa velikosti oreha s škarjami na drobno sesekljam in dodamo za nožev konico kremenčevega peska

V terilnici pripravimo homogeno maso ter z dodatkom fiziološke raztopine pripravimo suspenzijo v razmerju 1:5 (en del vzorca in 4 dele fiziološke raztopine)

Suspenzijo centrifugiramo 10 minut pri 2000 obratih/minuto

Supernatant filtriramo skozi filter s porami velikosti 0,45µm

Filtrat uporabimo kot inokulum

2. Inokulacija vzorca v alantoično votlino

Oplojena kokošja jajca z zarodkom starim 9 do 11 dni presvetlimo ter določimo preživetost plodu in na lupini označimo njegovo lego glede na oko

Površino jajca razkužimo z 75% alkoholom

Označimo rob zračnega mehurčka in s svedrom naredimo drobno odprtino

V brizgo (inzulinko) potegnemo 0,1 ml filtriranega vzorca

Vzorec apliciramo v nasprotni smeri od označenega mesta, tako da iglo bomo približno 1,5 cm globoko

Oplojeno jajce inkubiramo 3 dni pri 35°C

3. Narišite dele oplojenega kokošnjega jajca in označite, kam smo inokulirali suspenzijo vzorca

4. Ogled elektronsko mikroskopskih posnetkov različnih virusov

8. VAJE:

CELIČNA KULTURA, IZOLACIJA IN DOKAZ VIRUSOV

Uvod:

Pod pojmom celične kulture razumemo celice tkiva, ki jih gojimo v »*in vitro*«
pogojih. V virološkem laboratoriju jih uporabljamo za razmnoževanje virusov.
Celične kulture imajo prednost pred biološkim poskusom na živalih predvsem
zato, ker so bolj standardizirane, ni prisotnih inhibitornih substanc in možno je
kontrolirati tudi kontaminacije z različnimi virusi. Ker je večina virusov vrstno in
tudi tkivno specifičnih potrebujemo v diagnostičnem virološkem laboratoriju
celice različnih tkiv in vrst živali.

Gojišča za celične kulture

Za gojenje celičnih kultur potrebujemo ustrezna tekoča gojišča. Gojišča za rast
celic poleg ustreznih soli, aminokislin, glukoze vsebujejo tudi od 5 do 10%
fetalnega seruma, ki vsebuje različne rastne faktorje. Ko virus nasadimo na
celično kulturo pa dodamo gojišče z manjšo količino seruma. Gojišča vsebujejo
tudi indikator pH, antibiotike in mikostatike. Na tržišču so na voljo različna že
standardizirana gojišča za celične kulture.

Vrste celičnih kultur

Za pripravo primarnih celičnih kultur se uporabljajo organi ali tkiva različnih
živali, najpogosteje uporabljamo ledvica, pljuča, testise in kožo. V ta namen se
običajno odvzamejo organi fetusa. V primeru priprave primarne celične kulture
govejih ledvic, govejemu plodu kirurško odvzamemo ledvico in jo transportiramo
pod sterilnimi pogoji v laboratorij. Odstranimo kapsulo in s sterilnimi škargami
pod sterilnimi pogoji narežemo skorjo ledvice na drobne koščke. Koščke
oplaknemo v fosfatnem pufru in jih obdelujemo s 0,25% raztopino tripsina.
Oddvojene celice v suspenziji tripsina centrifugiramo, jih preštejemo in

suspendiramo v gojišču za celične kulture. Celice lahko gojimo v različnih steklenicah, epruvetah, mikrotiterskih ploščah, običajno pri temperaturi 37°C. Celice v 5. do 7. dneh prerastejo dno, nato pa jih lahko presajamo naprej, tako da celični sloj v steklenici ponovno obdelamo s tripsinom, pripravimo celično suspenzijo v gojišču za celične kulture kar imenujemo celična pasaža. Značilno za primarne celične kulture je, da nimajo spremenjene kromosomske slike in je mogoče opraviti le omejeno število pasaž. Po številnih presaditvah bodo primarne celične kulture propadle lahko pa se transformirajo. Transformirane celice z nesmrtnimi (onkogenimi) lastnostmi in spremenjeno kromosomsko sliko pa imenujemo celične linije. Kulturo celičnih linij predstavljajo celice istega tipa in se prav tako uporabljajo za izolacijo in gojenje virusov. Na voljo je veliko število celičnih linij različnih tkiv živali in človeka. Poznane so banke celičnih kultur (ECACC - European Collection of Animal Cell Culture). Primarne celične kulture in celične linije je mogoče zamrzovati v tekočem dušiku in jih tako neomejeno dolgo hraniti.

Uporaba celičnih kultur v virologiji

Celične kulture uporabljamo za gojenje poznanih virusov ali za izolacijo virusa iz kužnine. Vzorec za inokulacijo pripravimo podobno, kot za inokulacijo v oplojeno kokošje jajce. Običajno vzorec nasajamo na mlad celični sloj, ki pokriva od 80 do 100% površine. Najprej gojišče odlijemo, celični sloj oplaknemo s fiziološko raztopino, nato inokuliramo majhno količino filtriranega vzorca, ki ne vsebuje bakterij, inkubiramo pri 37°C eno uro, da se virusi prirdijo na celično površino, nato filtrat odlijemo in celicam dolijemo vzdrževalno gojišče. Celično kulturo vsak dan spremljamo, ugotavljamo morebitne spremembe v barvi gojišča (sprememba pH), morebitno kontaminacijo z bakterijami, citotoksičnost in pojav citopatskega efekta (CPE). Virusi običajno povzročajo tudi zaviranje metabolizma celice. V gojiščih za celično kulturo se namreč nahaja indikator pH (fenol rdeče), ki pri kislem pH postaja rumene barve. Upočasnjene spremembe pH v primerjavi s kontrolnimi celicami so eden od pokazateljev razmnoževanja virusa v celični kulturi. Nekatere vrste virusov povzročijo degenerativne

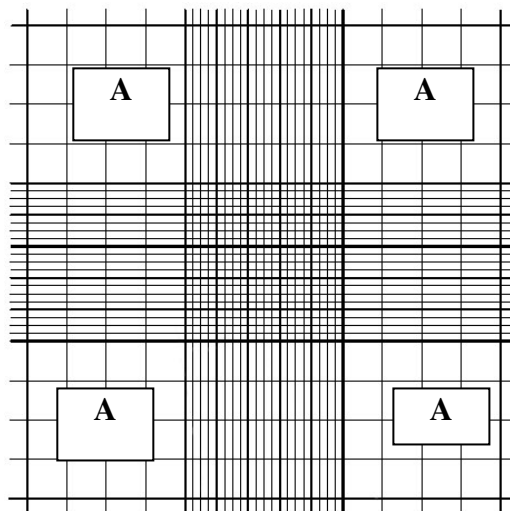
spremembe celične kulture v taki meri, da pride do propada celic, kar imenujemo citopatski efekt. Te spremembe so vidne pod svetlobnim mikroskopom kjer je CPE je izražen v obliki piknoze, zaobljenih celic, nekroze, granularne degeneracije, nastanek sincicijev (večjedernih celic). Na osnovi pojava CPE lahko z veliko gotovostjo sklepamo, da je v vzorcu prisoten virus s citopatogenimi lastnostmi. Kljub temu, da je oblika CPE značilna za posamezne družine virusov, so za determinacijo izolatov potrebne dodatne metode. Viruse, ki ne povzročajo CPE na celični kulturi pa imenujemo necitopatogeni virusi.

Štetje celic

Ko pripravljamo celično kulturo za inokulacijo kužnine ali gojenje virusa, moramo poznati količino celic, ki jo uporabljamo v gojišču. Celice, ki smo jih tripsinizirali preštujemo v hemocitometru, nato pa iz njihove koncentracije izračunamo koliko jih potrebujemo za nadaljnjo pripravo gojišča.

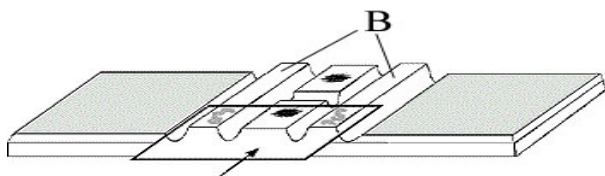
Hemocitometer po Neubauerju je modificirano predmetno stekelce, ki ima vgravirani dve komorici, v katerih pod mikroskopom štejemo celice. Vsaka komorica je globoka 0,1 mm in ima vidno mrežasto strukturo (slika 1). Za štetje celic v suspenziji uporabljamo le dele mrežne komorice imenovane polje A, ki ga sestavlja 16 kvadratkov skupne površine 1mm^2 .

Slika 1: Mrežasto polje za štetje celic



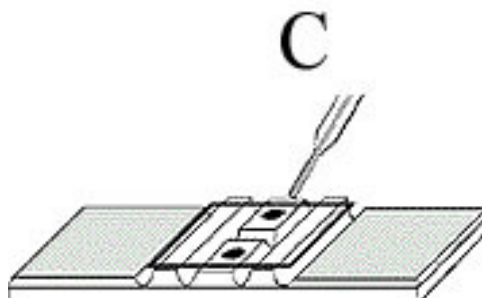
Krovno stekelce fiksiramo na hemocitometer tako, da z mokrim prstom potegnemo po steklenem delu hemocitometra (Slika 2, polje B) med kanaloma za odvečno tekočino ter pokrovno stekelce pritismo ob hemocitometer, tako da dobro prilega na zgornjo površino hemocitometra.

Slika 2: Polje za fiksacijo pokrovnega stekelca



Po fiksaciji pokrovnega stekelca na hemocitometer, pripravimo suspenzijo celic. Priporočljivo je, da vzorec redčimo v 0,1% tripanjskem modrilu (npr 1:10). Z ustreznim redčenjem zagotovimo lažje in natančnejše štetje v polju A, lahko pa ločimo tudi žive celice od mrtvih. Mrtve celice se obarvajo modro in jih ne štejemo.

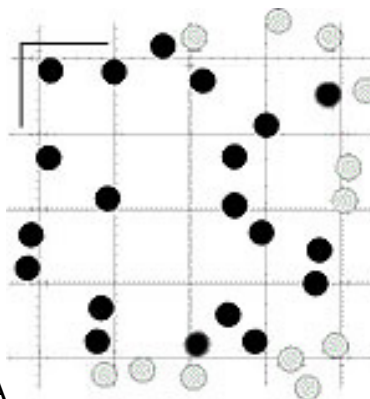
V hemocitometer na robu pokrovnega stekelca med kanaloma za odvečno tekočino (slika 3, polje C) s pipeto nanese suspenzijo celic. Kapilarni vlek tekočine iz kapljice potegne pod pokrovno stekelce in napolni komorico z mrežo, presežek tekočine pa se razlije v kanale za odvečno tekočino ob strani.



Slika 3: Polnjenje hemocitometra

V vsakem od polj A (slika 1) pričnemo pod ustrezno povečavo mikroskopa šteti celice. Štejemo vse celice, ki so znotraj posameznega kvadratka, celice, ki se dotikajo mrežnih črt z notranje ali zunanje strani kot tudi tiste, ki ležijo na mrežni črti tako, da vedno štejemo le dve stranici vsakega malega kvadratka,

npr. levo in zgornjo stranico kot prikazuje slika 4. Tak način štetja onemogoča, da bi nekatere celice prešteli dvakrat. V primeru skupka dveh ali več celic, to upoštevamo kot eno celico. Za beleženje števila celic uporabljamo ročne ali avtomatske števce, lahko pa si pomagamo npr. tudi s pisanjem črtic na papirju.



Slika 4: Princip štetja celic v polju A

Zaradi večje natančnosti je priporočljivo, da pri vsakem vzorcu preštujemo celice v vseh štirih poljih A (slika 1). Prav tako je pomembno, da ne štejemo preveč goste suspenzije celic; tako štetje do 150 celic v vsakem polju A še zagotavlja primerno natančnost.

Izračunavanje števila celic v enem mililitru suspenzije.

Princip izračuna temelji na globini komorice (0,1 mm), površini polja A (1 mm²) in redčenju celične suspenzije. Izračun gostote celic v enem mililitru se vrši po formuli:

$$\frac{C \times B \times 10}{K} \times 1000$$

C število prešteti celic

B redčenje (npr za redčenje 1:10 uporabimo 10)

10 faktor hemocitometra

K število prešteti polj A

Preračunavanje osnovne koncentracije celic v drugo določeno koncentracijo celic

Običajno je iz preštete suspenzije celic potrebno pripraviti drugo želeno koncentracijo celic, ki se uporablja v testu. Preračunavanje opravimo s t.i. sklepnim računom. V prvem koraku izračunamo potreben volumen preštete suspenzije celic:

Sklepni račun za izračunavanje želene koncentracije celic:

$$\frac{\text{želena suspenzija celic (konc/ml)}}{\text{prešteta suspenzija celic (konc/ml)}} \times \text{potreben volumen želene celične suspenzije v ml}$$

V drugem koraku pa izračunamo koliko celičnega gojišča moramo dodati k volumnu prešteti celic, da dobimo potreben volumen želene suspenzije celic:

volumen želene celične suspenzije v ml - potreben volumen preštete suspenzije v ml

Hemadsorbcija in hemaglutinacija

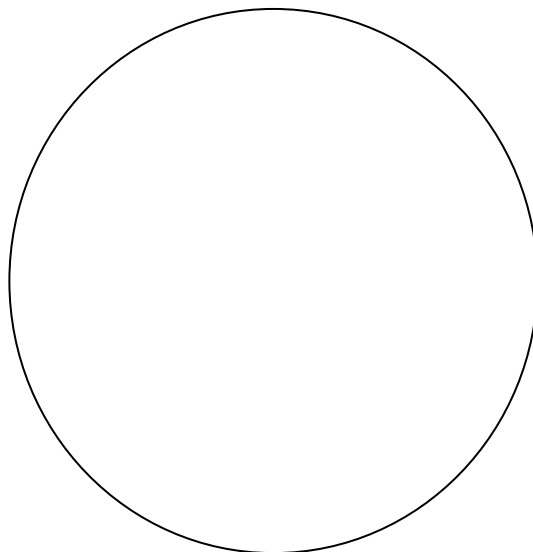
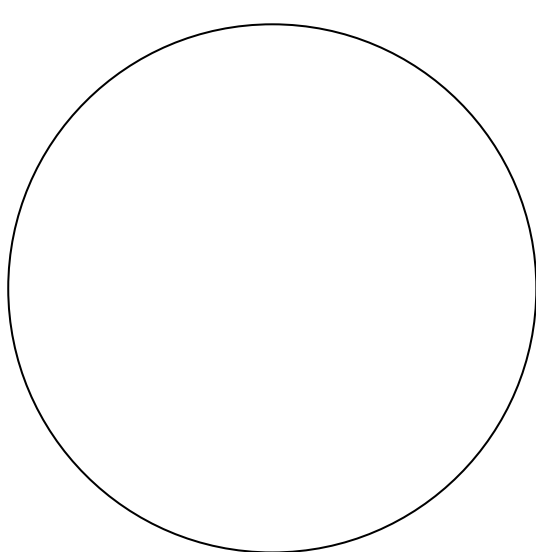
Prisotnost nekaterih virusov lahko dokazujemo v testu hemadsorbcije ali hemaglutinacije. Hemaglutinacija je lastnost virusa, da ob prisotnosti eritrocitov nekaterih živalskih vrst le te zlepi skupaj, kar lahko opazujemo kot mrežo eritrocitov, npr v mikrotiterski plošči z U dnom. Ta test uporabljamo za dokaz virusa v zunajceličnih tekočinah ali tkivnih filtratih. O hemadsorbciji pa govorimo, kadar so celice okužene npr. z ortomiksovirusi ali paramiksovirusi in v testu vežejo na svojo površino eritrocite določenih živalskih vrst, kar lahko opazujemo pod svetlobnim mikroskopom.

Opazovanje virusov z elektronskim mikroskopom

Za zadovoljivo opazovanje virusov z elektronskim mikroskopom v preiskovani suspenziji potrebujemo zadostno število delcev, tako naj bi bilo v 1 ml kužnine vsaj 10^6 virusnih delčkov. Morfologija virusov je včasih tako značilna, da jih na osnovi rezultatov elektronskomikroskopske preiskave lahko razvrstimo v posamezne družine. V kliničnem vzorcu je običajno dovolj virusnih delčkov le pri nekaterih virusnih okužbah, na primer v blatu, v primeru okužbe z rotavirusi. Največja pomanjkljivost elektronske mikroskopije in njene široke uporabe je razmeroma majhna občutljivost metode.

PRAKTIČNO DELO

1. Opazovanje celičnih kultur pod mikroskopom



2. Tripsinizacija

Iz steklenice za celično kulturo odlijemo gojišče

Dodamo 3 ml encima Tripsin EDTA

Po 3 minutni inkubaciji na sobni temperaturi, tripsin odlijemo in dodamo 5 ml gojišča za celično kulturo

Pripravimo suspenzijo s 300000 celicami/ml gojišča

3. Izračunavanje števila celic v enem mililitru suspenzije

Preračunavanje osnovne koncentracije celic v drugo določeno koncentracijo. Običajno je iz preštete suspenzije celic potrebno pripraviti drugo želeno koncentracijo celic, ki se uporabljajo v testu. Preračunavanje opravimo s sklepnim računom:

Izračun:

4. Inokulacija kužnine na celično kulturo

V posamezno kadičko predmetnice vnesemo po 270 μ l suspenzije celične kulture EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) v koncentraciji 250.000 celic/ml.

V jamico A1 in B1 vnesemo po 30 μ l inokuluma (pripravljen na prejšnjih vajah), razredčina 1:10

Zamenjamo nastavek pipete in prenesemo razredčino inokuluma iz jamice A1 in B1 v jamici A2 in B2 (razredčina 1:100)

Zamenjamo nastavek pipete in prenesemo razredčino inokuluma iz jamice A2 in B2 v jamici A3 in B3 (razredčina 1:1000)

V jamico A4 inokuliramo 10 μ l poznano pozitivnega vzorca, ki vsebuje virus IHN (Infekciozna haematopoetska nekroza postrvi)

Predmetnice postavimo v inkubator s temperaturo od 15 do 18°C za 3-5 dni

9. VAJE

AGLUTINACIJA IN PRECIPITACIJA STERILIZACIJA IN RAZKUŽEVANJE

Uvod:

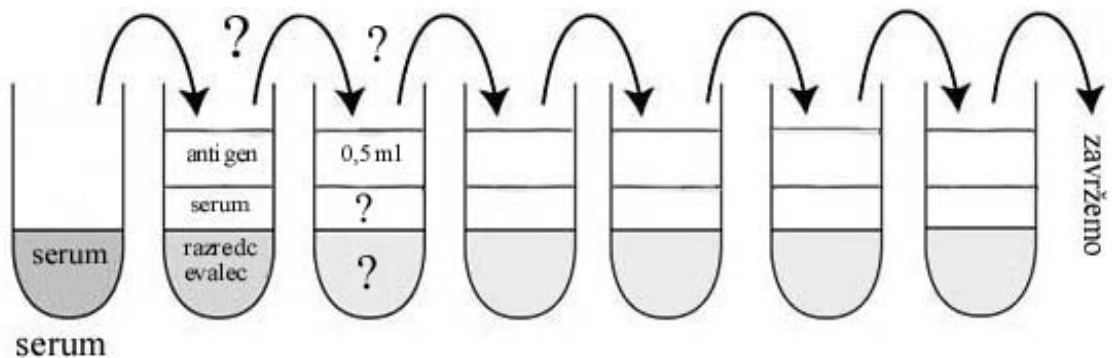
Protitelesa nastanejo kot odziv limfocitov B na antigensko spodbudo. Z imunskimi reakcijami v *in vitro* pogojih, ki jih imenujemo serološke reakcije, med seboj reagirajo antigeni in protitelesa. Tako serološke reakcije uporabljamo za dokazovanje količine protiteles v telesnih tekočinah ali pa za dokazovanje prisotnosti določenih antigenov. Količino protiteles navadno izražamo s titrom, v zadnjem času pa tudi z različnimi dogovorjenimi enotami (I.E., µg/ml). Titer protiteles je največja razredčina seruma, ki da z znano standardno količino antigena pozitivno reakcijo. Določanje količine protiteles (naraščanje ali upadanje) je pomembno pri dokazovanju vrste (etiologija bolezni) in starosti različnih okužb. Serološke reakcije v imunologiji delimo na: aglutinacijo, precipitacijo, reakcijo lize, nevtralizacijo, inhibicijo in reakcijo z označenimi protitelesi. Aglutinacija pomeni združevanje korpuskularnih antigenih delčkov s prisotnimi protitelesi, ki aglutinirajo (IgM in IgA). Aglutinacijske reakcije delimo na hitro aglutinacijo, klasično aglutinacijo, lateksno aglutinacijo in hemaglutinacijo. Precipitacijo opisujemo kot združevanje in obarjanje topnih antigenov s protitelesi (precipitini). Precipitacijo izvajamo v tekočem (v epruvetah) ali poltekočem mediju (agarski gel). Precipitacijske reakcije delimo na precipitacijo v epruvetah in na precipitacijo v agarškem gelu (AGID; agar gel imunodifuzija, radialna imunodifuzija, elektroimunodifuzija).

PRAKTIČNO DELO

V seriji epruvet, ki vsebujejo 1ml dvakratnega redčenja seruma, v klasični aglutinaciji določi titer protiteles. Koliko razredčevalca in koliko seruma dodamo

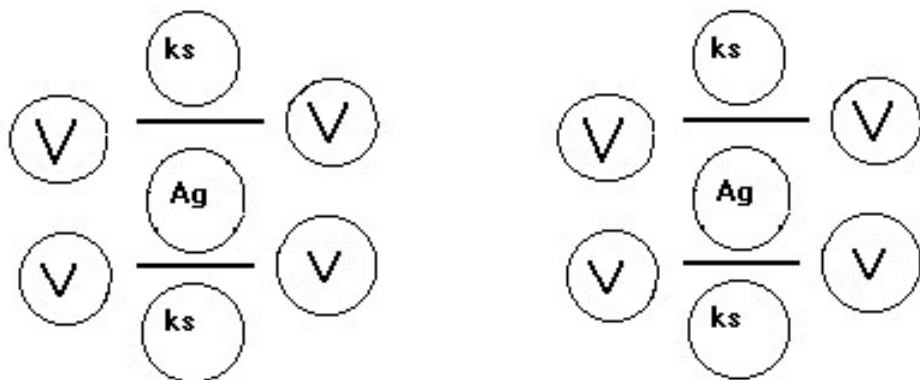
v prvo epruveto za začetno redčenje 1:4 in koliko razredčine prenašamo v naslednje epruvete za pripravo dvakratnih razredčin ob predpostavki, da v vsako epruveto na koncu dodajamo tudi 0,5 ml antigenske suspenzije (shema 1). Pripravi in odčitaj tudi hitro aglutinacijo in AGID (shema 2).

Shema 1.



Za končni volumen 1ml pri dvakratnem redčenju v 1. epruveto dodamo _____ml razredčevalca in _____ml seruma, v naslednje epruvete pa prenašamo po _____ml razredčine k _____ml razredčevalca. Titer protiteles v preiskovanem serumu je _____.

Shema 2: Protokol za odčitavanje AGID. Ag -antigen, ks-pozitivni kontrolni serum, V-preiskovani vzorec. V protokol označi nastale precipitacijske linije med vzorcem in antigenom. Nastanek precipitacijske linije pomeni pozitiven rezultat.



Namen vaje

Študent naj bi se seznanil s principi reakcij aglutinacije in precipitacije z njihovo pripravo, odčitavanjem ter vrednotenjem. Poznavanje teh reakcij je namreč zelo pomembno pri razumevanju številnih diagnostičnih metod, ki se uporabljajo za prepoznavanje kužnih bolezni, pripomoglo pa naj bi tudi pri izbiri najbolj primerne metode ob sumu na določeno bolezen.

STERILIZACIJA IN RAZKUŽEVANJE

Pri opravljanju mikrobioloških preiskav uporabljamo opremo in reagente, ki ne smejo vsebovati mikrobnih kontaminantov. Prav tako pa po opravljeni mikrobiološki preiskavi ne sme iz laboratorija material, ki vsebuje žive mikrobe. Te zahteve dosežemo z različnimi postopki sterilizacije in razkuževanja.

Sterilizacija

Sterilizacija je postopek, s katerim ubijemo vse žive mikroorganizme in tudi bakterijske spore. Glede na to, kaj želimo sterilizirati ali razkužiti uporabljamo različne postopke, za vse postopke pa velja, da morajo biti predmeti za sterilizacijo primerno pripravljeni, glede na vrsto predmeta, ki ga bomo sterilizirali, pa mora biti ustrezno izbran tudi postopek (tabela 1). Tako je pri sterilizaciji ali razkuževanju predmetov zelo pomembno, da so pred postopkom dobro očiščeni in primerno pakirani v zavoje ali kasete. Postopek sterilizacije je uspešen le v primeru, če je nadzorovan. Nadzor postopka obsega stalno preverjanje časa trajanja postopka, nadzor merilnih inštrumentov, nadzor fizikalnih parametrov (tlak, temperatura, vlaga), ter uporaba kemičnih in bioloških indikatorjev; vse vrste nadzora pa moramo dosledno evidentirati.

Razkuževanje

V mikrobioloških laboratorijih je zelo pomembno uničevanje mikrobov s kemičnimi sredstvi (tabela 2). Tako uničevanje mikrobov imenujemo razkuževanje (dezinfekcija), s tem pa vzdržujemo visoko stopnjo snage. Za uspešno razkuževanje moramo upoštevati antimikrobni spekter razkužila, čas delovanja ter okolje in temperaturo pri kateri opravljamo postopek.

Tabela 1: Sterilizacijski postopki

POSTOPEK STERILIZACIJE	UPORABA	FIZIKALNI PARAMETRI
suha toplota		
ožiganje	predmeti ki prenesejo ožiganje: vratovi epruvet, bakteriološka zanka, steklovina	
suhi sterilizator	steklovina, kovinski predmeti, tkanine ne smemo pa gume, plastike ali predmetov v kombinaciji steklo- kovina	160°C, 3 ure 170°C, 2 uri 180°C, 30-60 min
vlažna toplota		
avtoklav	najpogosteje uporabljen postopek; predmeti, ki prenesejo temperaturo in vlago	120°C, 30 min 125°C, 15-20 min 134°C, 4 minute cca 1 atm nad atmosferskim tlakom

Kochov lonec	termično manj obstojne snovi, predmeti iz gume, plastike	100°C, 1 ura atmosferski pritisk
tindalizacija	frakcionirana sterilizacija snovi, ki ne prenesejo višjih temperatur, npr tekoča gojišča, mleko za gojišča	100°C, vodna kopel 30 min- ubijanje vegetativnih celic 37°C, čez noč-klitje preživelih spor 100°C, vodna kopel 30 min- ubijanje vegetativnih celic 2 cikla
lonec na pritisk	terenske razmere	kuhanje 2 uri
sevanja		
γ -žarki	pribor iz PVC, razna mazila v embalaži, gojišča	
ultravioioletna svetloba	deluje na površini, sterilizacija zraka	valovna dolžina 240 do 280 nm
mikrovalovi	plastika, steklovina, guma	mikrovalovna pečica 1000W, 3 minute
plini		
etilenoksid, ozon, β -propiolakton, formalinske pare,	laboratorijski pribor, kirurški pribor, razna oprema, ki ne prenese segrevanja ali vlage	
mehanična sterilizacija		

filtracija	odstranjevanje mikrobov iz plinov ali tekočin, ki se pri segrevanju spremenijo ali razgradijo	membranski filtri, filtriranje pri povečanem ali zmanjšanem tlaku velikost por od 0,22 µm do 0,65 µm
ultrazvok	razbijanje mikrobnih celic	3 do 6 kHz

Tabela 2: Pregled najpogostejših razkužil

RAZKUŽEVANJE		
RAZKUŽILO	UPORABA	ČAS DELOVANJA
2% glutaraldehid	razni predmeti in inštrumenti, naprave	30 min, za spore 4 ure
1-5% natrijev hipoklorid	površine, predmeti	5 do15 min
0,1- 0,2% perocetna kislina	površine, predmeti	5 do15 min
1-2% natrijev peroksidsulfat	površine, predmeti	15 min
70-85% etanol	koža, roke	1 do 5 minut
60-70% propanol	koža, roke	
0,5% klorheksidin v 80% etanolu	koža, roke	
1% povidoniodid v 70% etanolu	koža	
jodova tinktura	koža	
vodikov peroksid	koža	
detergenti (cetavlon, asepsol)	pretežno za čiščenje; površine, koža	

PRAKTIČNO DELO

Ker je sterilizacija postopek, ki v večjem delu zahteva posebne naprave in strokovno usposobljene ljudi je vaja 15. zasnovana predvsem na teoretični osnovi ter ogledu različnih predmetov v embalaži po sterilizaciji.

Namen vaje

Z vajo predstavimo sterilizacijske postopke in njihove zahteve, probleme, ki se pojavljajo pri sterilizaciji in dezinfekciji, pomen sterilizacije pri mikrobiološkem delu, pomen pri odstranjevanju uporabljenega materiala in odpadkov iz laboratorija ter da si ustvarimo predstavo o odpornosti nekaterih mikrobov ali njihovih struktur na sterilizacijske postopke.

10. VAJE:

VIRUS NEVTRALIZACIJSKI TEST, TEST REAKCIJA VEZAVE KOMPLEMENTA IN TEST INHIBICIJE HEMAGLUTINACIJE

Uvod

V serumu živali je mogoče dokazovati specifična protitelesa proti določenemu virusu, ki nastanejo kot posledica okužbe ali cepljenja. Takšne metode posrednega dokazovanja virusov imenujemo s skupnim imenom serološke metode. Že nekaj dni po okužbi se v serumu živali pojavijo protitelesa razreda IgM, dosežejo najvišjo raven med 3 in 4 tedni, nato pa količina protiteles pada. Protitelesa razreda IgG se pojavijo v obdobju od 7 do 14 dni po okužbi, vendar se v serumu ohranijo zelo dolgo, lahko tudi celo življenje. Prisotnost protiteles razreda IgM je dokaz, da gre za svežo okužbo. V pomoč pri diagnostiki okužbe sta nam dva seruma odvzeta v razmaku 10 dni (parna seruma). V kolikor ob preiskavi obeh vzorcev ugotovimo dvig nivoja protiteles pomeni, da gre za svežo okužbo. Kakovost posameznega testa opredeljujemo z občutljivostjo in specifičnostjo. Občutljivost testa pomeni sposobnost dokazovanja najmanjše količine določenih protiteles. Glede na to, da so si virusi med seboj antigensko sorodni, se srečujemo tudi s sorodnimi protitelesi in posledičnimi navskrižnimi reakcijami v testih. Specifičnost testa torej opredeljuje sposobnost ločevanja določenih protiteles od drugih strukturno zelo sorodnih molekul.

Seronevtralizacijski test

Nevtralizacijski test temelji na vezavi specifičnih protiteles na površinske receptorje (antigene) virusa, kar prepreči vezavo virusa na celico in nadalje njegovo replikacijo. Z nevtralizacijskim testom določamo prisotnost nevtralizacijskih protiteles v serumu živali. Test poteka tako, da pripravimo mešanico preiskovanega seruma in delovne razredčine virusne suspenzije. Nato mešanico inkubiramo, da pride do vezave protiteles iz preiskovanega seruma (če

so prisotna) z virusnimi antigeni. Mešanici nato dodamo suspenzijo ustreznih celic poznane koncentracije ter inkubiramo pri 37° C. V primeru, da v preiskovanem serumu ni protiteles (negativen rezultat testa) se virus namnoži v celični kulturi in povzroči CPE. V nasprotnem primeru, ko so specifična protitelesa v vzorcu seruma prisotna (pozitiven rezultat testa) pa le ta preprečijo vezavo in razmnoževanje virusa na celični kulturi, zato ostane celična kultura nespremenjena. V test je vedno potrebno vključiti tudi referenčni pozitiven in negativen serum, kontrolo celic in kontrolo virusa. Iz kontrole virusa mora biti razvidna količina virusa, ki smo jo uporabili v testu in mora ustrezati standardu, sicer je test potrebno ponoviti.

Test reakcija vezave komplementa (RVK)

Reakcija vezave komplementa je serološka metoda, ki se uporablja predvsem za določanje specifičnih protiteles proti določenemu mikrobu. Izvedbo testa delimo na dva ločena dela, testni sistem in indikatorski sistem. Testni sistem predstavlja suspenzijo določenega antigena (bakterije ali virusi), preiskovani serum in komplement (izvor je serum morskega prašička). Komplement se namreč po klasični poti aktivira, ko poteče vezava protiteles na antigene mikrobov, kar vodi v nastanek litičnega kompleksa, ki uniči antigen. Tako se za prvi del testa v mikrotiterskih ploščah z U dnom pripravijo dvakratne razredčine preiskovanega seruma, ki ga je predhodno potrebno inaktivirati s segrevanjem v vodni kopeli 30 minut na 56°C, da v njem inaktiviramo prisotne komponente komplementnega sistema. V serumske razredčine dodamo še standardno količino komplementa iz seruma morskega prašička in delovno razredčino antigena. Ločeno pripravimo tudi dele indikatorskega sistema, ki ga predstavljajo suspenzija ovčjih eritrocitov in kunčja protitelesa proti ovčjim eritrocitom inkubirana skupaj 1 uro pri 37°. Kunčja protitelesa se vežejo na eritrocite in tako dobimo senzibilizirane ovčje eritrocite. Glede na to, da v testnem sistemu reakcija antigen - protitelo - aktiviran komplement ni vidna, preiskovani mešanici dodamo še suspenzijo senzibiliziranih ovčjih eritrocitov (indikatorski sistem). V primeru negativne reakcije, ko v preiskovanem serumu ni prisotnih

specifičnih protiteles, bo ostal budrin komplement v testnem delu reakcije neporabljen in se le ta aktivira na senzibiliziranih ovčjih eritrocitih povzroči lizo eritrocitov. Liza eritrocitov, se pravi malinasto-rdeče obarvana vsebina vdolbinice na mikrotiterski plošči pomeni torej negativen rezultat. V pozitivnem primeru, pa se komplement porabi že v testnem delu na protitelesih iz preiskovanega seruma, ki so se vezala na testni antigen in tako v indikatorskem sistemu eritrociti ostanejo nepoškodovani in se v 1 do 2. urah v obliki gumbka sesedajo na dno vdolbinice mikrotiterske plošče. V RVK testu je potrebno uporabljati standardno količino komplementa in testnega antigena. V primeru, da je komplement v pribitku, se le ta vključi v reakcijo lize eritrocitov testnega sistema, kar ima lahko za posledico lažen rezultat.

Test inhibicije hemaglutinacije (IHA)

Nekateri virusi se vežejo na površino eritrocitov določenih vrst živali in jih povezujejo v aglutinate. Hemaglutinacija je nesorološka metoda, ki se uporablja za določanje količine virusa. Virus izgubi hemaglutinacijske lastnosti, če se nanj vežejo specifična protitelesa uperjene proti molekulam, odgovornim za hemaglutinacijske lastnosti virusa. Sposobnost hemaglutinacije imajo virusi iz družine *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, pa tudi nekatere vrste mikoplazem in bakterij. Test inhibicije hemaglutinacije je torej serološka metoda, s katero dokazujemo v preiskovanem serumu protitelesa proti virusnim hemaglutininom. V testu moramo uporabiti standardno količino poznanega virusa s hemaglutinacijskimi lastnostmi. Nato pripravimo razredčine preiskovanega seruma in dodamo standardno količino poznanega virusa, inkubiramo in dodamo še suspenzijo budrinih eritrocitov. V primeru, da so v preiskovanem serumu prisotna specifična protitelesa, se bodo vezala na molekule virusa, ki so odgovorne za hemaglutinacijske lastnosti in po fazi, ko v test dodamo suspenzijo eritrocitov ne bo prišlo do hemaglutinacije. Pozitiven rezultat testa IHA odčitamo kot gumbek eritrocitov na dnu vdolbinice mikrotiterske plošče z U dnom. V negativnem primeru, ko specifična protitelesa niso prisotna, virus zlepi

eritrocite in rezultat odčitamo kot hemaglutinacijo, ki se vidi kot krpasta prevleka na dnu vdolbinice mikrotitrerske pološče z U dnom.

PRAKTIČNO DELO

I. Določanje hemaglutinacijskega titra

V vse jamice mikrotitrerske plošče z U dnom vnesemo po 50 μ l fosfatnega pufra

V prve jamice mikrotitrskih plošč vnesemo po 50 μ l suspenzije virusa PI-3.

Pripravimo dvakratne razredčine virusa PI-3

Pripravimo 0,75 % suspenzijo budrinih eritrocitov

V vse jamice vnesemo po 50 μ l suspenzije eritrocitov

Mešanico inkubiramo 1 uro pri 37°C

Odčitamo rezultat in določimo delovno razredčino virusa za pripravi IHA testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												

Titer virusa je_____

II. Odčitavanje in vrednotenje rezultatov seronevtralizacijskega testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

11. VAJE:

IMUNOFLUORESCENČNI IN IMUNOPEROKSIDAZNI TEST

UVOD

Imunofluorescenčne tehnike so pričeli uvajati v diagnostiko kužnih bolezni po letu 1950, ko so razvili barvilo fluorescein isotiocianat (FITC) in so ga vezali (markiranje) na določena protitelesa. V primeru da FITC osvetlimo z UV svetlobo, valovne dolžine od 450 do 500 nm oddaja zeleno barvo. Določena protitelesa lahko označimo tudi z različnimi encimi za imunoperoksidazne metode ali tudi z drugimi barvili, npr. rodaminom, ki pri osvetlitvi s svetlobo valovne dolžine 620 nm oddaja rdečo barvo. Tako označena protitelesa imenujemo konjugat in se lahko specifično vežejo na ustrezen epitop antigena (npr. virus, bakterija). Ko preparat pregledujemo pod fluorescenčnim mikroskopom, so mesta, kamor so se vezala označena protitelesa ustrezno obarvana. Glede na vsebnost protiteles poznamo monoklonske in poliklonske konjugate. Poliklonske konjugate pridobimo tako, da vežemo barvilo ali encim na protitelesa iz hiperimunega seruma. Hiperimuni serum pridobimo z imunizacijo določenih živali s predhodno pripravljenimi virusnimi antigeni. Nekaj tednov po imunizaciji, ko žival doseže dovolj visok titer specifičnih protiteles, jo žrtvujemo, pridobimo imunoglobuline in jih označimo z barvilom. Poliklonski konjugati vedno vsebujejo tudi protitelesa proti drugim, nezaželenim virusnim in drugim antigenom, kot so protitelesa proti celicam kulture, kjer smo množili virus in tudi tistim antigenom, s katerimi se je žival že srečala pred poskusom. Ta neželena protitelesa, ki se nahajajo v konjugatu se lahko tudi nespecifično vežejo, kar otežuje odčitavanje rezultatov. Monoklonski konjugati so markirana monoklonska protitelesa na podoben način kot pri poliklonskih konjugatih. Monoklonska protitelesa pridobimo s posebno tehnologijo hibridomov, ki nam omogoča pridobiti večje količine protiteles istega razreda in točno določene specifičnosti. Za vrednotenje rezultatov potrebujemo

fluorescentni mikroskop, ki se od svetlobnega razlikuje v tem, da ima močan vir UV svetlobe.

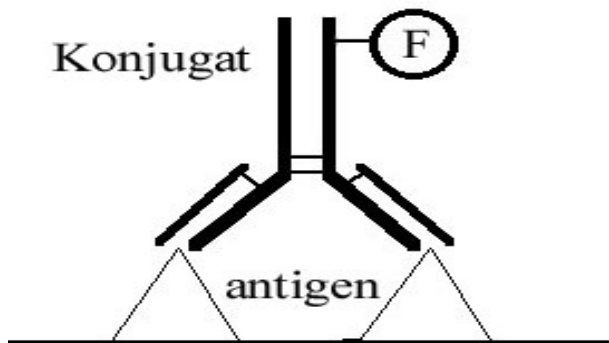
Neposredni imunofluorescenčni test (IF)

Z neposredno imunofluorescenčno metodo iščemo v vzorcu antigen s pomočjo poznanih protiteles, ki so konjugirana z barvilom. Antigene (npr. viruse, bakterije) iščemo s poznanim konjugatom v histoloških rezinah (imunohistologija), v sloju celic kulture, v celicah pridobljenih iz kliničnega vzorca (ostružki, brisi, punktati, biopsije, izpirki). Kot primer široke uporabe neposrednega imunofluorescenčnega testa lahko navedemo diagnostiko stekline. Prisotnost virusa stekline ugotavljamo v celicah možganov poginjene živali tako, da na predmetnem stekelcu pripravimo odtisek (ali histološko rezino) preiskovanega vzorca, preparat fiksiramo in dodamo delovno razredčino konjugata. Med inkubacijo se v pozitivnem primeru konjugirana protitelesa vežejo na specifične antigene virusa stekline, nato preparat speremo, da odstranimo nevezan konjugat in preparat opazujemo pod fluorescenčnim mikroskopom. Mesta v celici kjer se nahajajo virusni delčki se obarvajo zeleno.

Neposredni imunoperoksidazni test (IP)

Princip IP testa je podoben IF testu. V IP testu uporabljamo protitelesa označene s hrenovo peroksidazo. Podobno kot v primeru IF testa pripravimo preparat, tako da vzorec fiksiramo na predmetnici (85% aceton ali 5% formaldehid). Vzorec nato obdelamo z 1% raztopino H_2O_2 , da inaktiviramo endogeno peroksidazo, dodamo peroksidazni konjugat, inkubiramo (1 uro pri $37^{\circ}C$), speremo in dodamo substrat. Substrat lahko predstavlja raztopina orto-fenil-diamina (OPD). Encim, ki je vezan na protitelesa razgrajuje molekule substrata in nastaja netopni produkt določene barve (rjava, črna modra, odvisno od vrste substrata) na mestu vezave protiteles. Po določenem času substrat odstranimo s spiranjem in preparat opazujemo pod svetlobnim mikroskopom. Mesta, kjer se nahajajo antigeni so zaradi nastalega produkta obarvana.

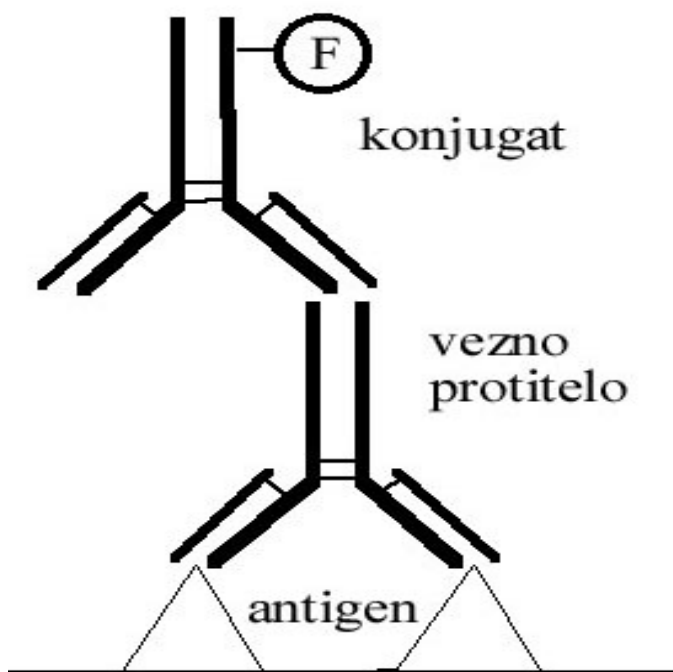
NEPOSREDNI TEST



Posredni imunoflorescenčni /imunoperoksidazni test

Posredni IF ali IP test uporabljamo za dokazovanje določenega antigena ali pa za dokazovanje specifičnih protiteles proti določenemu povzročitelju bolezni. Če dokazujemo protitelesa se specifična protitelesa, ki se nahajajo v serumu živali naprej vežejo na antigene, ki so pritrjeni na trdno podlago (običajno je to predmetno stekelce). Nastalemu kompleksu antigen-protitelo nato dodamo sekundarna protitelesa (konjugat) uperjena proti iskanim protitelesom iz seruma. Konjugat je lahko specifičen proti IgG ali IgM, tako da lahko ločujemo posamezne razrede imunoglobulinov specifične proti iskanemu antigenu. Pogosto s posrednima metodama dokazujemo tudi iskani antigen (sendvič metoda). Vzorcju, v kateremu iščemo antigen, dodamo primerna specifična protitelesa, morebiti nastale komplekse pa dokažemo s konjugatom specifičnim za primarna (vezavna) protitelesa

POSREDNI TEST



PRAKTIČNO DELO

Dokazovanje virusa IHN (Infekciozna hematopoetska nekroza) s posrednim imunoperoksidaznim testom

Iz vsake kadičke predmetnega stekelca (pripravljeni na 8. vajah) odpipetiramo gojišče, celice osušimo.

Celice fiksiramo na steklo s 85% acetonom. V vsako kadičko vnesemo 0,2 ml acetona.

Pripravimo 1.0 ml delovne razredčine monoklonalnih protiteles proti N proteinu virusa IHN v razmerju 1:50 in vnesemo po 100 μ l v vsako kadičko

Inkubiramo 60 minut pri 37°C

Predmetnico 3x speremo z 0,5 ml fosfatnega pufra.

Pripravimo 1.0 ml delovne razredčine konjugata (kunjca protitelesa proti mišjim imunoglobulinom označena s hrenovo peroksidazo) v razmerju 1:100 in vnesemo po 100 μ l v vsako kadičko.

Inkubiramo 60 minut pri 37°C

Pripravimo substrat: 1 tableto AEC substrata raztopimo v 2,5 ml dimetilformamida. Ko se raztopi dodamo v 47,5 ml 0,05 M acetatnega pufra.

Predmetnico 3x speremo z 0,5 ml fosfatnega pufra.

Substrat aktiviramo z vnosom 25µl 30% H₂O₂.

V vsako kadičko vnesemo po 0,4 ml substrata in inkubiramo 20 minut na sobni temperaturi.

Rezultate čitamo pod svetlobnim mikroskopom

IZOLACIJA VIRUSA NA CELIČNI KULTURI - PREDMETNICA (Chamber slide)

Datum inokulacije:

Celice:

A1	A2	A3	A4	
B1	B2	B3	B4	

1. Nariši zapažanja vidna pod mikroskopom

12. VAJE:

ENCIMSKO IMUNSKI TEST - ELISA

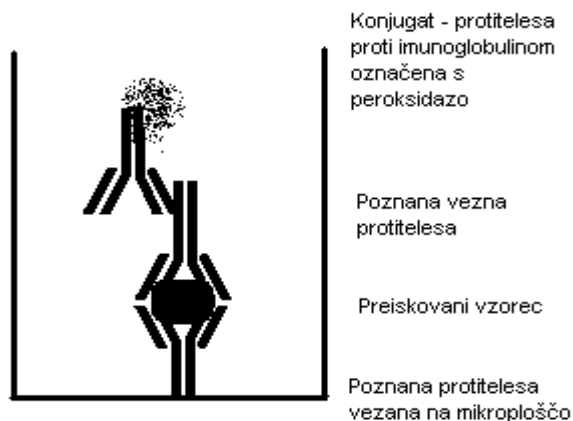
UVOD

Encimsko imunski test ali ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) je danes v praksi zagotovo najpogostejše uporabljana metoda za določevanje različnih mikrobnih antigenov ali za določanje specifičnih protiteles proti njim. Osnovo testa predstavlja mikrotiterska plošča s 96 vdolbinicami z ravnim dnom, kamor večemo bodisi poznana protitelesa ali poznan antigen glede na to, kaj s testom želimo dokazovati. Za test uporabljamo inaktivirane, nekužne reagentne, predvsem pa je test mogoče avtomatizirati in standardizirati, kar omogoča preiskavo velikega števila vzorcev v razmeroma kratkem času in ob nizki ceni.

Indirektni sendvič ELISA test- dokaz virusnih antigenov

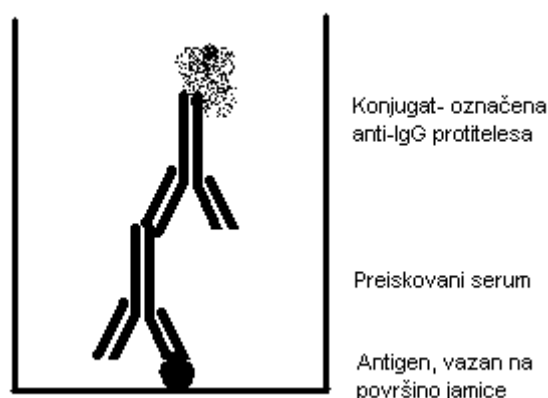
V vdolbinice mikrotiterskih plošč večemo protitelesa poznane specifičnosti. Običajno so to poliklonska protitelesa, lahko so tudi monoklonska protitelesa, lahko pa že proizvajalci diagnostičnih kompletov (diagnostični kit) ponujajo vezane na mikroploščo. V kolikor kot vzorec uporabimo različne organe poginjene živali najprej pripravimo suspenzijo organov, jo centrifugiramo in supernatant uporabimo kot vzorec v katerem iščemo nek določeni antigen (npr. virusni ali bakterijski). Vzorci so lahko tudi serum, sekreti, ekskreti ali različni punktati bolne živali. Po inkubaciji, kjer se morebiti prisoten antigen iz preiskovanega vzorca veže s protitelesi vezanimi na mikroplošči, le to speremo in dodamo poznana vezna protitelesa, ki so običajno monoklonska protitelesa proti iskanemu antigenu. Glede na to, če smo v testu uporabili vezna monoklonska protitelesa mišjega izvora, v naslednjem koraku na mikroploščo dodajamo anti-mišji konjugat, ki vsebuje označena protitelesa proti mišjim imunoglobulinom. Po končani inkubaciji in spiranju dodamo še substrat. V

pozitivnem primeru se substrat v vdolbinici mikrotiterske plošče obarva, ker nastaja topni produkt. V negativnem primeru, ko v preiskovanem vzorcu ni iskanega virusa, vezna protitelesa nimajo mesta za vezavo, zato se pri spiranju odplavijo. Tudi konjugat pri tem nima mesta za vezavo in se odplavi, zato substrat ne spremeni barve. V ELISA moramo vedno vključiti tudi poznan pozitiven in negativen vzorec. Nastalo reakcijo odčitamo s spektrofotometrom pri določeni valovni dolžini, odvisno od vrste substrata. Rezultat izrazimo z absorbanco ali z optično gostoto (O.D.) ki je odvisna od intenzivnosti obarvanja substrata. Pri vrednotenju rezultatov se moramo vedno orientirati na O.D., pozitivnega in negativnega vzorca.



Indirektni test ELISA - dokaz specifičnih protiteles

Indirektna ELISA je metoda, s katero dokazujemo prisotnost specifičnih protiteles proti določenemu povzročitelju bolezni. Na mikrotitersko ploščo je vezan poznan antigen. Dodamo preiskovani vzorec (serum), inkubiramo, speremo, dodamo konjugat specifičen za vrsto iskanih protiteles. V kolikor želimo dokazovati akutno okužbo uporabimo konjugat specifičen za IgM, če pa dokazujemo IgG, lahko potrdimo dalj časa trajajočo okužbo.



PRAKTIČNO DELO

Test ELISA za dokaz protitels proti govejemu herpesvirusu - 1

Vse reagente moramo pred uporabo ogreti na sobno temperaturo (18-25 °C). Pripravimo delovno raztopino za spiranje, redčenje vzorcev, kontrolnih serumov in konjugata (za pripravo 1 litra vzemi 50 ml 20X koncentrata PBS-Tween in dodaj v 950 ml destilirane vode) Izpolnimo protokol razporeditve vzorcev na mikroplošči (ELISA protokol).

V jamice mikroplošč nanese po 100 µl PBS-T. V parno in neparno jamico mikroplošče (npr. jamica A1 in A2) nanese po 4µl pozitivnega kontrolnega seruma (reagent A) in v jamici B1 in B2 pa po 4µl negativnega kontrolnega seruma (reagent B). Za lažje vrednotenje je priporočljivo dati kontrole v dveh ponovitvah (duplikatih).

Preiskovani vzorec vnesemo po 4µl tako v parno kot neparno jamico (torej vsak vzorec v dve jamici).

Plošče damo za 2 minuti na stresalnik, da se vzorci dobro premešajo ter inkubiramo 1 uro na 37° C +/- 1° C.

Po inkubaciji mikroplošče 3x speremo s PBS-T in dobro osušimo s papirnato brisačo. Mikroplošče lahko spiramo ročno ali z avtomatskim spiralcem. Pripravimo delovno razredčino konjugata; v stekleničko z liofiliziranim konjugatom damo 11,5 ml PBS-T in mešamo 10 minut, da se dobro raztopi.

V vsako jamico vnesemo po 100µl HRP konjugata. Inkubiramo 1 uro na 37 ° C +/- 1° C in ponovimo spiramo, kot prej opisano.

Po inkubaciji in spiranju dodamo 100µl substrata, ki je ogret na sobno temperaturo. (Substrat inkubiramo na sobni temperaturi vsaj 4 ure pred nanosom na mikroploščo.)

Reakcijo ustavimo tako, da dodamo 50µl stop raztopine v vsako jamico. Absorbanco (izraženo v OD) izmerimo s čitalcem ELISA pri 450 nm

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Optične vrednosti (OD) v jamici z vzorcem korigiramo tako, da od vrednosti s pozitivnim antigenom (neparne jamice) odštejemo vrednost v jamici z negativnim antigenom (parne jamice), dobimo korigirano OD ($OD_{kor.}$):

$$OD_{IBR} - OD_{Ag} = OD_{kor}$$

Izračun vrednosti izražene v odstotkih.

Vse korigirane OD vrednosti za posamezne vzorce kakor tudi negativno kontrolo izračunamo po naslednji formuli. Relativne vrednosti vzorca dobimo tako, da OD_{kor} vzorca pomnožimo s številom 100 ter produkt delimo z OD_{kor} pozitivne kontrole.

$$\text{Vrednost izražena v odstotkih (VO)} = \frac{OD_{kor} \text{ vzorca} \times 100}{OD_{kor} \text{ pozitivne kontrole}}$$

Rezultati posameznega testa so veljavni:

Korigirana OD vrednost pozitivne kontrole mora biti večja od 0.5.

VO negativne kontrole mora biti $\leq 7\%$

9.1. Presoja rezultatov

Rezultat je pozitiven če je VO vzorca $> 12\%$

Rezultat je dvomljiv, če je vrednost VO med 8 - 12%

Rezultat je negativen če je VO vzorca $\leq 7\%$

	1	2	3	4	5
A	+S	+S			
B	-S	-S			
C					
D					
E					
F					
G					
H					

13. VAJE:

MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA ŽIVALSKIH BOLEZNI

Uvod:

Z uporabo molekularnih metod v diagnostiki virusnih bolezni neposredno dokazujemo prisotnost specifičnega dela nukleinske kisline virusa v preiskovanem vzorcu. Za diagnostiko virusov z molekularnimi metodami lahko uporabimo različne vrste vzorcev: organe, polno kri, serum, mleko, blato, bris. Ker se nukleinska kislina iskanega virusa nahaja v okuženih celicah, je potrebno vzorec (tkiva) najprej homogenizirati, sprostiti nukleinsko kislino iz celic in iz suspenzije izolirati celokupno nukleinsko kislino. Pri dokazovanju virusov z RNA je potrebno molekularne metode izvajati v posebnih prostorih, kjer ni prisotnih encimov (kontaminacija prostora) za razgradnjo nukleinskih kislin (RNA-ze in DNA-ze), ki bi nam lahko razgradile nukleinsko kislino iskanega virusa. Specifičnost izolirane nukleinske kisline določamo z uporabo hibridizacijskih sond, s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, probami in določanjem nukleotidnega zaporedja.

Metoda hibridizacije po Southern-u (Southern blot)

Izoliramo celokupno DNK iz vzorca in jo izpostavimo delovanju enega ali več restrikcijskim encimom. Nastale odseke DNK nato z elektroforezo ločimo po velikosti ter jih prenesemo z gela na nitrocelulozno ali najlonsko membrano. Na membrani izvedemo hibridizacijo z označeno sondo. Velikost fragmentov DNK, ki so hibridizirali s sondo, primerjamo z znanim vzorcem in odčitamo rezultat.

Hibridizacija *in situ*

Pri tej metodi poteka denaturacija in hibridizacija v okuženih celicah v citoloških rezinah ali na tkivnih rezinah. Po vezavi označene (radioaktivno, z

dioksigeninom, z avidinom) sonde na komplementarni del DNK končni produkt reakcije vidimo kot obarvana (rjavo, črno, modro; odvisno od vrste substrata) specifična mesta v celici (jedro, citoplazma). Metoda se uporablja za dokazovanje virusnih nukleinskih kislin v celici ter za ugotavljanje lege določenih sporočilnih RNK (mRNA) v celici.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR: Polymerase Chain Reaction)

V zadnjih letih je najpogosteje uporabljena metoda molekularne biologije verižna reakcija s polimerazo (PCR). Metoda temelji na *in vitro* pomnoževanju specifičnega odseka nukleinske kisline virusa (velikosti od 100 do 1000 nukleotidov) s pomočjo izbranih začetnih oligonukleotidov (15-25 nukleotidov), Mg ionov, pufra, deoksiribonukleotidnih trifosfafov (dNTP 4 vrste: dGTP, dATP, dTTP, dCTP) in termostabilne polimeraze. Verižna reakcija s polimerazo poteka v 30-40 ciklih s spreminjanjem temperatur, ki si sledijo v vsakem ciklusu; denaturacija (94-100 °C), prileganje začetnih oligonukleotidov (40-70 °C) in sinteza nukleinske kisline (60-75 °C). Število kopij izbranega odseka virusne DNA se med vsakim ciklusom podvoji. Produkta PCR specifičnih velikosti najpogosteje dokazujemo s pomočjo elektroforeze v gelu s primerjavo na standardno velikost markerja (100 bp). Dobljen produkt PCR pričakovane velikosti potrjuje prisotnost specifične nukleinske kisline virusa v vzorcu. Produktom PCR lahko dodatno dokažemo specifičnost z metodo hibridizacije s specifično probo in metodo sekveniranja.

Reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR)

Termostabilna polimeraza deluje le na DNA molekuli. Pri virusih z RNA je zato potrebno v prvi stopnji izvesti reverzno transkripcijo s pomočjo encima reverzna transkriptaza, ki prepíše virusno RNA v cDNA. Postopek je v drugi stopnji enak, kot pri izvedbi PCR. Zaradi visoke občutljivosti metode PCR in nevarnosti kontaminacije med vzorci, se vse več uporablja izvedba RT-PCR v eni stopnji (angl. one-step RT-PCR), kjer s hkratnim dodatkom obeh encimov reverzno transkripcijo in PCR izvedemo brez vmesnega odpiranja PCR epruвет.

PCR-ELISA

S to metodo dokazujemo specifičnost produkta PCR v mikrotiterskih ploščah v katerih je vezana specifična proba. Po izvedbi PCR, za dokaz specifičnosti prenesemo produkte PCR v jamico mikroplošče z vezano probno. Ob vezavi produkta PCR in sonde se jamica obarva, rezultat pa odčitamo s spektrofotometrom. Količino produkta PCR lahko tudi kvantitativno izrazimo.

PCR v realnem času (REAL-TIME PCR)

Je izpeljanka metode PCR pri kateri lahko med potekom PCR količino produkta sproti merimo v zaprti epruveti. V reakcijsko mešanico za PCR dodamo še specifično probno označeno s posebnimi fluorogenimi barvili, tako da na posebni aparaturi lahko spremljamo količino specifičnega pomnoževanja odseka virusnega genoma po vsakem ciklusu v obliki fluorescentne barve. Metoda je primerna za pregled večjega števila vzorcev in zaradi možnosti avtomatiziranja postopka vse bolj izpodriva "klasičen PCR".

Določanje nukleotidnega zaporedja-sekveniranje

Je postopek za določanje nukleotidnega zaporedja virusne RNK ali DNK. Za sekveniranje nekega odseka običajno izvedemo klasičen PCR, produkte PCR specifičnih velikosti izrežemo iz gela, osamimo pomnoženo nukleinsko kislino in izvedemo sekvenčno reakcijo s TRRM (angl. terminator reaction ready mix). Na aparaturi sekvenator določimo zaporedje nukleotidov v našem vzorcu.

Tipizacija virusnih sevov

Dobljeno nukleotidno zaporedje virusnega odseka lahko primerjamo z vsemi nukleotidnimi zaporedji v genski banki podatkov (GenBank) in določimo genetsko podobnost med njimi. Z že znanimi sekvencami virusnih sevov neke regije lahko dobljena nukleotidna zaporedja virusnega genoma primerjamo med seboj in določimo genotip virusa.

PRAKTIČNO DELO

Na vaji se teoretično seznanimo z omenjenimi molekularnimi metodami, praktično pa prikažemo analizo produktov PCR z elektroforezo v gelu.

Namen vaje

Namen vaje je teoretično spoznati metode v molekularni diagnostiki virusov. Ker se nekateri postopki izvajajo v posebnih prostorih z opremo, se na vaji pričakuje, da študent dobi teoretičen pregled o metodah in osvoji pojme, ki se pogosto uporabljajo v strokovni literaturi, kot so: sonda, proba, označena sonda, hibridizacija, komplementarna DNK, denaturacija, RT-PCR, REAL-TIME PCR, sekveniranje.