

Sensorveiledning

IRBIO30018 Medisinsk mikrobiologi (MLE3)

Skriftlig, digital eksamen (Inspera Assessment), 3 timer

Oppgave 1

- a. Gi tre eksempler på klassifisering/inndeling av bakteriene når vi ser dem i mikroskopet (3 p).
Gram positive kokker i hauger, osv.
Gi eksempel på en bakterie (slekts- og artsnavn) for hvert av eksemplene du velger over (3 p)
f.eks *Staphylococcus aureus*, osv.
- b. Gi en kort definisjon av begrepet NOMENKLATUR (2 p)
Et system («regelverk») for hvordan liv navngis på en vitenskapelig måte
Gi en kort definisjon av begrepet KLON (2 p)
Populasjon av genetisk identiske mikroorganismer som alle har opphav i en og samme celle
- c. Selvrettende oppgave (3 p)
- d. Selvrettende oppgave (2 p)
- e. Selvrettende oppgave (1 p)

Oppgave 2

- a. Drøft betydningen av normalfloraen i og på kroppen vår (8 p).
Drøftes: Normalfloraen er viktig for god helse. Bakteriene som utgjør normalfloraen er forskjellig fra sted til sted på og i kroppen. Sammensetningen varierer fra person til person – menneskenes mikrobiom er ulikt. Normalfloraen bidrar i mange funksjoner: Forsvaret mot patogene mikroorganismer (f.eks pga konkurranse om næringsstoffer), metabolismen av næringsstoffer i tarmen.
For å nå helt til topps i oppgaven: Drøfting også av ny kunnskap om bakterienes betydning for helse og normal «drift». Nyere forskning tyder på at mikrobene interagerer i flere prosesser – kognitive prosesser, psykiske lidelser, produksjon av vitaminer.
- b. Forklar hva som er forskjellen på normalflora og koloniseringsflora (4 p).
Normalfloraen består av mikroorganismer som normalt hører hjemme i ulike lokalisasjoner på og i kroppen, mens koloniseringsflora eksisterer kun forbigående på den aktuelle lokalisasjonen. Koloniseringsflora kan være normalflora ett sted, og havne «tilfeldig» et annet sted den vanligvis ikke befinner seg.
- c. Nevn to bakteriearter som vanligvis tilhører normalfloraen, og angi hvor på/i kroppen vi som regel finner flest av dem (4 p)
S. epidermidis – hud
E. coli – tarm
S. viridans – i hals, munn

Oppgave 3

- a. Selvrettende oppgave (3 p)
- b. Selvrettende oppgave (2 p)
- c. Selvrettende oppgave (3 p)
- d. Beskriv hvordan vi utfører en x/v-test, og hvordan resultatet ser ut dersom vi har en *Haemophilus influenzae*. Forklar samtidig hva slags molekyler x- og v-faktor egentlig er. (6 p)
Haemophilus identifiseres bl.a. ved å teste om stammen trenger tilsetning av X- og/eller V-faktor for å vokse på et basalt medium (for eksempel Mueller Hinton-agar).
Tre ulike, ferdig impregnerte, diskapper med henholdsvis X-faktor, V-faktor og X+V-faktor benyttes. Disse plasseres på en ferdig inokulert skål med renkultur av bakteriestammen som skal testes. Oppvekst av kolonier kun rundt lappene med respektive vekstfaktorer viser om bakterien er avhengig av en eller begge vekstfaktorene for å vokse.
X-faktor er hemin (eller hematin). Dette er en del av de røde blodcellene og er tilgjengelig for bakteriene på en blodskål.
V-faktor er NAD. Nikotinamid adenin dinukleotid. Et viktig molekyl for cellerespirasjon og energiomsetningen i kroppen. Blir tilgjengelig for bakteriene når blodet kokes, slik som i en brunskål (sjokoladeagar).

Oppgave 4

- a. Selvrettende oppgave (2 p)
- b. Betalaktamantibiotika er den viktigste gruppen antibiotika vi har. Beskriv virkningsmekanismen til denne gruppen. (4 p)
Angrepspunktet for betalaktamantibiotika er peptidoglykanlaget i celleveggen.
Betalaktamantibiotika fester seg til transpeptidasen/PBP (penicillinbindende proteiner).
Kryssbindingene i peptidoglykanlaget kan da ikke produseres, og strukturen i celleveggen blir ustabil. Grunnlaget for vekst blir dermed borte.
- c. Selvrettende oppgave (3 p)
- d. Beskriv trinnene i utførelsen av resistensbestemmelse med lappediffusjon (6 p)
Lag en bakteriesuspensjon av renkultur av den aktuelle bakterien til 0,5 McFarland.
Spre med vattpensel i flere (minst 3) retninger på egnet resistensskål, enten Müller Hinton (til lite kravstore bakterier) eller Müller Hinton Fastidious (til kravstore bakterier).
Legg på aktuelle antibiotikalapper.
Inkubér ved 37°C.
Det skal ikke gå mer enn 15 minutter mellom hvert trinn.

Oppgave 5

- a. Selvrettende oppgave (4 p)
- b. Forklar hva som skjer ved hvert trinn på illustrasjonen av PCR-reaksjonen. Inkludér de ulike temperaturene og sett navn på hvert av trinnene (8 p)

Trinn 1: Denaturering. PCR-maskinen varmer opp til ca. 95°C. Da denatureres DNA, dvs. at det går fra dsDNA til ssDNA fordi hydrogenbindingene mellom nukleotidene i spiralen brytes.

Trinn 2: Hybridisering (annealing)

Temperaturen går ned til ca. 50°C. Primerne binder seg (annealing) til de nå ssDNA-trådene. Primerne er komplementære til hver sin tråd og bindingen skjer mellom de komplementære basene.

Trinn 3: Polymerisering/elongering/ekstensjon/syntese

DNA polymerase «finner» primerne og bruker disse som startsekvenser for polymeriseringen. Skjer ved ca. 72°C. DNA-syntesen går fra den frie 3'OH-enden på begge primere. Primerne syntetiserer hver sin tråd, og vi ender opp med et kort PCR-produkt der lengden avgjøres av hvor primerne binder seg.

- c. Nevn fem (5) ingredienser som må være til stede for å kjøre en real-time PCR-reaksjon (5 p)

Målsekvens (templat)

Thermostabil polymerase - enzymet som får reaksjonen til å gå

Frie nukleotider (dNTP)

2 primere (primerpar)

Probe

Magnesium (kofaktor)

Buffer for optimal pH

Oppgave 6

Kasus

En 78 år gammel mann med diabetes kommer til akuttmottaket med et stygt sår på foten. Såret dekker store deler av foten med mye gulaktig puss. Han har feber og føler seg litt uvel.

Legen på akuttmottaket tar ingen sjanser og hun bestemmer seg for å legge han inn samme ettermiddag. Det blir tatt prøver med tanke på infeksjonsstatus, og CRP er på 245. Det blir i tillegg tatt penselprøve fra såret og det blir tappet 2 sett med blodkulturer med 10 minutters mellomrom. Deretter settes pasienten på antibiotika intravenøst.

Når pussprøven ankommer mikrobiologisk avdeling blir den sådd ut på blodskål, brunskål og mannitol salt. Blodkulturene settes til inkubering.

Basert på opplysningene over, besvar oppgave 6 a) til f).



- a. Dagen etter vokser det på alle tre skålene. Navngi bakterieslekten vi mest sannsynlig har med å gjøre. Begrunn svaret ditt. (3 p)

Besvarelsen må inneholde:

1. Staphylococcus («Stafylokokker» aksepteres med noe trekk)
2. Mannitol salt-skåla har et høyt saltinnhold, og stafylokokker tåler mye salt, mens de aller fleste andre humanpatogene bakterieslekter ikke gjør det (skåla er selektiv for stafylokokker).

- b. Mannitol salt-skåla har fått fargeomslag fra ferskenfarget til gul. Hvilken bakterieart mistenker vi på bakgrunn av denne opplysningen? Hvorfor har mediet blitt gult? (3 p)

Besvarelsen må inneholde:

1. Staphylococcus aureus
2. Fermenterer sukkerarten mannitol, som finnes i skåla. Det produseres syrer som reduserer pH i mediet. Fargeindikatoren får et gult omslag ved lav pH.

- c. Nevn en test (ikke gramfarging) du kan gjøre for å bekrefte mistanken din, beskriv hvordan et positivt resultat arter seg og gi en kort beskrivelse av testprinsippet. (4 p)

Mulige tester (alternativer):

DNase – forklare hvordan enzymet DNase fra bakterien bryter ned DNAet i skåla slik at kun områder med intakt DNA felles ut med HCl.

Staphaurex – forklare at latex inneholder antistoffer spesifikt rettet mot proteiner (protein A) i celleveggen hos *S. aureus*. Vi har ikke fokusert på den delen av prinsippet der fibrinogen på latexpartiklene binder seg til koagulase produsert av bakterien.

Maldi-Tof - Bakteriekoloni blandes med matrix på en targetplate. Matrix krystalliserer og en laser frigir ioniserende proteiner som deretter akselererer gjennom et vakuumrør i et elektrisk felt. Instrumentet påviser ulike proteinfragmenter ved å «måle» molekylmasse (time of flight (Tof) er avhengig av massen), og sammenlikner mikrobens spektrale proteinmønstre med kjente mønstre i en database.

- d. Blodkulturene som er tatt av pasienten gir positivt utslag i alle fire (4) flaskene i inkubatorskapet. Ved gramfarging, hvordan forventer du at det vil se ut i mikroskopet?

Begrunn svaret ditt. (4 p)

Gram positive kokker i hauger (stafylokokker). Svaret forklares ved å trekke sammenhengen med funnet i sårprøven. Må vise forståelse av sammenhengen mellom inngangsporten og at det har utviklet seg sepsis.

- e. Forklar hvorfor det ble tatt to sett med blodkulturer. (4 p)

For å kunne avsløre kontaminasjon. Ved oppvekst av det samme i alle flaskene er alt greit, men dersom det er ingen vekst i ett av settene og vekst i en eller begge av de to i det andre settet, så mistenker vi kontaminasjon. Gjelder spesielt dersom funnet er hudbakterier (f.eks hvite staf.)

- f. I dette tilfellet ble det brukt cefoxitin i screeningen av aktuell resistensmekanisme. Hva slags resistensmekanisme dreier det seg om her? Forklar mekanismen i korte trekk. (4 p)

Endret målmolekyl.

Bakterien har genet *mecA* som koder for endret PBP (penicillin-bindende protein). Fordi PBP's struktur er endret kan ikke lenger penicilliner binde seg til målmolekylet.

Læringsutbytter:

- Beskrive systemet for mikroorganismers taksonomi
- Beskrive hva som kjennetegner de ulike *hovedgruppene av mikroorganismer* mhp oppbygning, morfologi og reproduksjon
- Forklare hvordan *bakterier* er klassifisert mhp oppbygning, morfologi og fysiologi, og hvordan kunnskapen om dette henger sammen med identifikasjon av bakteriene
- Forklare prinsipper for patogenese og virulens, og hvordan dette henger sammen med ulike bakteriers evne til å etablere infeksjoner
- Drøfte hvorfor mikroorganismer noen ganger skaper infeksjoner og noen ganger kan opptre som koloniserings- eller normalflora, og relatere dette til betydningen av funn i ulikt prøvemateriale
- Gjøre rede for noen av de vanligst forekommende humanpatogene mikroorganismene, sykdommer de kan gi, og hvordan de kan identifiseres i laboratoriet
- Beskrive de vanligste prinsippene for virkningsmekanismer for antibiotika
- Forklare enkelte resistensmekanismer samt resistensutvikling hos bakterier
- Drøfte utfordringer forbundet med resistensutvikling, både nasjonalt og globalt
- Drøfte betydningen av preanalytiske faktorer, og gjøre rede for prøvetaking og oppbevaring av et utvalg prøvematerialer
- Forklare bruken av ulike dyrkningsmedier, og vurdere valg av medier i forhold til prøvemateriale og klinikk
- Beskrive bruksområder for autoklaving og desinfeksjon, og hva de to metodene går ut på
- Kjenne til og forstå betydningen av smittevernarbeid og nasjonale overvåkingssystemer
- Forklare hva som ligger i begrepet kvalitetskontroll, og kunne gi eksempler på hvordan dette foregår i et mikrobiologisk laboratorium
- Kunne isolere og identifisere ulike humanpatogene mikrober, utføre resistenstesting og påvise enkelte resistensmekanismer for et utvalg bakterier
- Forklare prinsippet for PCR-teknologi og ulike bruksområder
- Kjenne til ny teknologi og framtidstrender i faget

Karakterskala

IRBIO 30018 MLE3

A: 91-100

B: 81-90

C: 71-80

D: 61-70

E: 51-70

F: ≤50

symbol	betegnelse	generell, ikke fagspesifikk beskrivelse av vurderingskriterier
A	fremragende	Fremragende prestasjon som klart utmerker seg. Kandidaten viser svært god vurderingsevne og stor grad av selvstendighet.
B	meget god	Meget god prestasjon. Kandidaten viser meget god vurderingsevne og selvstendighet.
C	god	Jevnt god prestasjon som er tilfredsstillende på de fleste områder. Kandidaten viser god vurderingsevne og selvstendighet på de viktigste områdene.
D	nokså god	En akseptabel prestasjon med noen vesentlige mangler. Kandidaten viser en viss grad av vurderingsevne og selvstendighet.
E	tilstrekkelig	Prestasjonen tilfredsstillende minimumskravene, men heller ikke mer. Kandidaten viser liten vurderingsevne og selvstendighet.
F	ikke bestått	Prestasjon som ikke tilfredsstillende de faglige minimumskravene. Kandidaten viser både manglende vurderingsevne og selvstendighet.