

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL



Týden 3: Fyziologie bakterií, kultivační půdy

Ondřej Zahradníček 777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz ICQ 242-234-100

Nejprve opakování z minula

Morfologie bakterií
(složení, tvary,
uspořádání, sporulace)

Fyziologie bakterií
(množení, metabolismus,
využívání substrátů)

Barvení (= pozorování
mikroba jako
morfologické jednotky)

Kultivace (= pozorování
růstových, tedy
fyziologických vlastností
mikroba)

Množení bakterií

- Množení bakterií je základním projevem jejich životaschopnosti
- Každá bakterie má svou generační dobu (zpravidla hodiny, u některých dny)
- Za jednu generační dobu jsou z jedné dvě, za desetinásobek je z jedné 1024 bakterií (teoreticky) a podobně
- Ideální množení by existovalo pouze kdybychom neustále přidávali živiny a popř. kyslík a odebírali odpadní produkty



Reálná růstová křivka

- **Fáze latence** – bakterie jsme nechali kultivovat, ale ještě jich nepřibývá
- **Fáze exponenciální** – růst se zrychluje
- **Fáze stacionární** – rostou pořád stejně rychle
- **Zpomalení a zastavení růstu** – došly živiny, je příliš mnoho odpadů, nebo bakterie samy regulují svůj počet pomocí „quorum sensingu“



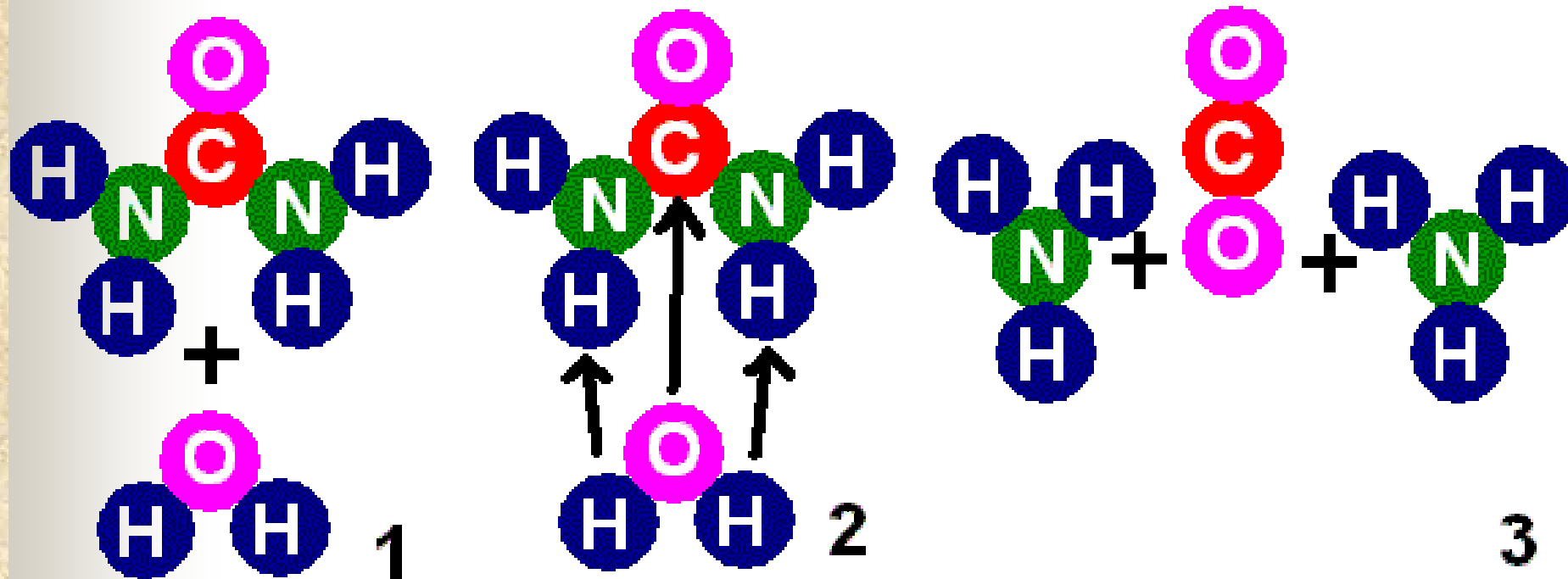
Fyziologie bakterií

- Tak jako každý organismus, i bakterie mají svůj katabolismus a anabolismus
- Katabolismus může být trojí:
 - **Fermentace** – štěpení bez potřeby kyslíku. Málo energeticky výhodný, ale nepotřebuje kyslík
 - **Aerobní respirace** – z mála živin se získá hodně energie, je ale nutný kyslík
 - **Anaerobní respirace** – jiný akceptor elektronů

Substráty

- Fermentovat i respiračně odbourávat lze **různé substráty**. Substrátem může být polysacharid, monosacharid, aminokyselina, lipid apod.
- Pro různé bakterie existují **typické substráty**, které umějí buďto fermentovat nebo respiračně odbourávat. To se využívá v diagnostice.
- Typické substráty zpravidla souvisejí s adaptací mikrobů na určité prostředí. Třeba střevní mikroby umějí odbourávat molekuly, které se ve střevě běžně vyskytují.

Příklad – ureázová aktivita helikobaktera

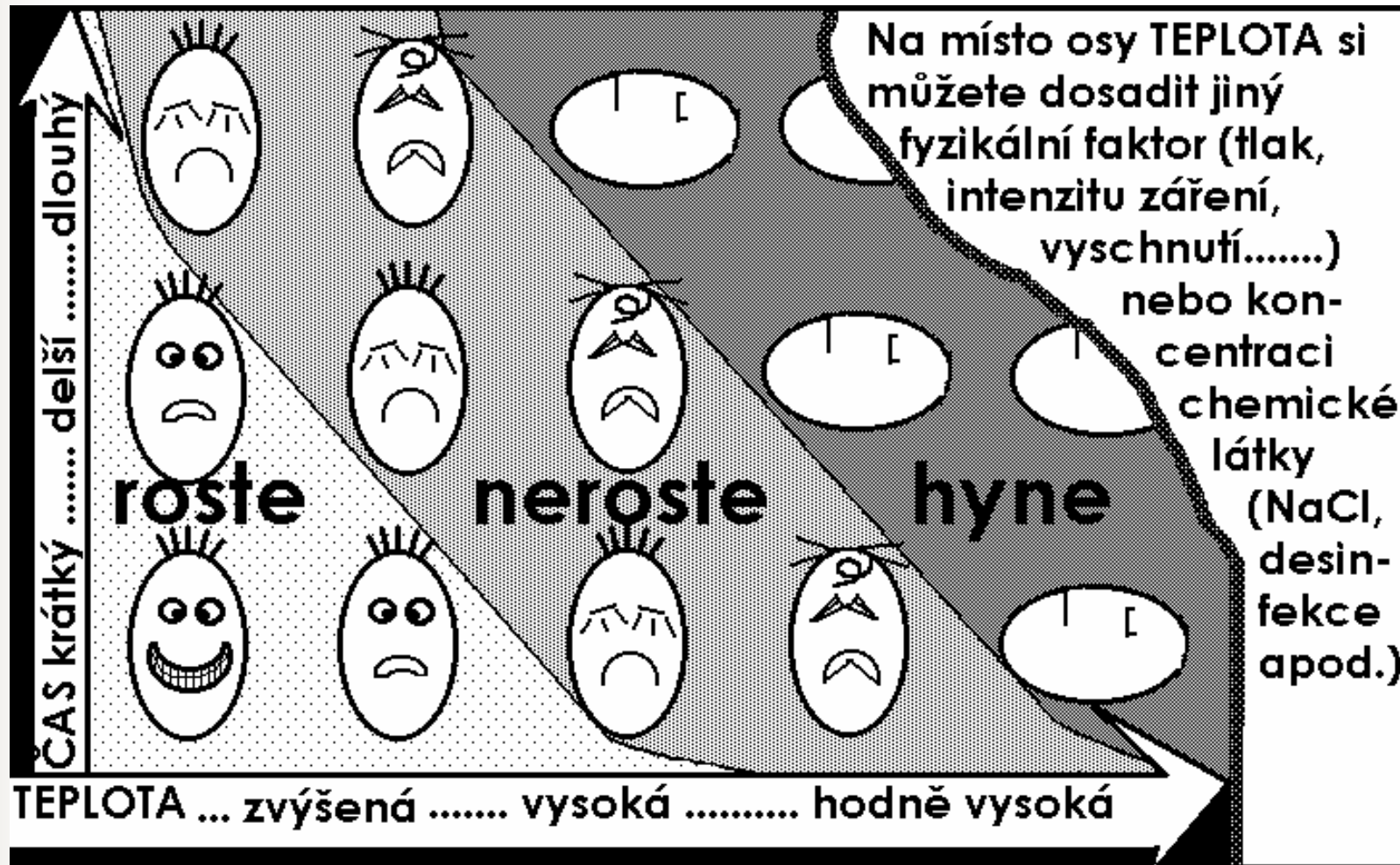




Podmínky

- Pro kultivaci bakterií jsou nutné určité podmínky
- Nestačí takové, aby bakterie přežívala. Musí být i schopna se množit
- Podmínky musí být splněny, co se týče teploty, pH, koncentrace solí a mnoha dalších věcí
- Nepůsobí přitom jednotlivě, kombinují se

Když se mění určité faktory





Kultivace bakterií obecně

- Bakteriím musíme připravit přijatelné vnější podmínky – teplotu, vlhkost apod.
- **Aerobní a fakultativně anaerobní** bakterie můžeme pěstovat za normální atmosféry
- **Striktně anaerobní bakterie** vyžadují atmosféru bez kyslíku
- Používáme různá kultivační média, sloužící k určitým účelům

Pěstování anaerobních bakterií





Smysl kultivace bakterií

- Proč vlastně v laboratoři bakterie pěstujeme?
 - Abychom je **udrželi při životě a pomnožili**.
K tomu slouží kultivace na tekutých půdách i na „pevných“ půdách (to jsou půdy, které netečou, jejich základem je většinou agarová řasa)
 - Abychom získali **kmen** – pouze pevné půdy
 - Abychom je vzájemně **odlišili a oddělili** – používají se diagnostické a selektivní půdy, sloužící k identifikaci



Vzorek a kmen

- **Vzorek** je to, co se odebírá pacientovi. Vzorek obsahuje buňky makroorganismu, různý počet druhů mikrobů (nula až třeba dvacet) a další příměsi
- **Kmen – izolát** – je populace jedné bakterie, izolovaná ze vzorku na pevné půdě
- Abychom získali kmen, **musíme bakterii pěstovat na pevné půdě a dobře rozočkovat**



Mikrobiologické metody – rozdělení

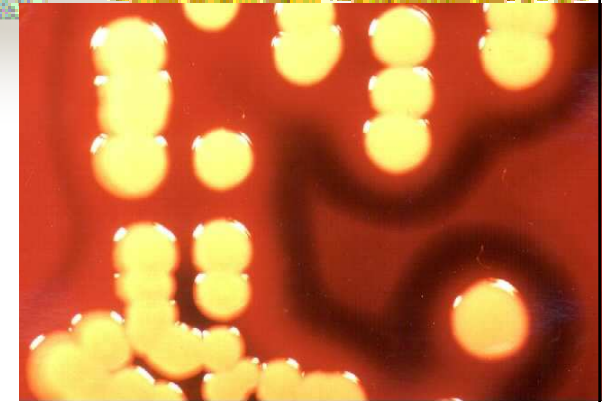
- Metody přímého průkazu
 - Přímý průkaz ve vzorku (pracujeme s celým vzorkem, například sputem, mozkomíšním mokem, močí apod.)
 - Identifikace kmene (pracujeme s jedním kmenem, který byl ze vzorku izolován)
- Metody nepřímého průkazu – spočívají v průkazu protilátek proti mikrobovi



Postavení kultivace v systému metod

- Přímé metody (mikrob – část – produkt):
 - Mikroskopie – průkaz ve vzorku i identifikace
 - **Kultivace – průkaz ve vzorku i identifikace**
 - Biochemická identifikace – jen identifikace!
 - Průkaz antigenu – průkaz ve vzorku i id.
 - Průkaz nukleové kyseliny – zpravidla jen průkaz ve vzorku
 - Pokus na zvířeti – zpravidla průkaz ve vzorku
- Nepřímé metody (protilátky)

Pojem kolonie



- Kolonie je **útvár na povrchu pevné půdy**. Pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- V některých případech můžeme z počtu kolonií **odhadnout počet mikrobů** ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonii tvořících jednotek“ (CFU)
- Popis kolonií má významné místo v diagnostice

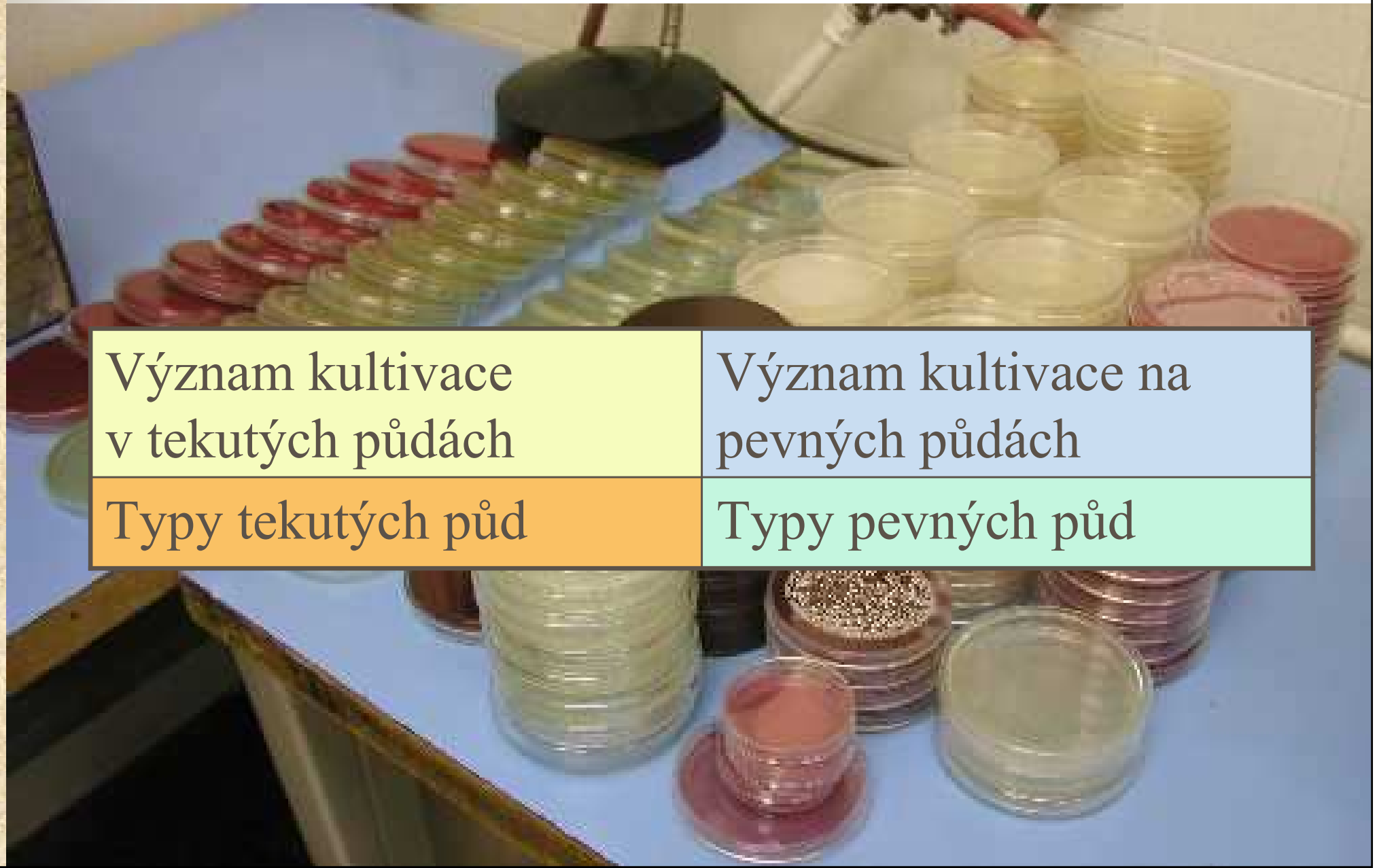
Praktická kultivace

Význam kultivace
v tekutých půdách

Typy tekutých půd

Význam kultivace na
pevných půdách

Typy pevných půd



Kultivační podmínky – opakování

- Pro kultivaci bakterií jsou nutné určité **podmínky**
- Nestačí takové, aby bakterie **přežívala**. Musí být i schopna se **množit**
- Podmínky musí být splněny, co se týče **teploty, pH, koncentrace solí** a mnoha dalších věcí. Některé jsou dány nastavením termostatu, jiné složením kultivační půdy.
- Nepůsobí přitom jednotlivě, **kombinují se**



Konkrétní kultivační podmínky klinicky významných bakterií

- Většinou vyžadují teplotu kolem 37 °C, ovšem při různě širokém rozmezí.
 - Ale bakterie původem z vnějšího prostředí preferují nižší teploty, ptačí patogeny naopak vyšší (ptáci mají vyšší teplotu těla)
- Většinou vyžadují koncentrace solí odpovídající fyziologickému roztoku
 - Ale bakterie zvyklé žít na zpoceně kůži snášejí i vysoké koncentrace soli.
- Většinou vyžadují pH kolem sedmi
 - Ale helikobakter, zvyklý žít v žaludku, snese i mnohem nižší pH.



Je to dobře, nebo špatně, že různé bakterie jsou různě náročné?

- Je to špatně, protože se špatně definují podmínky, které by vyhověli většině (neřkuli všem) klinicky významným bakteriím
- Je to dobře, protože díky tomu můžeme i kultivaci využít v diagnostice (např. schopnost růst na půdě s 10 % NaCl dobře odliší stafylokoky



Půdy obecně versus půdy v klinické mikrobiologii

- V průmyslové mikrobiologii či v některých jiných aplikacích se zpravidla používají chemicky přesně definované půdy. Víme, kolik je v nich čeho, a můžeme taky sledovat, kolik čeho přibylo nebo ubylo.
- V klinické mikrobiologii nepotřebujeme vědět přesné složení. Často i složky půd jsou nedefinované (krvinky, extrakt z kvasnic).

Tekuté půdy a pevné půdy

- Základem **tekutých půd** je masopeptonový bujon (hovězí vývar + bílkovinný hydrolyzát). Používají se především k pomnožení. Výsledek se špatně hodnotí: v podstatě jen čirý bujon / zakalený bujon (roste /neroste)
- Základem většiny **pevných půd** je tentýž bujon, ale doplněný výtažkem z agarové řasy. Bakterie na pevných půdách rostou pomaleji, ale zato velmi rozmanitě, a lze je rozočkovat.

Různé vzorky – různá kultivace

- Jak ovlivňuje typ vzorku typ kultivace?
 - Vzorky, kde **je obvykle málo mikrobů** se dávají jen do tekutých půd, kde se mikroby rychle pomnoží. **Příklad: výtěr ze spojivkového vaku**
 - Vzorky, kde **může být hodně i málo mikrobů a i málo mikrobů je významných** očkujeme na pevné i tekuté půdy. **Příklad: stěry z ran**
 - Vzorky, kde **je většinou hodně mikrobů, popř. i fyziologická běžná flóra** se očkují pouze na pevné půdy. **Příklad: výtěry z krku**



Pro připomenutí:

Pojmy vzorek a kmen

- Vzorek je to, co se odebírá pacientovi. Vzorek obsahuje buňky makroorganismu, různý počet druhů mikrobů (nula až třeba dvacet) a další příměsi
- Kmen – izolát – je populace jedné bakterie, izolovaná ze vzorku na pevné půdě
- Abychom získali kmen, musíme bakterii pěstovat na **pevné půdě** a dobře rozočkovat

Nejdříve si ale probereme půdy tekuté, i když jimi kmen nezískáme...

Tekuté půdy



Rozdělení tekutých půd

- Tekuté půdy mnoho kategorií nemají. Vlastně jen dvě:
- Půdy pomnožovací jsou nejběžnější a univerzální. Příkladem je **bujón** pro aerobní kultivaci a **VL-bujón** pro anaerobní kultivaci (VL = viande-levure, z francouzštiny – obsahuje masokvasničný extrakt)
- Půdy selektivně pomnožovací mají za úkol pomnožit určitou bakterii a potlačit množení jiných. Příkladem je **selenitový bujón** pro salmonely



Pevné pudy

Pevné (agarové) půdy

- Abychom využili všech výhod, které pevné půdy nabízejí, musíme vzorek (kultivace vzorek → kmen), ale i kmen (kultivace kmen → kmen) dobře rozočkovat. Klasickým způsobem rozočkování je tzv. **křížový roztěr**. V praxi se zpravidla natře např. na polovinu misky tamponem a pak se rozočkovává kličkou. Někdy se ještě doplňují různé čáry a disky – o nich jindy.

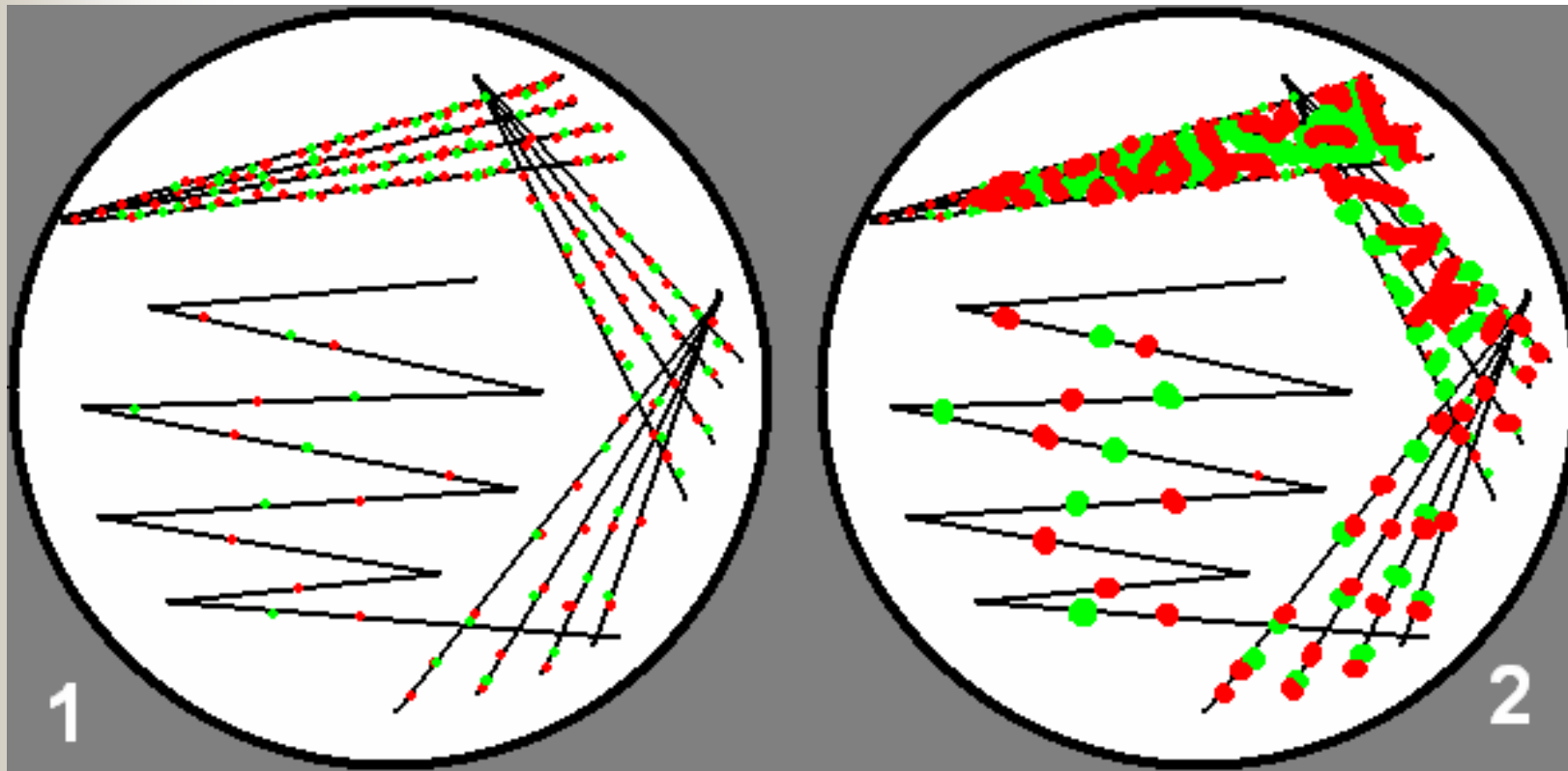


Proč je potřeba mít izolované kolonie

- Protože jen v tom případě **lze identifikovat větší počet patogenů**, které jsou ve směsi
- Ale také proto, že **pouze jednotlivé kolonie umožňují pozorovat typické vlastnosti kolonie.**

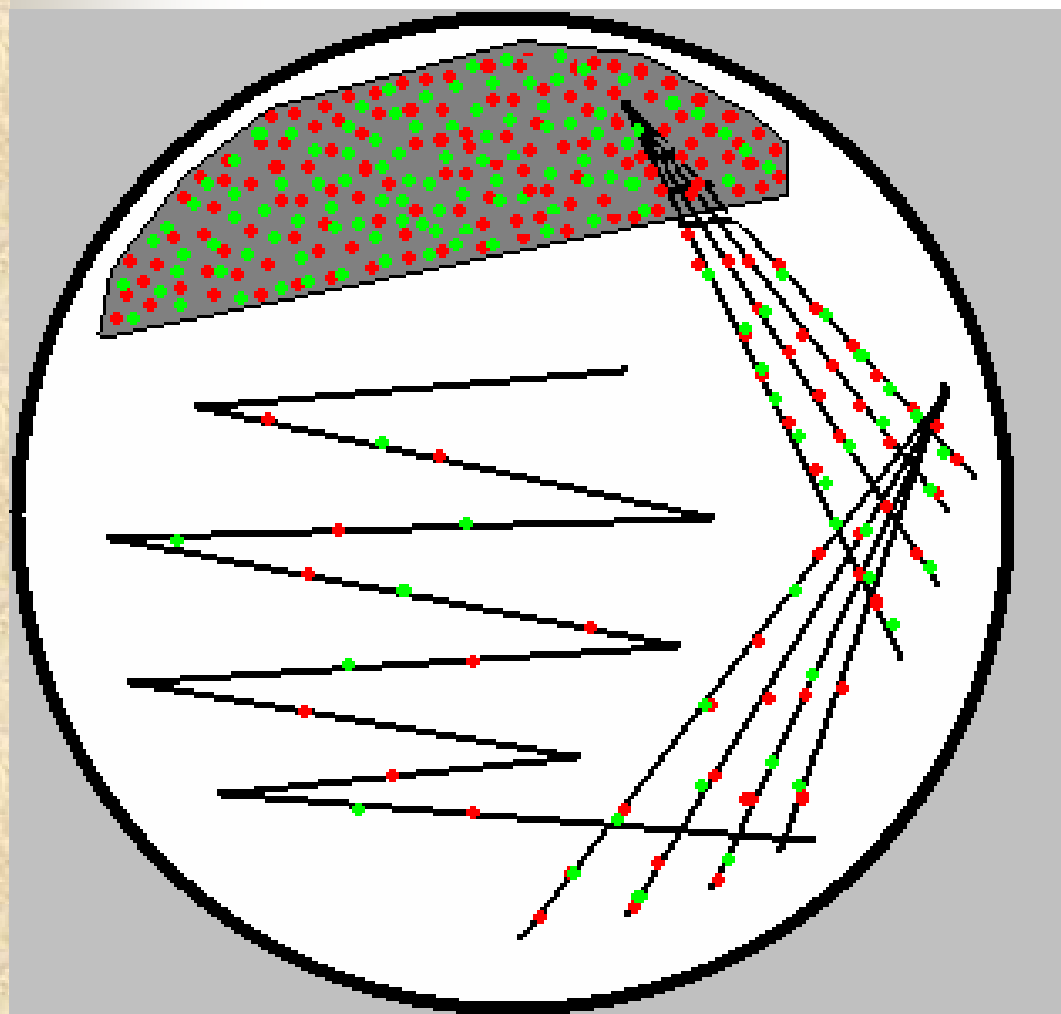
Sebelepší klaun vám nepředvede nic ze svého umění, držíte-li ho v kamrlíku nahečmaného na spoustu dalších klaunů.

V případě směsi vytvoří každá bakterie svoje kolonie (při dobrém rozočkování)



1 – očkování směsi bakterií (naznačeny tečkami), 2 – výsledek kultivace: v prvních úsecích směs, až na konci izolované kolonie

Postup očkování vzorku

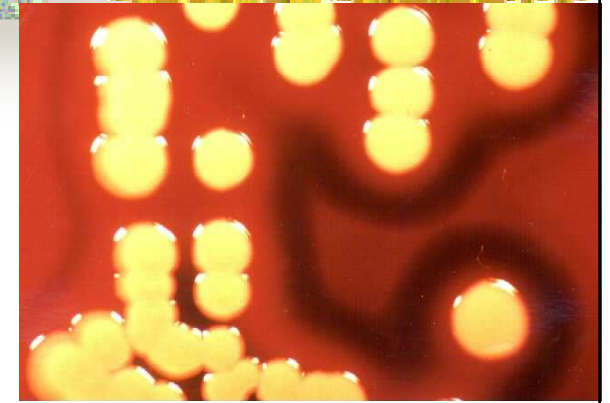


Vzorek se nanese na menší či větší plochu, a pak se rozočkovává jako při přeočkování kmene

Výtěr z krku – reálný výsledek



Pojem kolonie (opakování)



- Kolonie je **útvár na povrchu pevné půdy**. Pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- V některých případech můžeme z počtu kolonií **odhadnout počet mikrobů** ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonii tvořících jednotek“ (CFU)
- Popis kolonií má významné místo v diagnostice



Co lze popisovat u kolonií

- Velikost
- Barva
- Tvar (okrouhlý...)
- Profil (vypouklý...)
- Okraje (výběžky..)
- Povrch (hladký, drsný)
- Konzistence (suchá...)
- Průhlednost
- Vůně/zápach
- Okolí kolonie*

*Přesný význam tohoto pojmu záleží na druhu půdy. Například u půd s krvinkami se hodnotí narušení krvinek v okolí kolonie

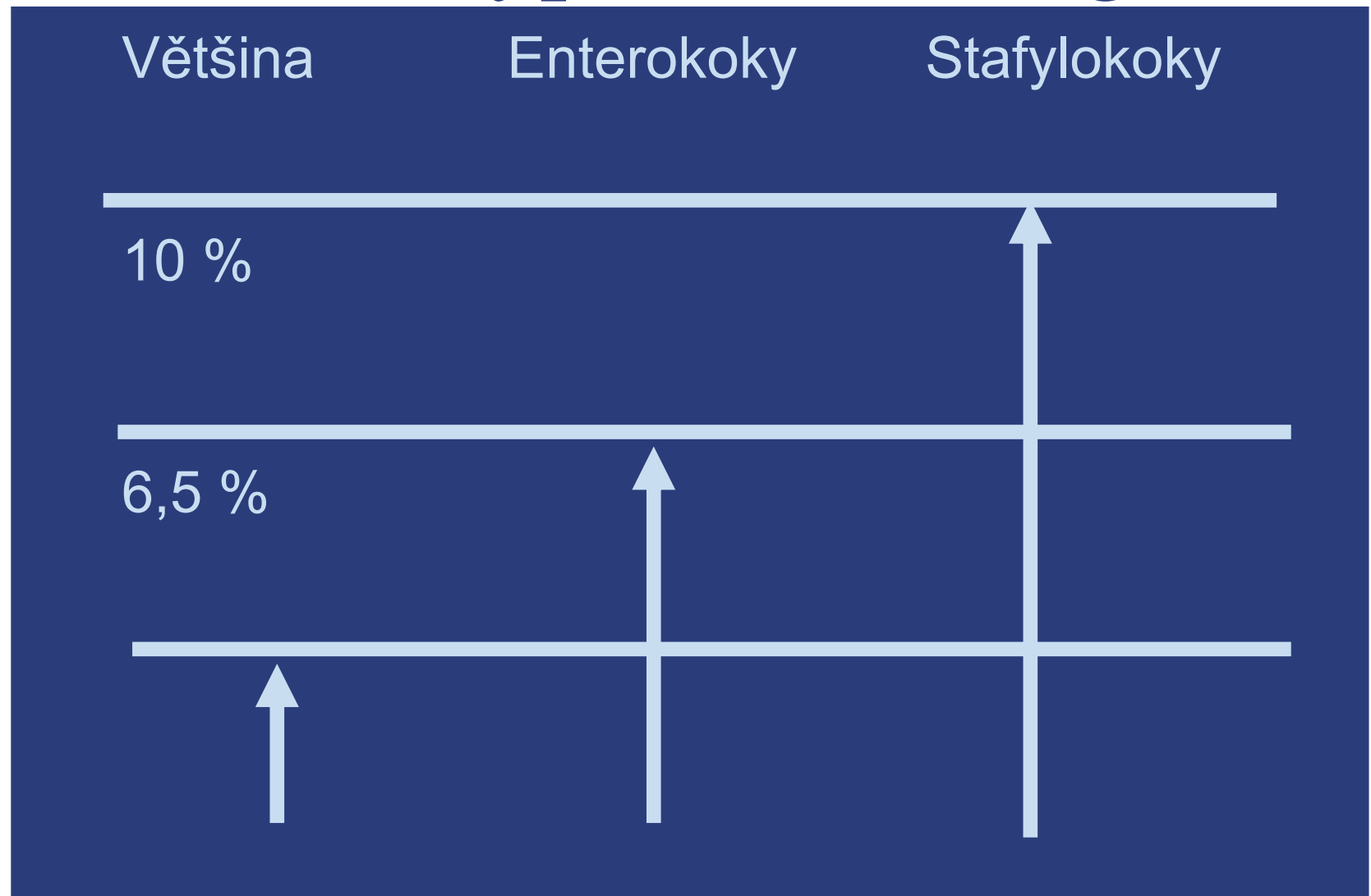
Pevné selektivní půdy



Ilustrační foto: krystalky NaCl

- Účelem je selektovat (vydělit) ze směsi bakterií pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je agar pro stafylokoky s 10 % NaCl
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika. Krevní agar s amikacinem je selektivní pro streptokoky a enterokoky

Selektivita hypersolného agaru



Půdy diagnostické

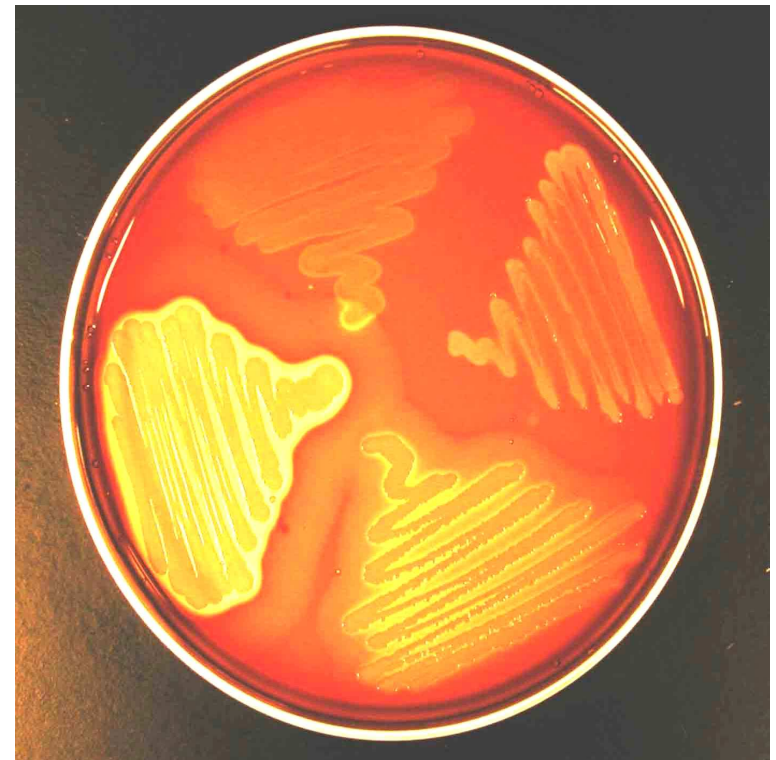
- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení rozlišují mikroby podle určité vlastnosti
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)
- Zvláštním případem půdy chromogenní a fluorogenní



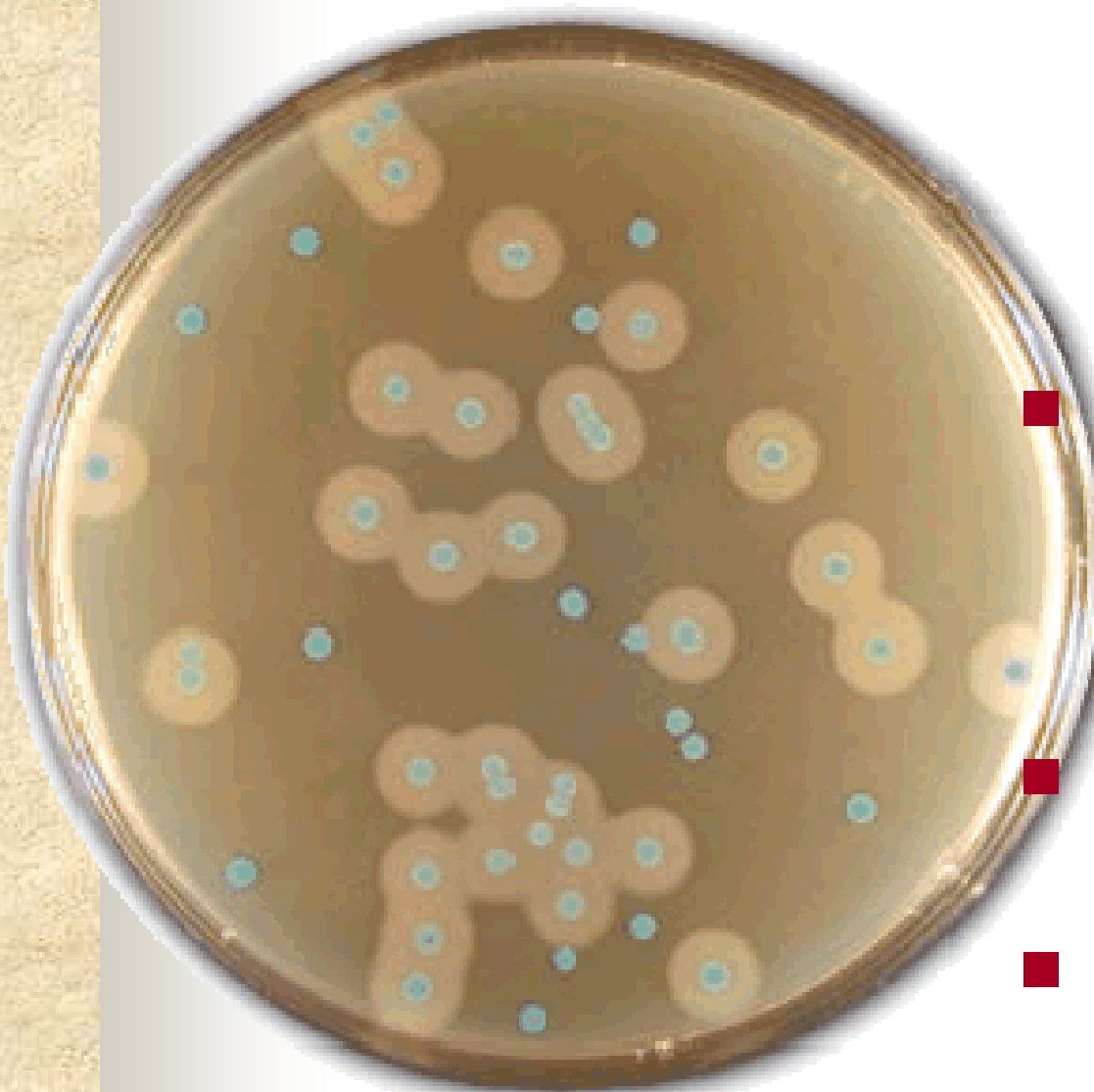
Půdy s krví – základ klinické mikrobiologie

- Všechny půdy s krvinkami (krevní agar, VL krevní agar, agar s pranými erytrocyty apod. – netýká se ale krevního agaru s 10 % NaCl, kde jsou krvinky lyzovány) jsou schopny rozlišit:

- Úplnou hemolýzu
- Částečnou hemolýzu
- Nepřítomnost hemolýzy
- Viridaci (zezelenání)



Půdy chromogenní a fluorogenní



- Chromogenní půdy obsahují barvivo, na které je navázaný specifický substrát → barevnost se ztrácí, není to už barvivo, ale chromogen
- Bakterie schopná štěpit specifický substrát změní chromogen zpět na původní barvivo
- Půda může obsahovat i více chromogenů (pro více druhů)
- Fluorogenní půdy podobné, s fluorescenčním barvivem

Ukázka chromogenní půdy na kvasinky



Čtyři různé kvasinky rostou v typických koloniích – jedna v zelených, jedna v modrých, jedna v suchých růžových a jedna v hladkých růžových. Ostatní druhy kvasinek jsou na této půdě bílé.



Princip chromogenní půdy

...substrát je o



Chromofor

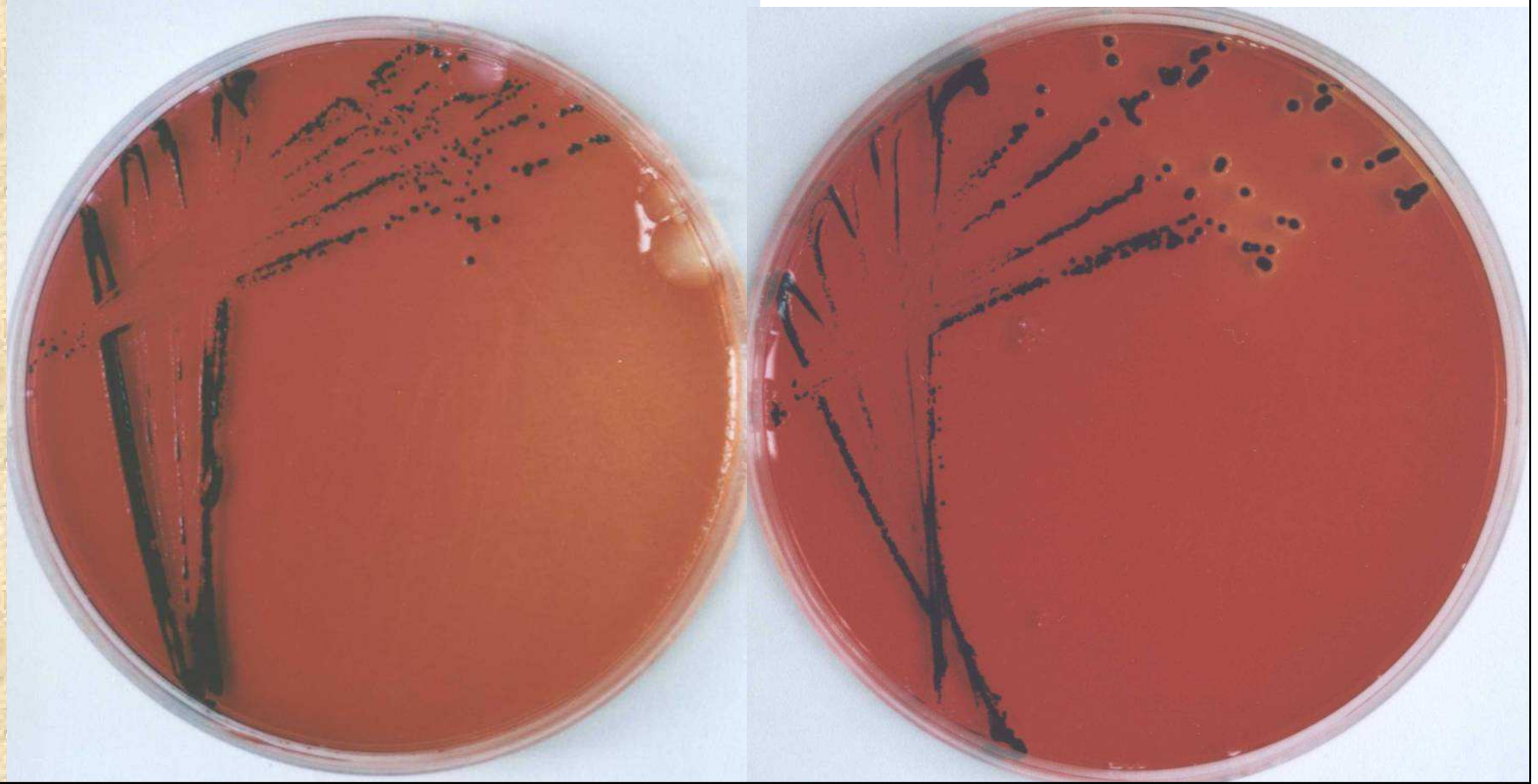
The diagram shows a large white oval representing a cell or organelle. Inside the oval, there is a smaller white circle in the upper right quadrant. In the lower right quadrant, there is a white rectangular box containing the word 'Chromofor' in green text. The entire diagram is set against a dark blue background.

Půdy selektivně diagnostické

- Kombinují v sobě selektivní a diagnostické vlastnosti
- Příkladem **půda Endova**:
 - Rostou pouze některé G-bakterie (selektivita)
 - Ty, co rostou, lze rozlišit na laktóza pozitivní (červené) a negativní (bledé)
- Podobná je **půda McConkeyho**, ve světě běžnější
- Selektivně diagnostické jsou i půdy **XLD**, **CIN** aj.



Půdy XLD a MAL na salmonely





XLD

MAL

Půdy selektivní, diagnostické a selektivně diagnostické – shrnutí

Půda selektivní	Kmen A neroste	Kmen B roste	
Půda diagnostická	Kmen C roste, má kolonie makové	Kmen D roste, má kolonie takové	
Půda selektivně diagnostická	Kmen E neroste	Kmen F roste, má kolonie makové	Kmen G roste, má kolonie takové

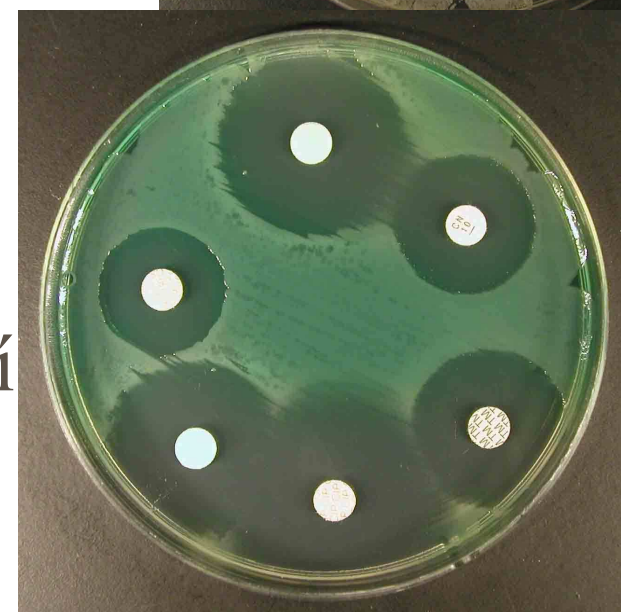
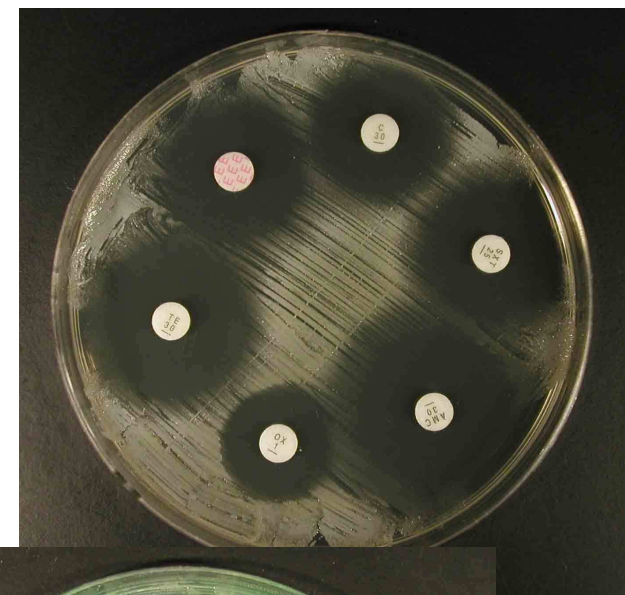
Půdy obohacené a selektivně obohacené



- Jsou určeny pro náročné mikroby
- Obsahují různé nutriční faktory
- Příkladem čokoládové a Levinthalovy agary pro neisserie a hemofily
- Mohou být **selektivně obohacené** (GC agar), tedy kombinace selektivity a obohacení

Půdy ke speciálním účelům

- Sledování faktorů virulence (žlutkový agar pro histotoxická klostridia, půda s kongočervení pro stafylokokový sliz)
- In vitro testování citlivosti na antimikrobiální látky: Müllerův-Hintonové agar; slouží zároveň ke sledování pigmentů bakterií



Poznámka

- V případě kultivačně náročných bakterií se i testování citlivosti provádí na obohacených půdách.





Současné trendy v kultivaci

- Navzdory rozvoji genetických metod si kultivace zachovává svou klíčovou úlohu při diagnostice zejména bakterií
- Standardizace nutí přecházet od půd vyráběných „na koleně“ k půdám komerčně vyráběným
- Chromogenní a fluorogenní půdy se i přes vyšší cenu zvolna prosazují

Pěstování anaerobních bakterií



Příště budeme
pokračovat
povídáním o
biochemické
identifikaci
bakterií

