

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“



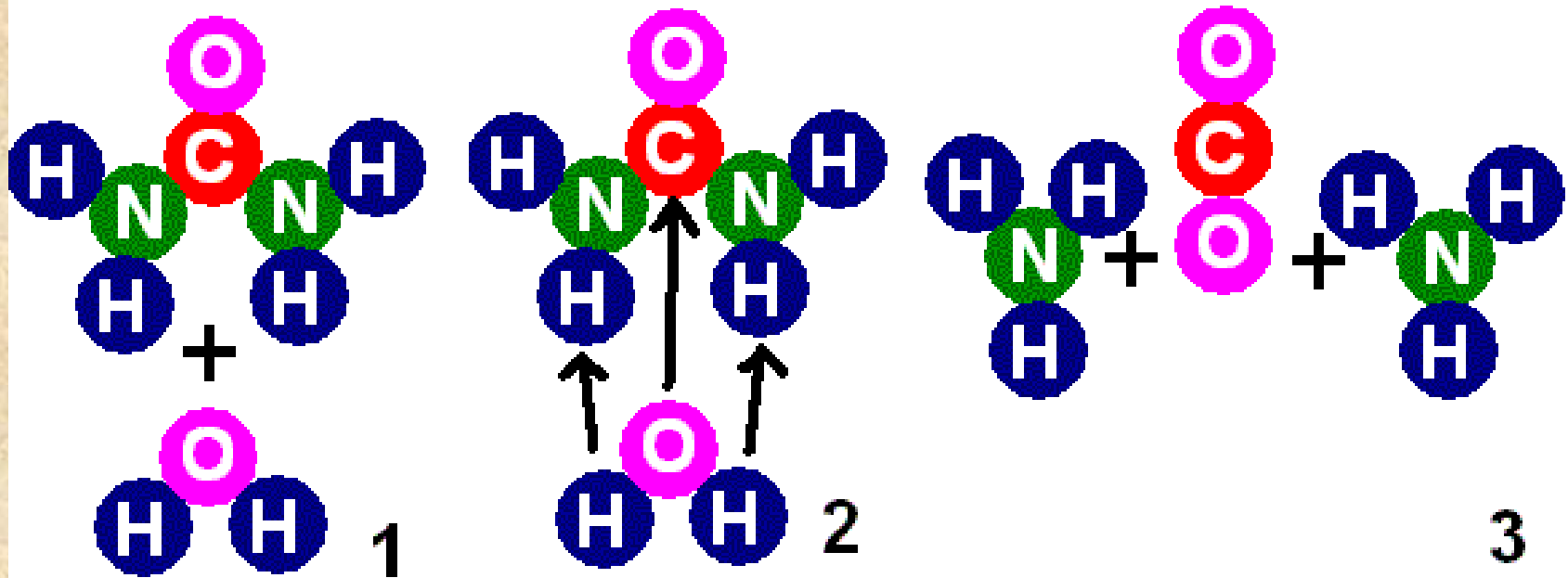
Fyziologie bakterií

- 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

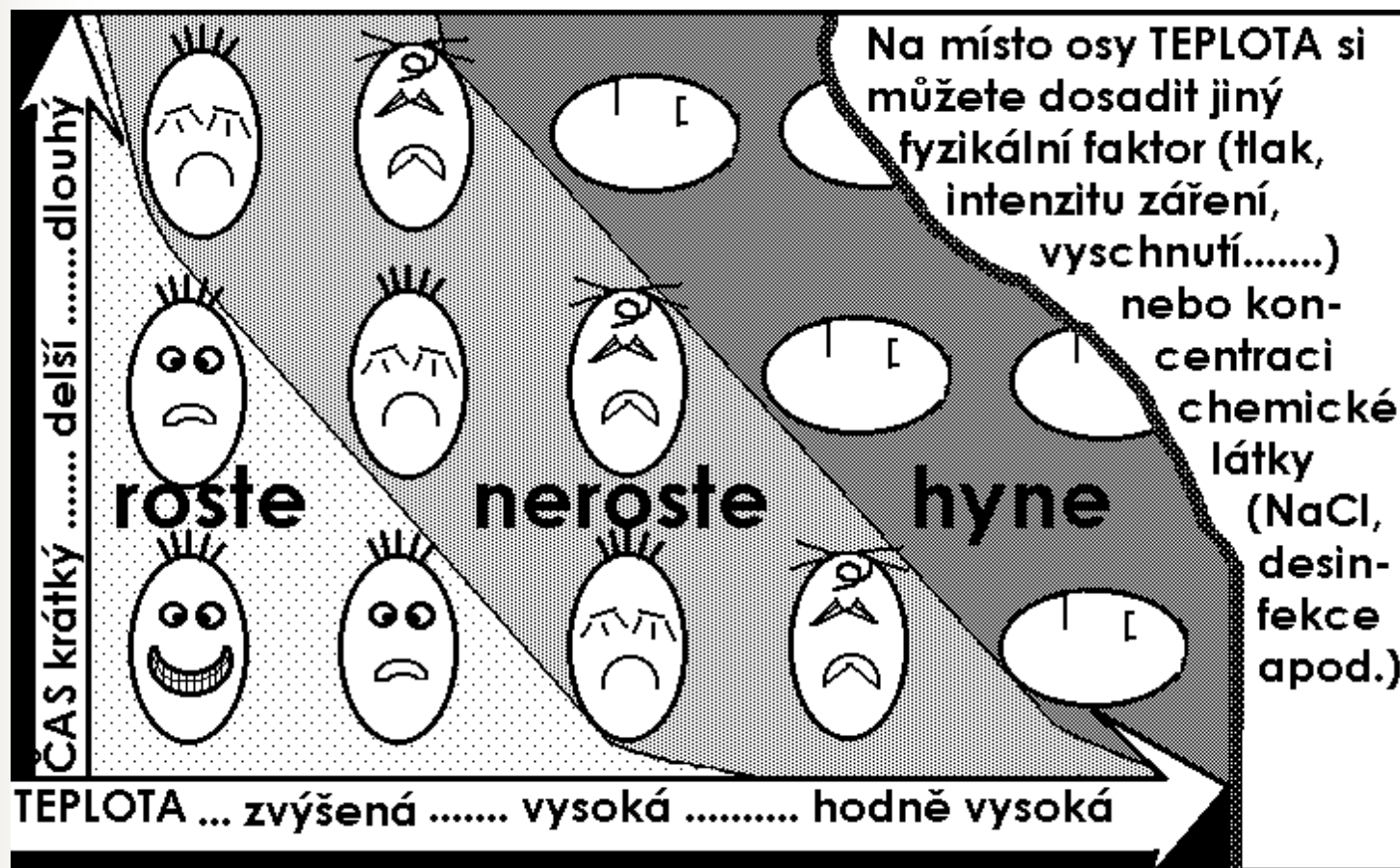




Podmínky

- 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

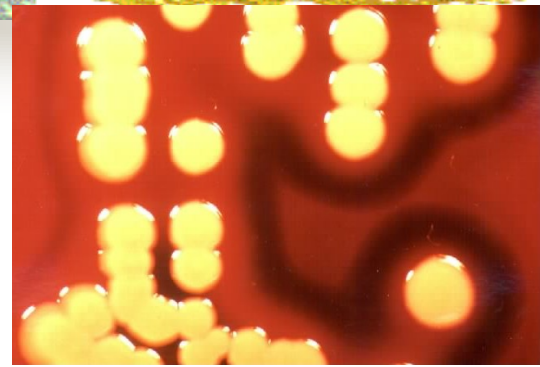
- Metody přímého průkazu
 - Přímý průkaz ve vzorku (pracujeme s celým vzorkem, například sputem, mozkomíšním mokem, močí apod.)
 - Identifikace kmene (pracujeme s jedním kmenem, který byl ze vzorku izolován)
- Metody nepřímého průkazu – spočívají v průkazu protilátek proti mikrobovi



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 „kolonií 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 zpcené 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

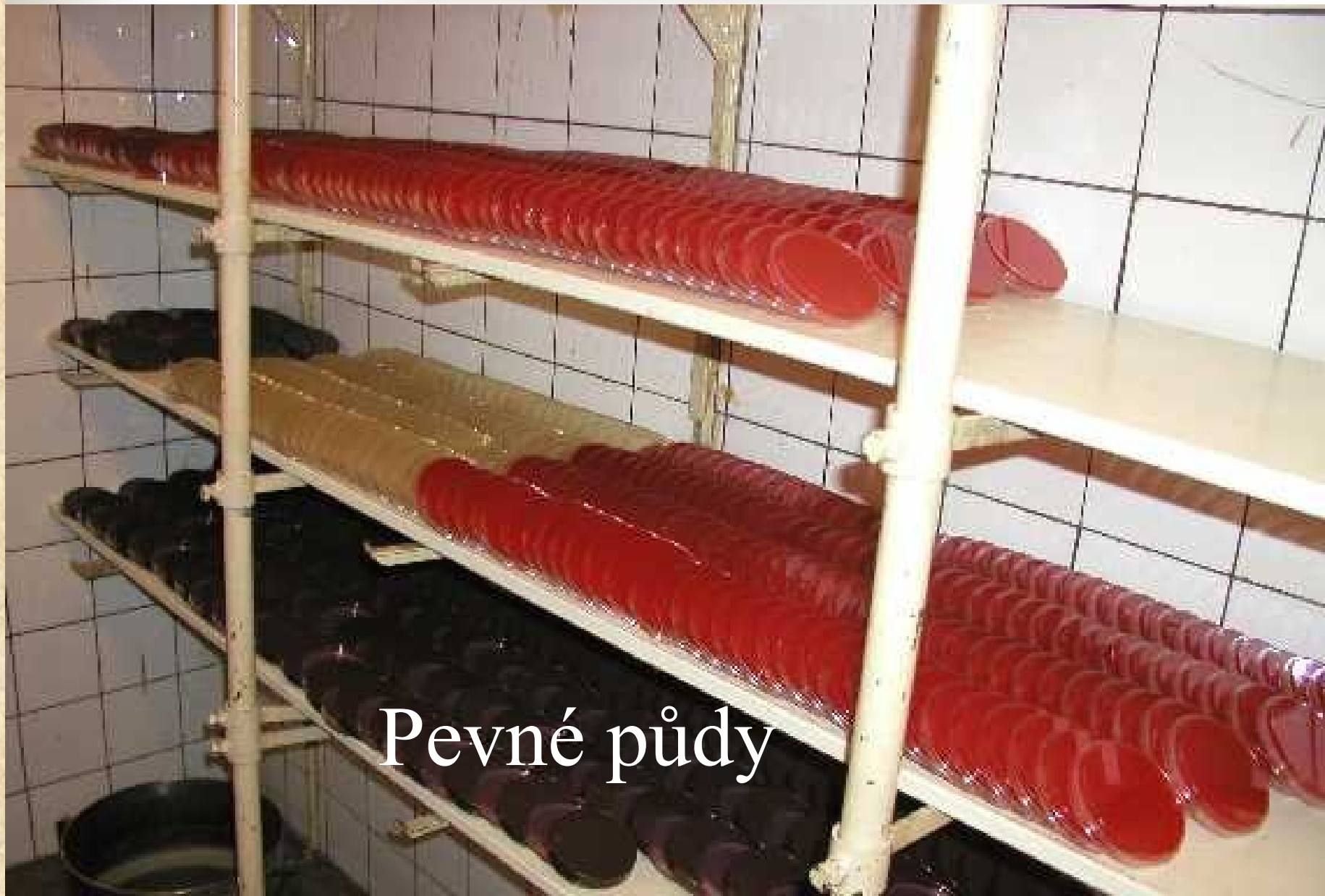
Nejdříve si ale probereme půdy tekuté, i když jimi kmen nezískáme...

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.

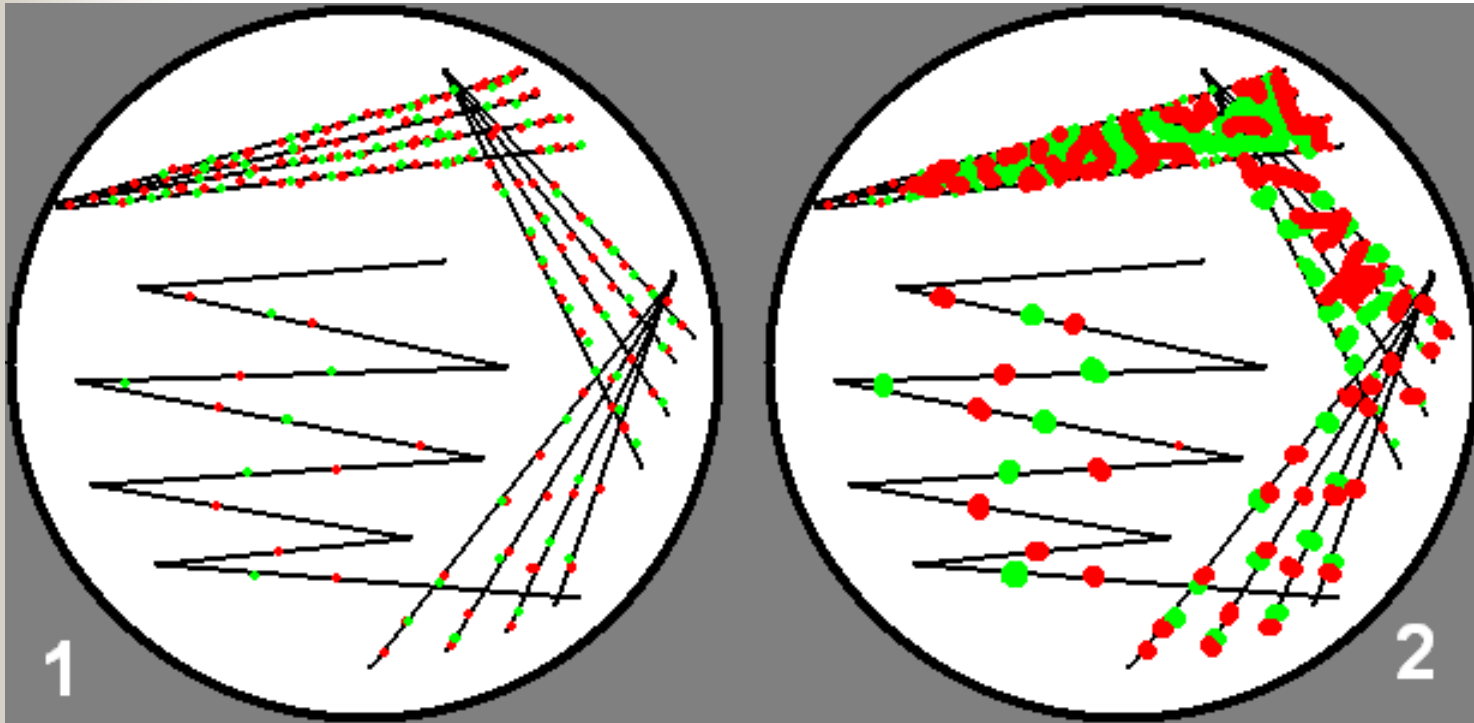


Proč je potřeba mít izolované kolonie

- 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**.

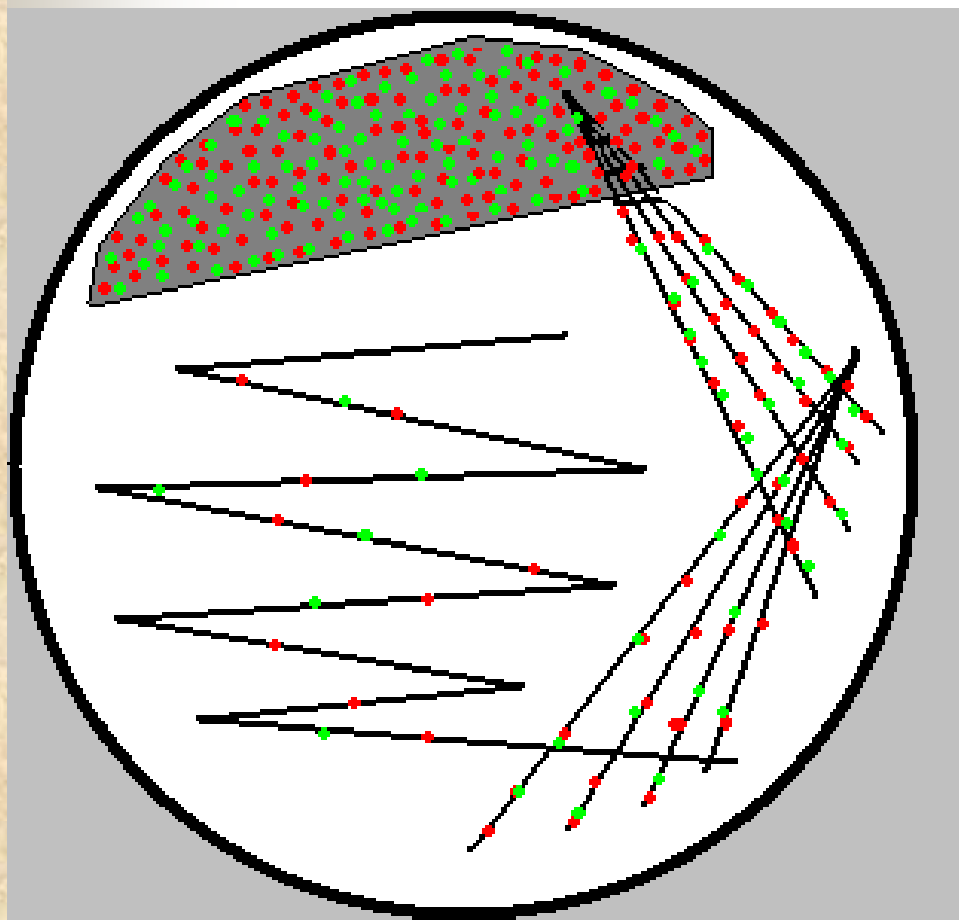
Sebelepší klaun vám nepředvede nic ze svého umění, držíte-li ho v kamrlíku nahečmaného na spoustu dalších klaunů.

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

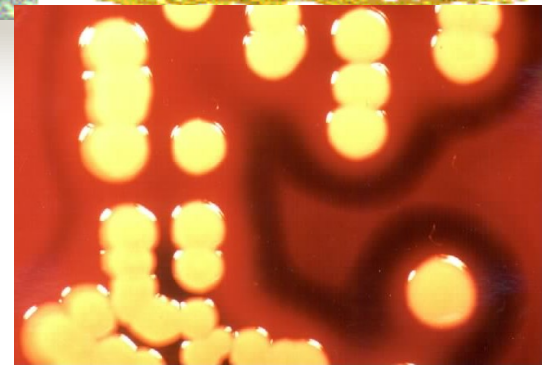


Vzorek se nanese na
menší či větší
plochu, a pak se
rozočkovává jako
při přeočkování
kmene

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

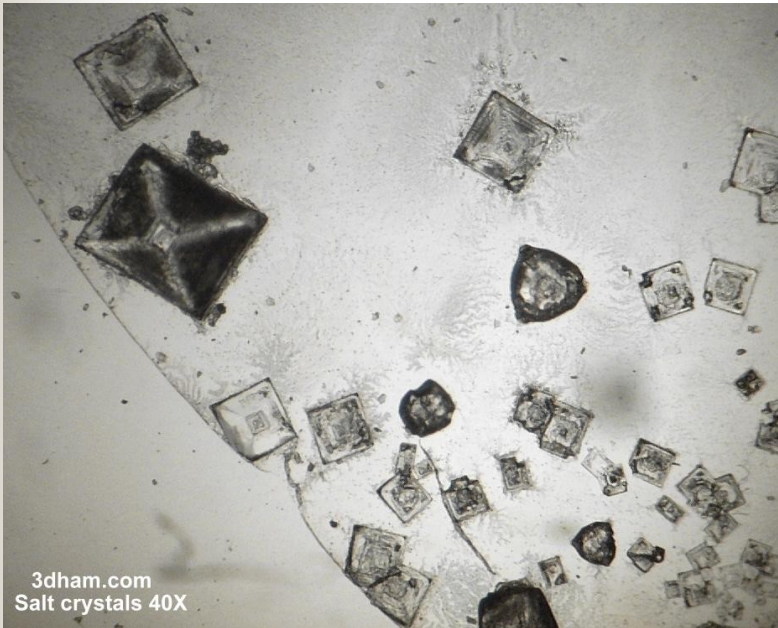
Co lze popisovat u kolonií

- 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

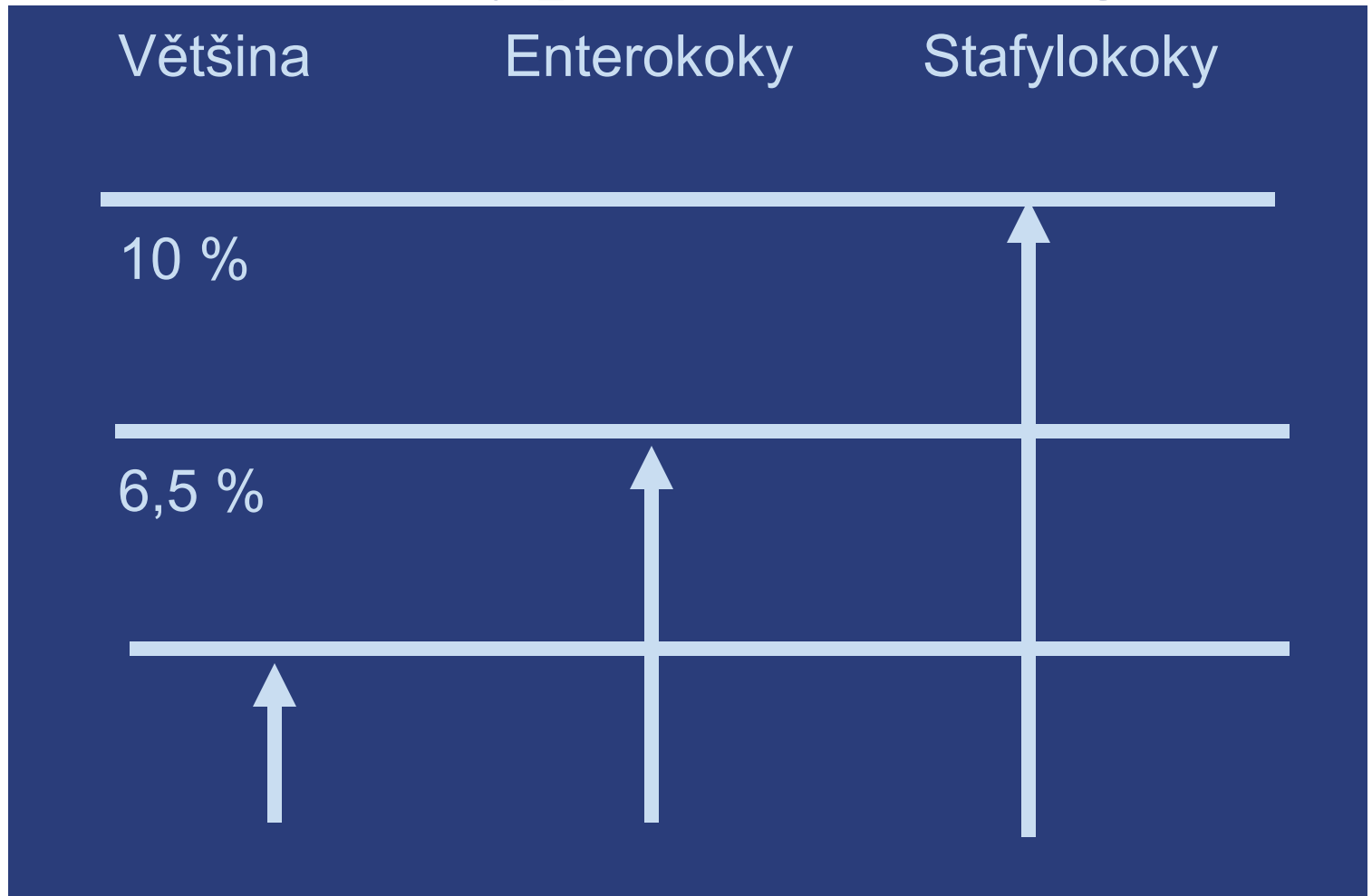
Pevné selektivní půdy

- 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



Ilustrační foto: krystalky NaCl

Selektivita hypersolného agaru



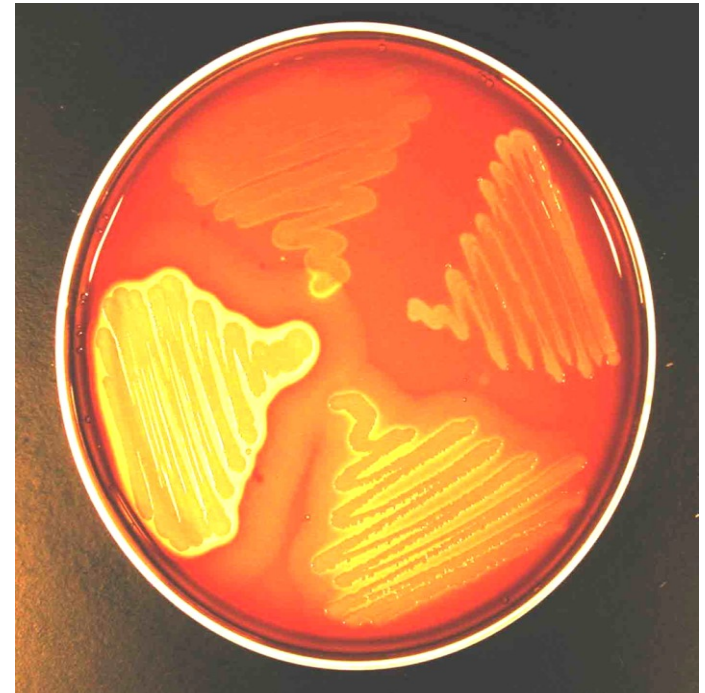
Půdy diagnostické

- 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



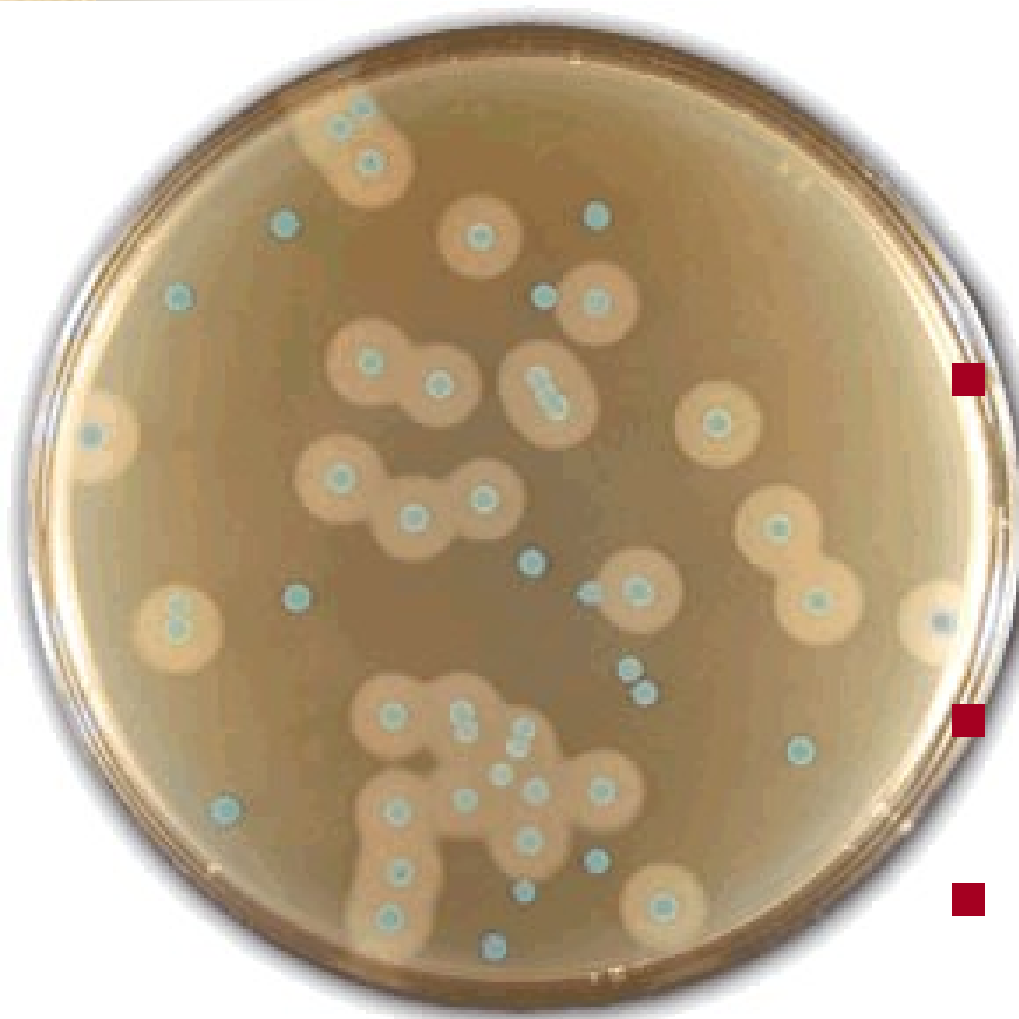
Půdy s krví – základ klinické mikrobiologie

- 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

A diagram of a cell, represented as a large white oval on a dark blue background. Inside the oval, there is a smaller white circle representing the nucleus. A white rectangular box is drawn around the nucleus, and the word "Chromofor" is written in green text inside this box. To the right of the nucleus, there are some white lines representing the cytoplasm or other organelles.

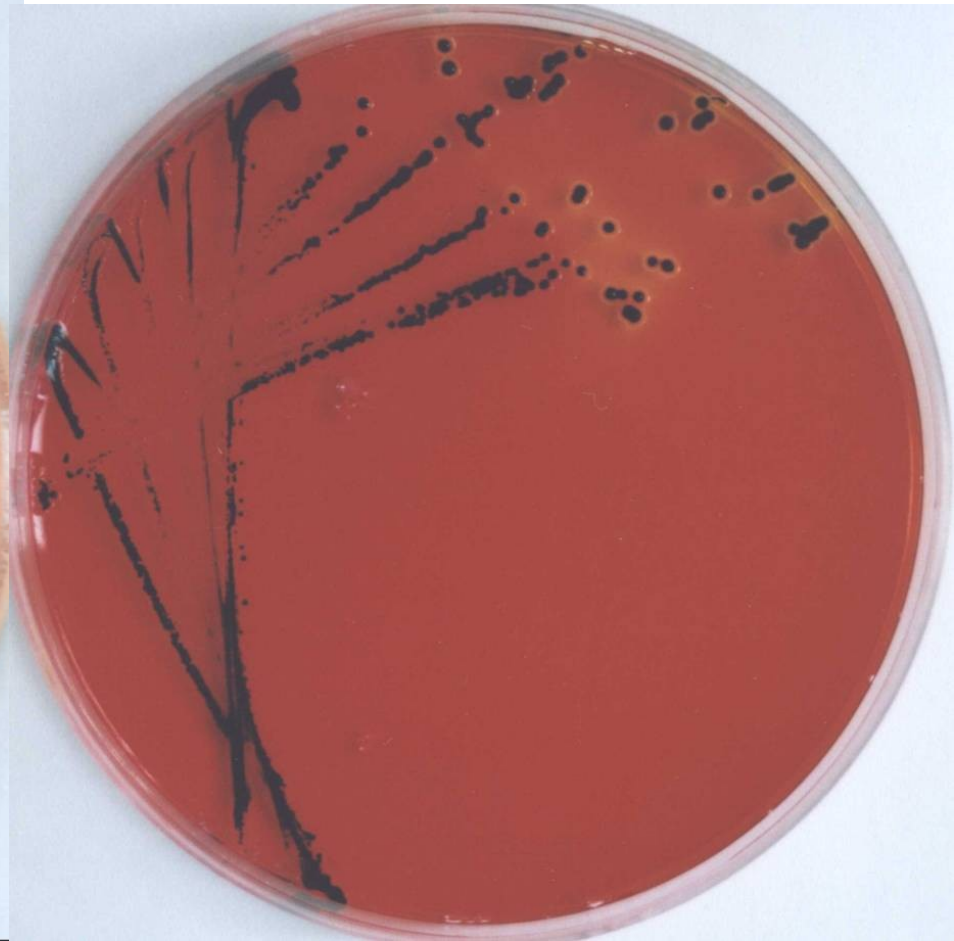
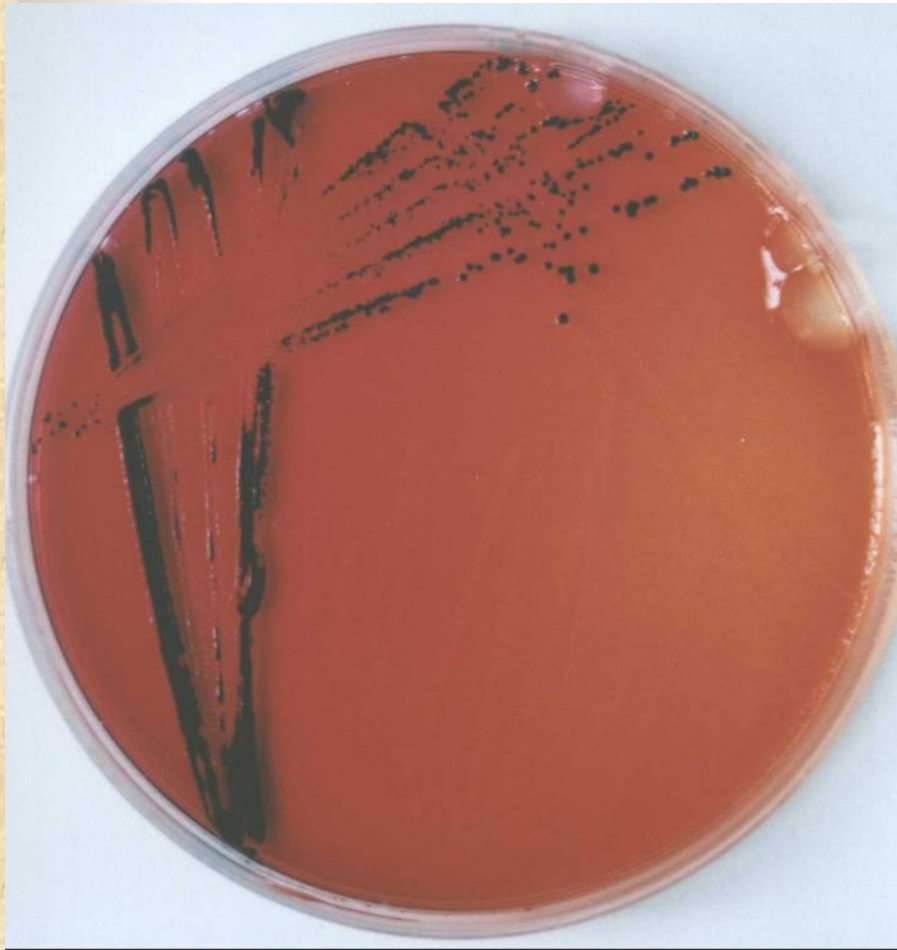
Chromofor

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

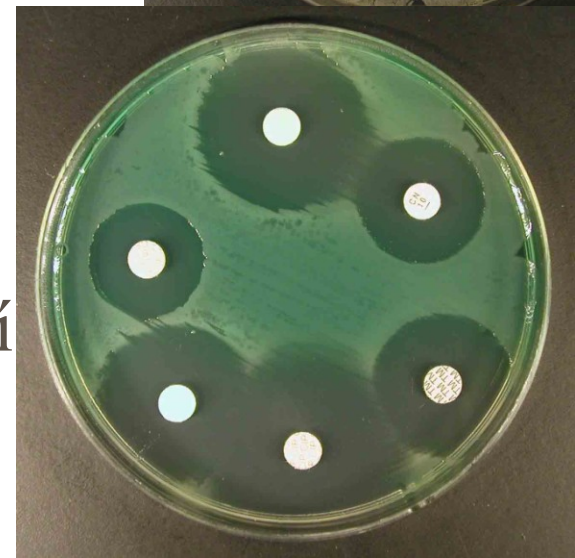
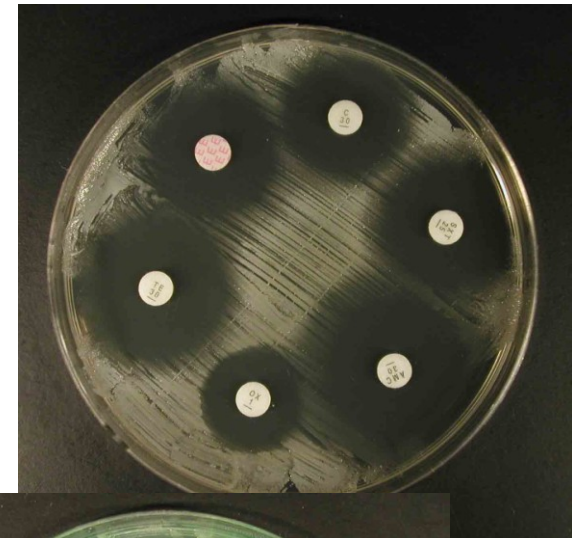
Půdy obohacené a selektivně obohacené

- 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

