

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL



Týden 4: Typy půd

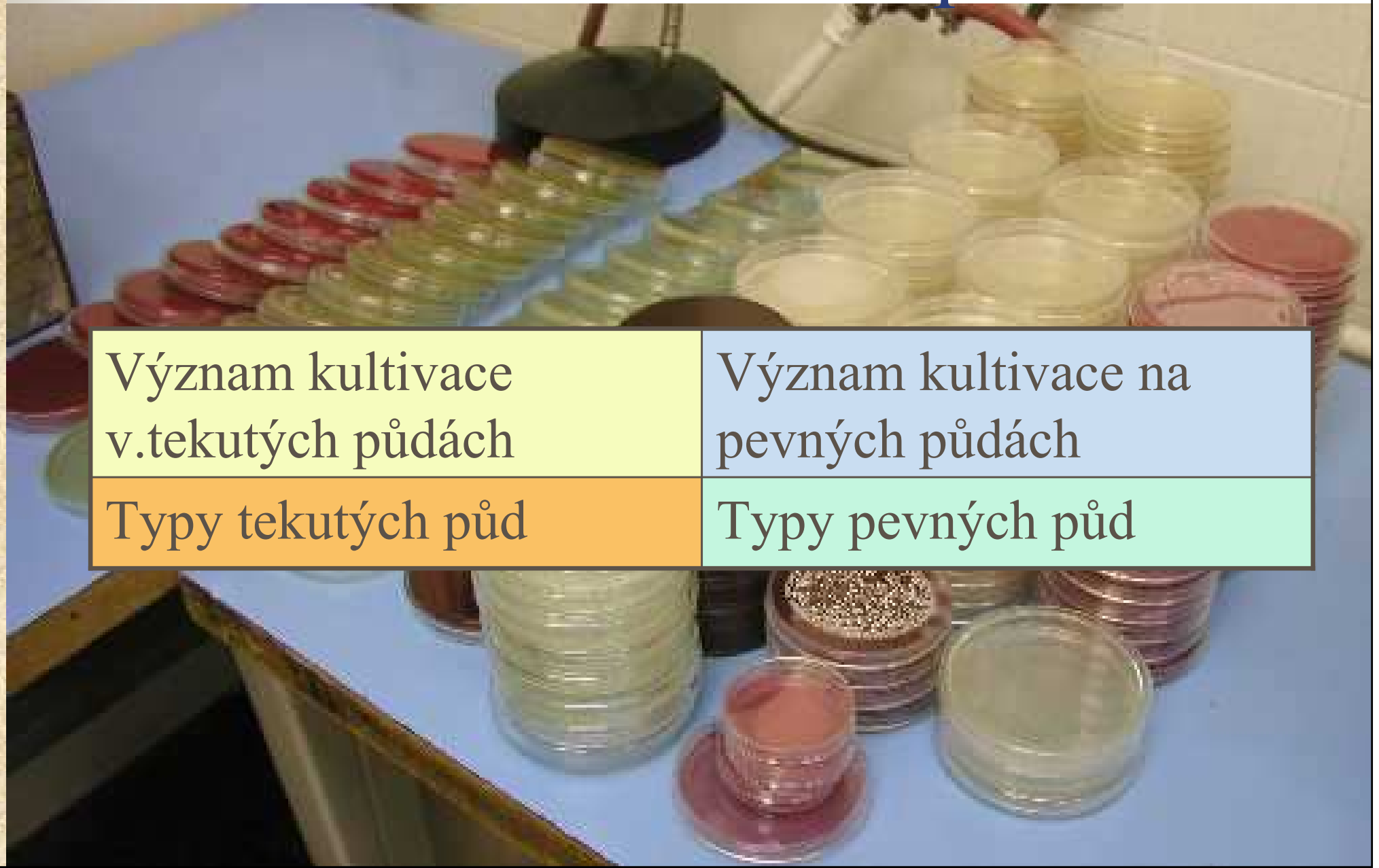
O čem si dnes budeme povídat

Význam kultivace
v.tekutých půdách

Typy tekutých půd

Význam kultivace na
pevných půdách

Typy pevných půd





Pro opakování: množení bakterií

- Každá bakterie má svou generační dobu
- Za jednu generační dobu jsou z jedné dvě, za desetinásobek je z jedné 1024 bakterií (teoreticky) a podobně
- Ideální množení by existovalo pouze kdybychom neusále přidávali živiny a popř. kyslík a odebírali odpadní produkty
- Tato tzv. kontinuální kultivace se používá v průmyslové mikrobiologii, ne v lékařské



Katabolismus trochu podrobněji

- Katabolismus může být trojí:
 - **Fermentace** – štěpení bez potřeby kyslíku. Málo energeticky výhodný, ale nepotřebuje kyslík. Produktem např. kyselina mléčná, etanol aod.
 - **Aerobní respirace** – z mála živin se získá hodně energie, je ale nutný kyslík. Produktem CO_2 a H_2O
 - **Anaerobní respirace** – jiný akceptor elektronů
- Fermentovat i respiračně odbourávat lze **různé substráty**. Pro různé bakterie existují typické substráty, které umějí fermentovat nebo respiračně obourávat.



Kultivační podmínky – opakování

- Pro kultivaci bakterií jsou nutné určité podmínky
- Nestačí takové, aby bakterie přeživala. 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



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.

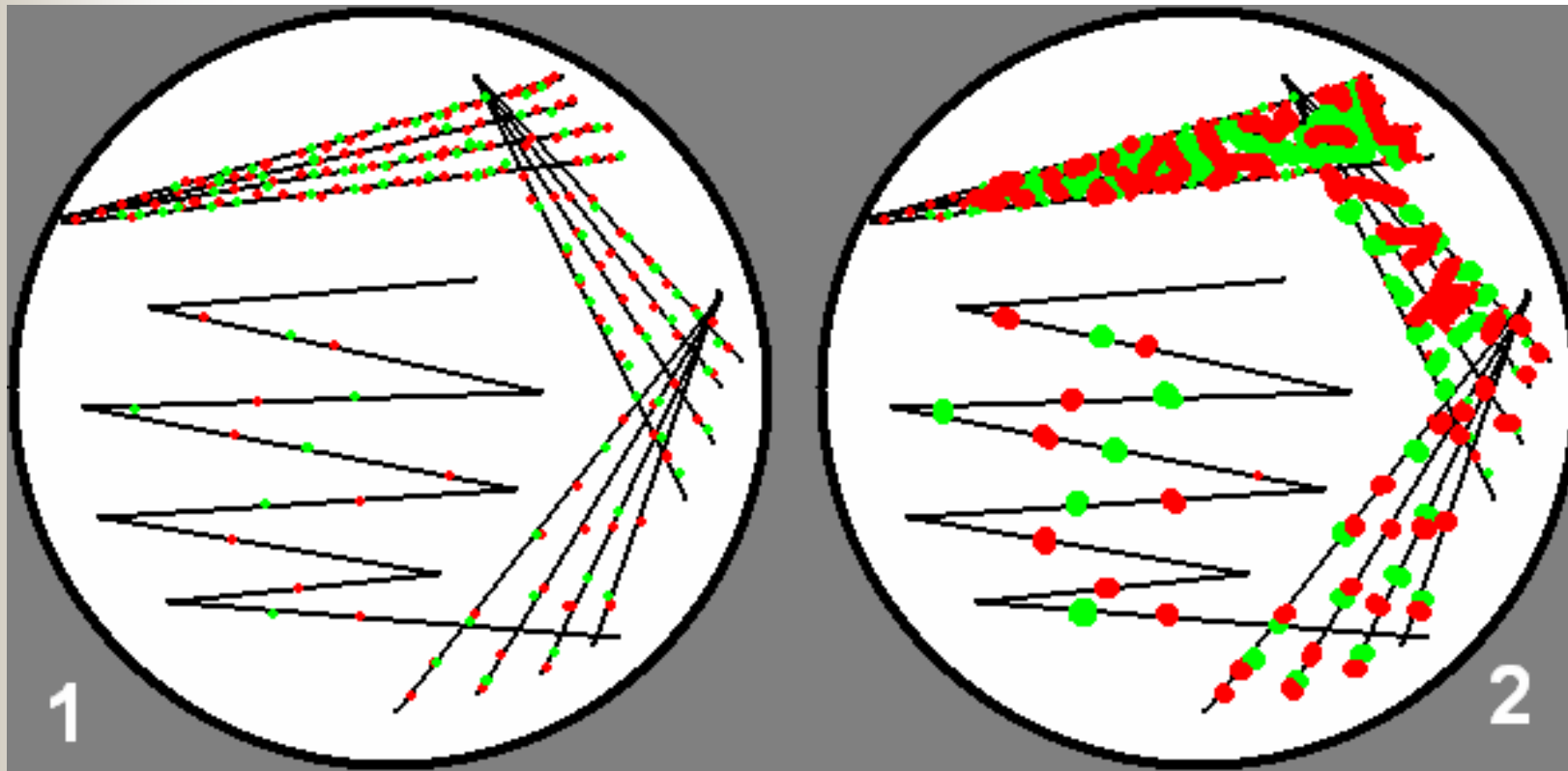


Proč je potřeba mít izolované kolonie

- 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.

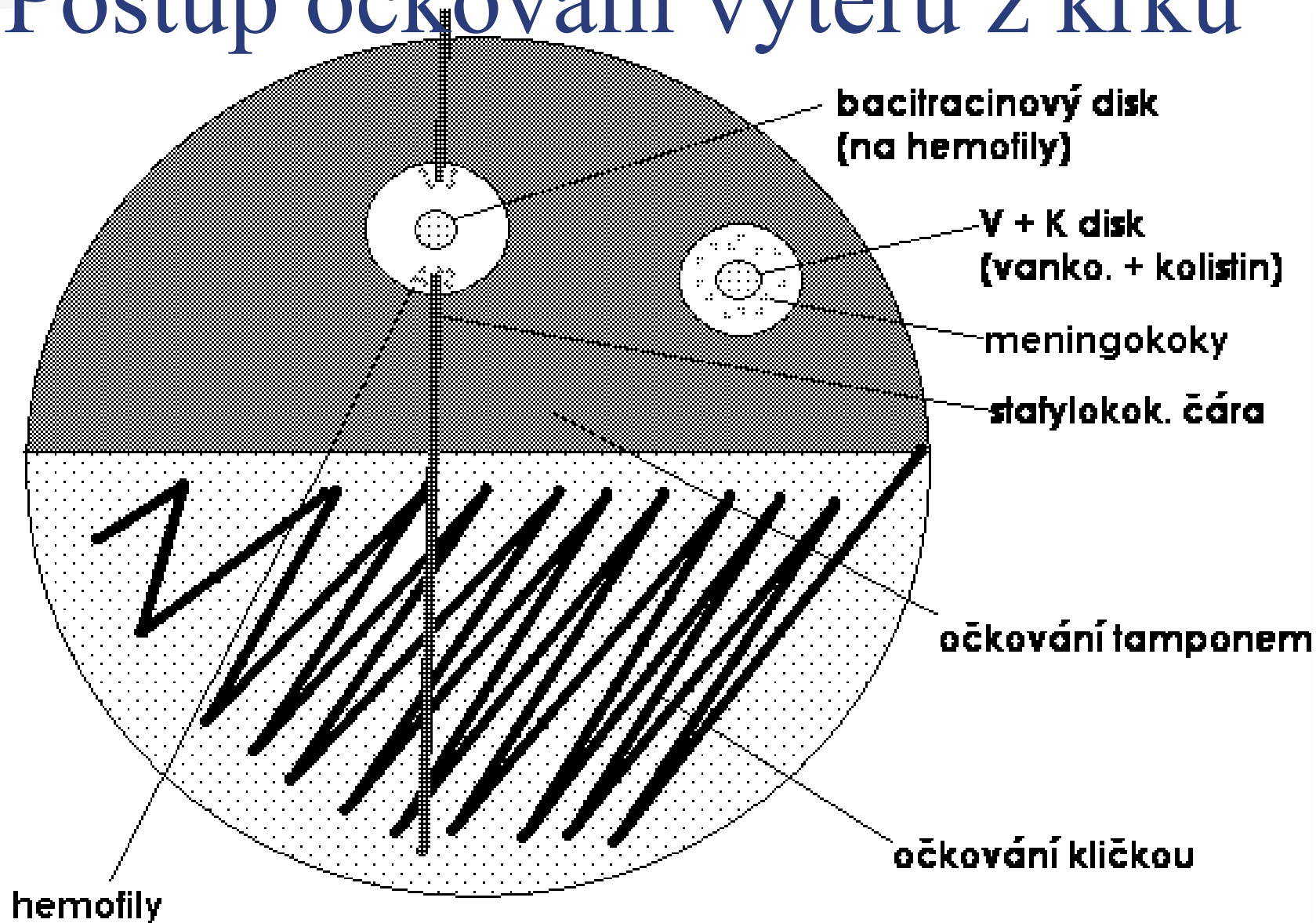
Sebelepší klaun vám nepředvede nic ze svého umění, držíte-li ho v kamrlíku nahečmaného na spoustu dalších klaunů.

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

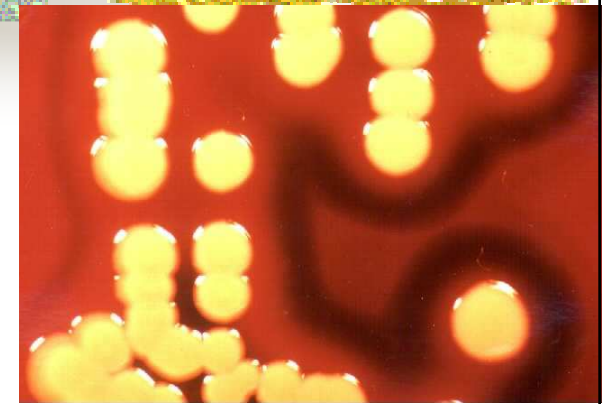
Postup očkování výtěru z krku



Výtěr z krku – reálný výsledek



Pojem kolonie (opakování)



- Kolonie je útvar 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

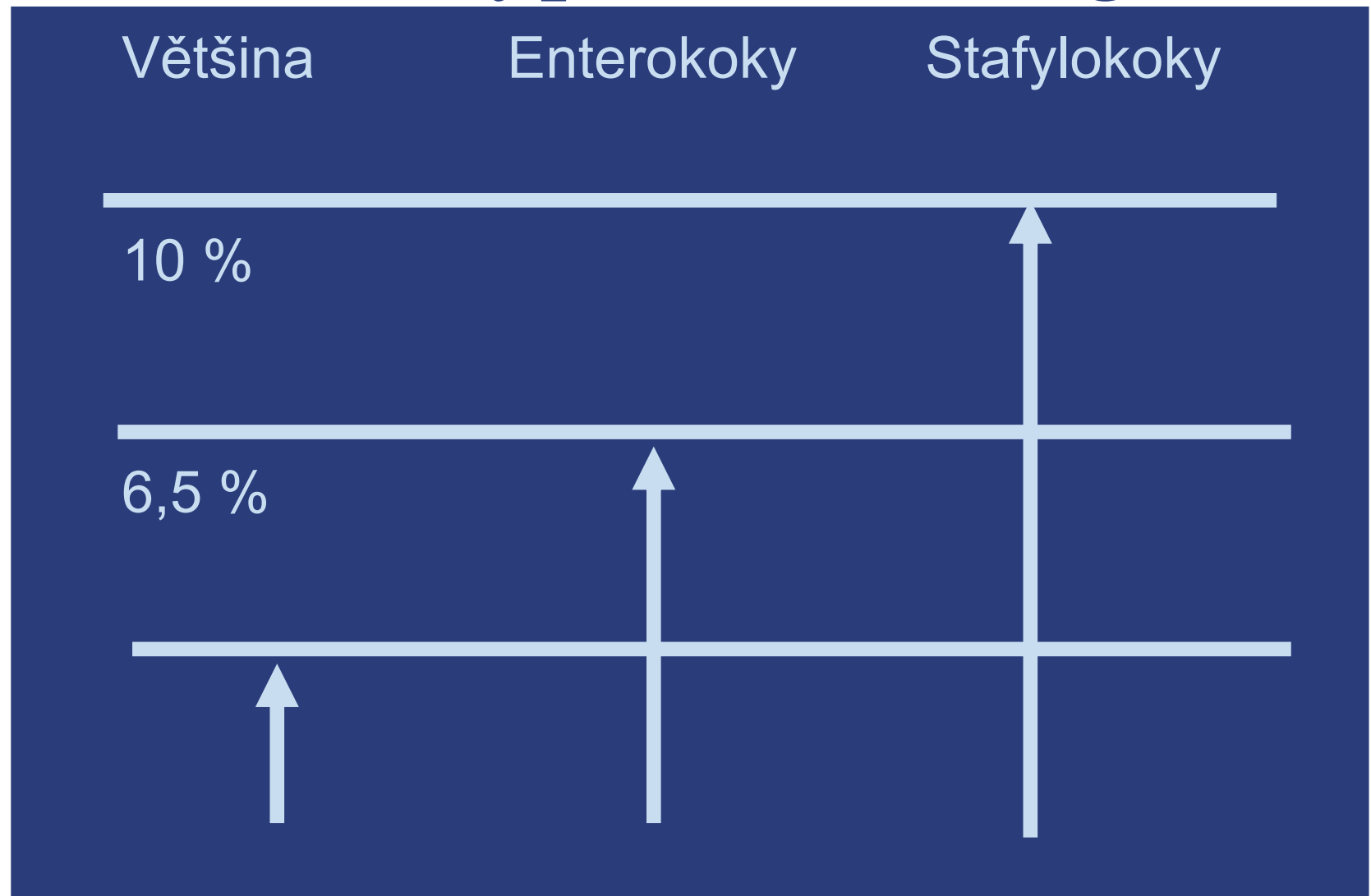
Pevné selektivní půdy



Ilustrační foto: krystalky NaCl

- Účelem je vyselektovat (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



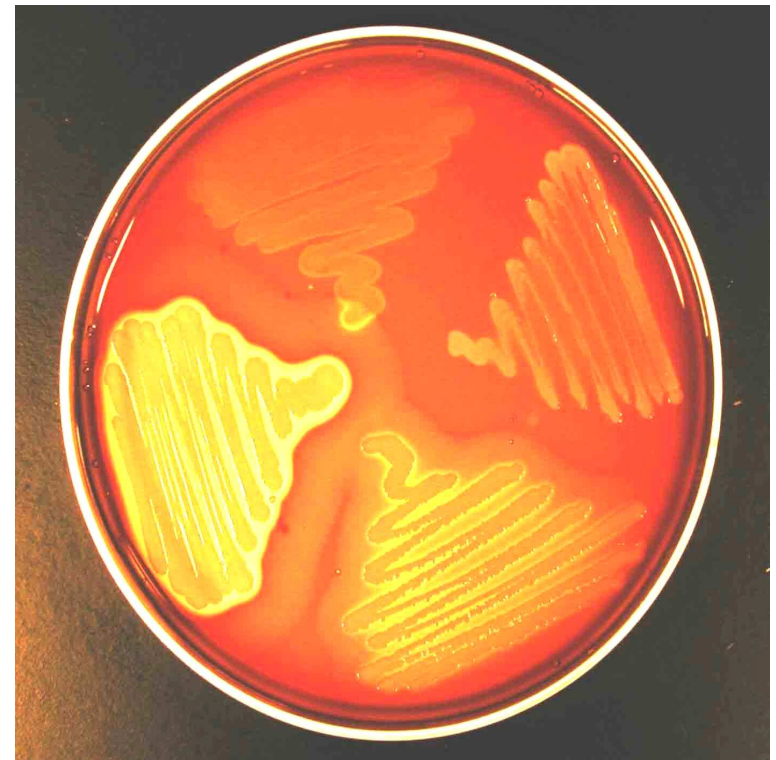
Půdy diagnostické

- 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 flurogenní

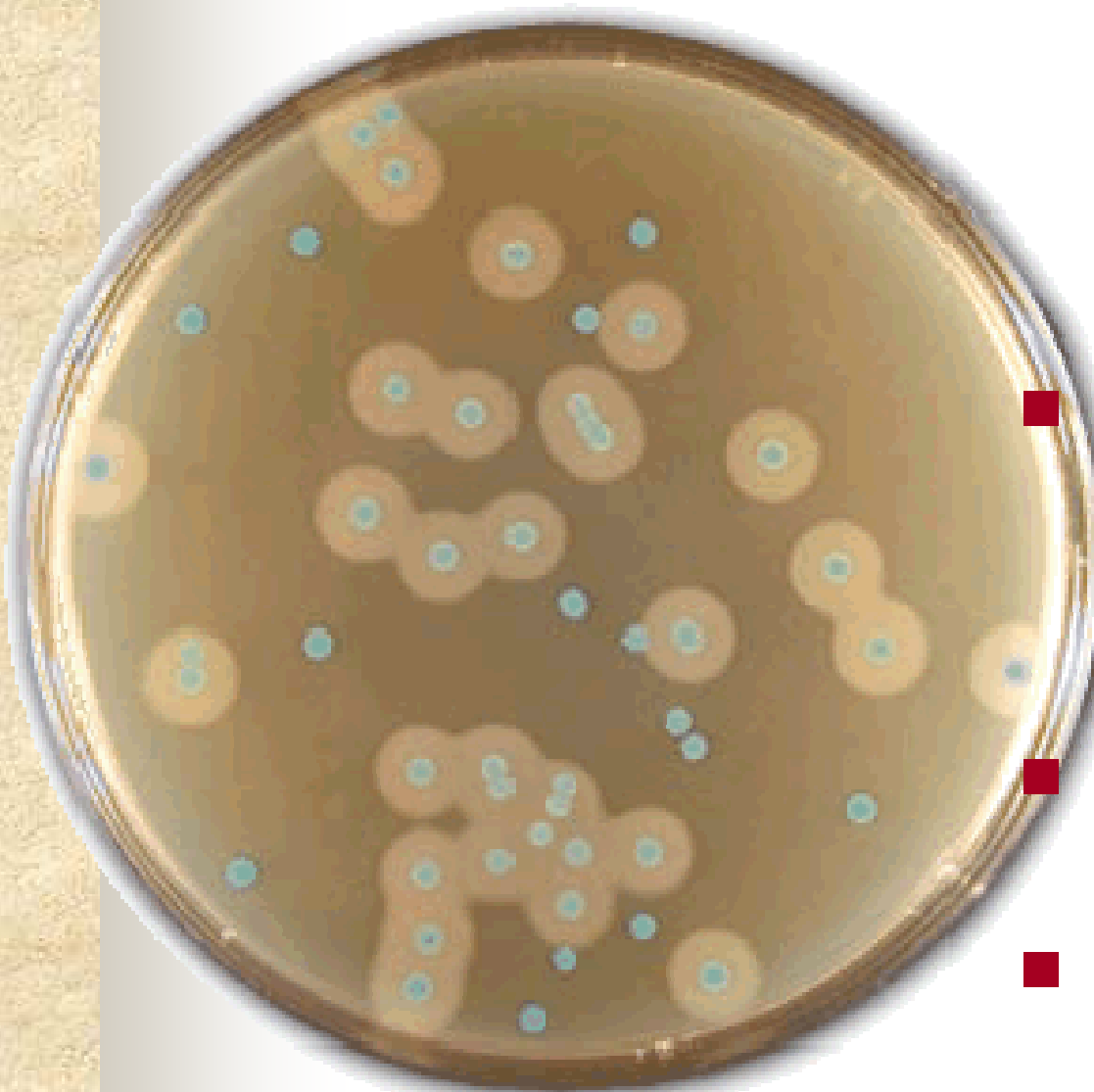


Půdy s krví – základ klinické mikrobiologie

- 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

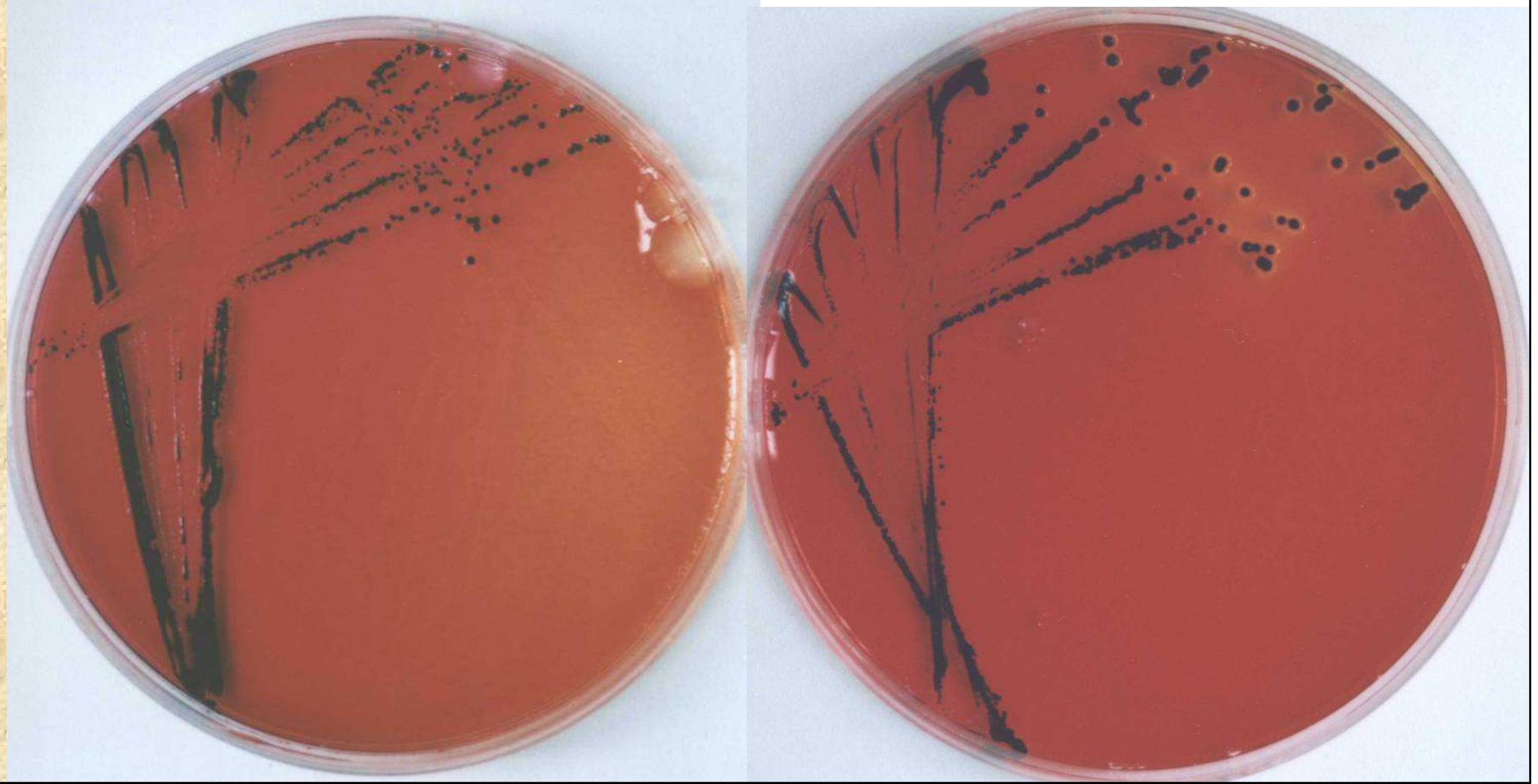
The diagram shows a large white oval representing a cell or organelle. Inside the oval, there is a smaller white circle in the upper right quadrant. In the lower right quadrant, there is a white rectangular box containing the word 'Chromofor' in green text. The entire diagram is set against a dark blue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

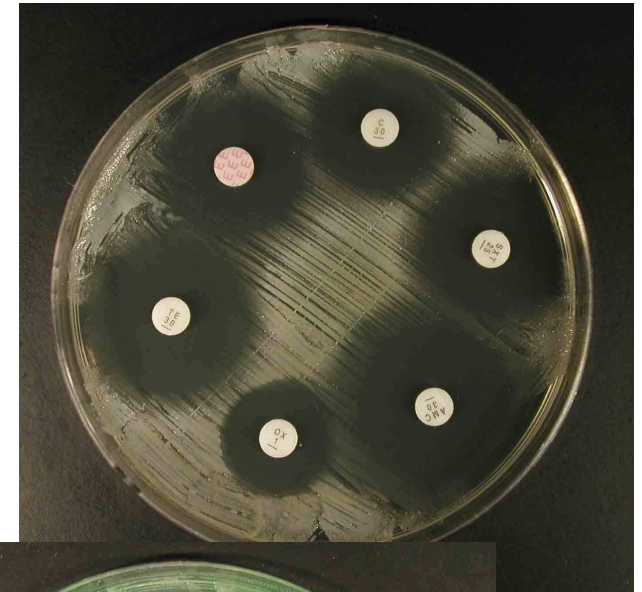
Půdy obohacené a selektivně obohacené



- 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

(spíše pro ty, kteří už mikrobiologii měli na SŠ)

- 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

