

STŘEDNÍ ZDRAVOTNICKÁ ŠKOLA A VYŠŠÍ ODBORNÁ ŠKOLA
ZDRAVOTNICKÁ ŽDÁR NAD SÁZAVOU

DIAGNOSTIKA INFEKČNÍCH CHOROB – KULTIVACE V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH

MGR. IVA COUFALOVÁ



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

DIAGNOSTIKA INFEKČNÍCH CHOROB – KULTIVACE V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH

Mikroorganismy mají schopnost růstu a rozmnožování na neživých kultivačních médiích. V současné době lze kultivovat (uměle rozmnožovat) v laboratoři téměř všechny druhy bakterií, kvasinek a plísní i velké části prvoků.

Cílem kultivace je získat čisté bakteriální kultury a stanovit jejich příslušnost.

KULTIVAČNÍ PŮDY

- **musí splňovat určité parametry:**
- příznivá teplota – 37C
- Ph 7,2 – 7,4
- dostatek živin - soli, ionty, vitamíny, aminokyseliny a růstový faktor
- vhodné plynné prostředí (anaeroby, aeroby)

|

TEKUTÉ KULTIVAČNÍ PŮDY

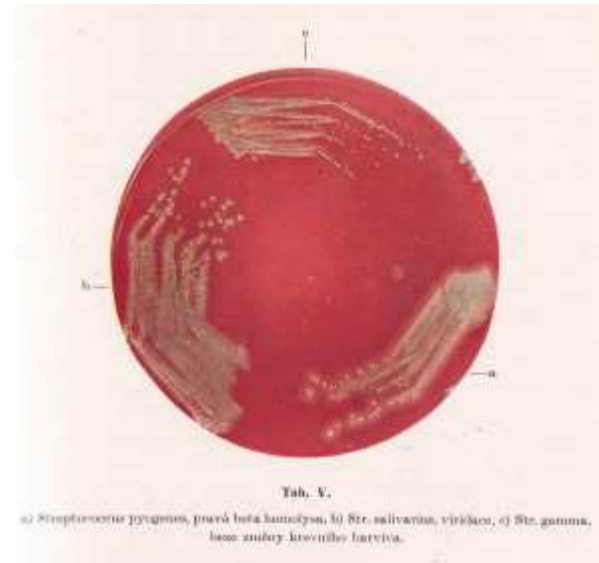
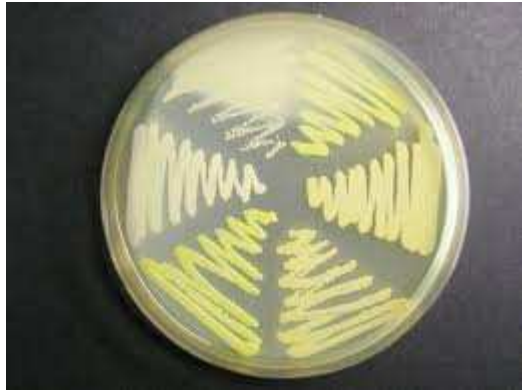
- jednoduché i složitější roztoky živin a růstových faktorů
- používají se zejména k pomnožení bakterií pro účely další diagnostiky, patří mezi ně bujón (masový vývar), inkubuje se 18 – 24 h „přes noc“



PEVNÉ KULTIVAČNÍ PŮDY

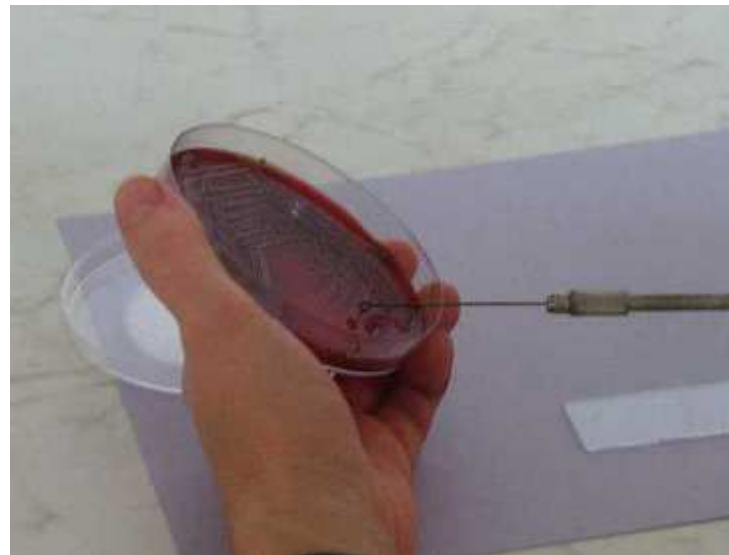
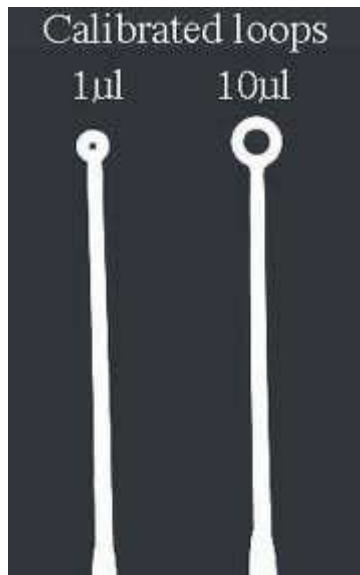
- krevní agar (želé z beraních erytrocytů)
 - kapka tekuté půdy s pomnoženými mikroby se nanese „rozočkuje“ pomocí bakteriologické kličky na tuhou živnou půdu (agar)
 - nejčastěji se uchovávají v Petriho miskách, bakterie na nich tvoří kolonie (v jedné kolonii jsou miliony bakteriálních buněk)
 - podle jejich charakteru, vzhledu, barvy i
- rochu je možné rozpoznávat druhy jednotlivých

PEVNÉ KULTIVAČNÍ PŮDY



Tab. V.

a) *Streptococcus pyogenes*, purvú ložá karmelýna, b) *Str. salivarius*, virókuca, c) *Str. gamma*,
basa: zmlúdy krovnicke larvica.



KULTIVACE VIRŮ

- množí se na živých půdách

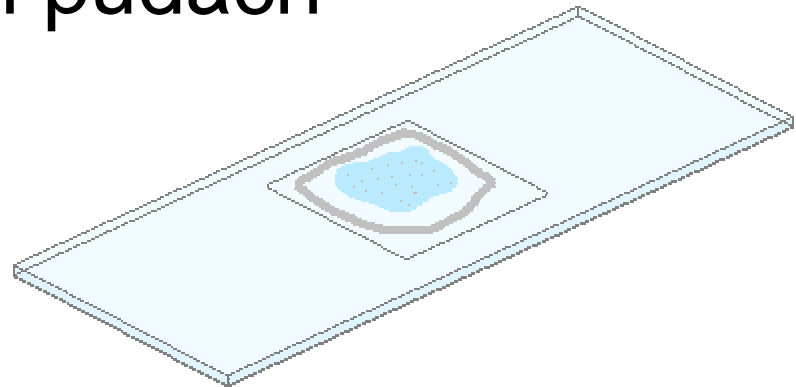
pokusné zvíře - klinický materiál se naočkuje a dle klinických příznaků se určí diagnóza (myši, kuřata, králíci, potkani, opice)

kuřecí embrya - (stáří 4 až 10 dnů), vhodné pro některé viry (chřipka), kuřecí zárodek je sterilní, naočkuje se suspektním materiálem. Po naočkování se vejce inkubují v termostatu za 2 až 4 dny se odeberou vzorky z nichž zjišťujeme pomnožený virus

tkáňové fragmenty- nejčastěji morčecí játra v živném roztoku –posuzujeme biologickou aktivitu virů podle změn ke kterým dochází u buněk tkáňové kultury(změna tvaru, růstu, poškození buněk)

PŘÍPRAVA MIKROSKOPICKÉHO PREPARÁTU

- mikroskopické vyšetření je základem diagnostiky, neboť umožňuje morfologické rozlišení mikroorganismů
- má význam zejména u těžkých infekcí, kde je podkladem pro diagnostiku a cílenou léčbu antibiotiky
- preparáty se zhotovují z bakteriálních kultur vypěstovaných na živných půdách



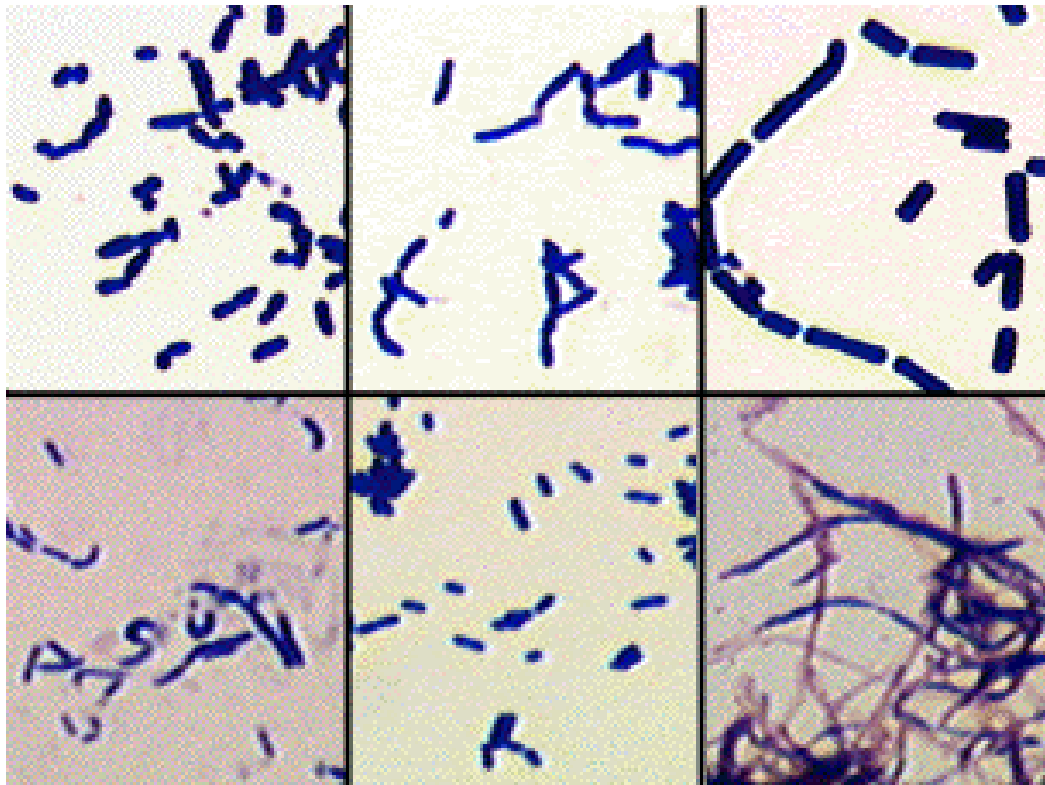
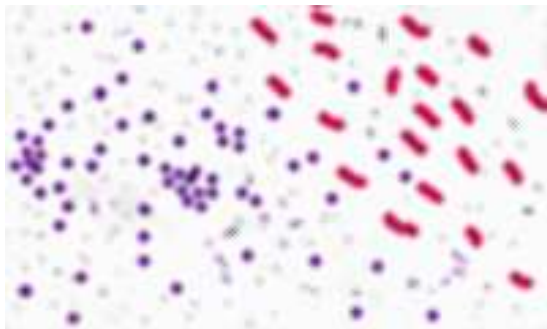
NATIVNÍ PREPARÁT

používá se pro pozorování tvaru, pohybu a dělení mikroorganismů, využívá se v parazitologii, virologii, bakteriologii, mykologii

- připraví se kápnutím suspenze mikroba na podložní sklíčko (buď kapka tekuté půdy, nebo z pevné půdy se vytvoří suspenze s F1/1, vzorek musí obsahovat větší počet mikrobů, aby byli v nátěru vidět

BARVENÉ PREPARÁTY

- jsou diagnosticky lepší (tvar, barva, bičíky...) – nátěr na podložním sklíčku se fixuje plamenem nebo chemicky (metanolem) usmrcené mikroorganismy přijímají barviva lépe než živé.



BARVENÍ DLE GRAMA

K barvení se užívá *krystalová violet*- ta se naváže na kyselé struktury bakterie, po té se to moří *Lugolovým roztokem* (jodový preparát), vytvoří komplex (jód + barvivo), po té se to odbarvuje *alkoholem* nebo *acetonem*

Do některých buněk proniká alkohol velmi pomalu- bakterie zůstávají zbarveny modro – fialově - **Gram pozitivní (G+)** bakterie (streptokoky, stafylokoky)

- do kterých se dostává alkohol rychle odbarví se
- růžovočervené –**Gram negativní (G-)**(bacily- enterobakterie, vibrio aj.)

BARVENÍ MIKROSKOPICKÉHO PREPARÁTU

Některé mikroby nepřijímají tyto barvy, proto byli vyvinuty další speciální metody **Ziehl – Neelsenovo barvení** (mykobakterium), **Albertova metoda** (záškrt), **Wirtz- Conklinova metoda** (diagnostika spor)

ZJIŠTĚNÍ CITLIVOSTI NA ATB A CHEMOTERAPEUTIKA

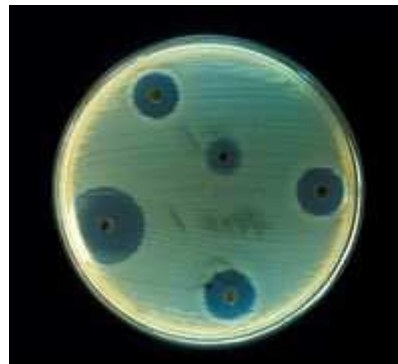
- navazují na kultivaci
- důležitá informace pro lékaře, výsledky umožní zvolit nejúčinnější ATB a zajistit tak optimální léčbu
- výsledkem je **antibiogram** – skupina testovaných ATB se stupněm účinku na daný mikrobiální kmen
- slouží k přehledu o současném stavu citlivosti nebo rezistence mikrobů na používání ATB

CITLIVOST MIKROORGANISMŮ NA ATB

Kvalitativní vyšetření:

Určujeme na který druh ATB je mikrob citlivý

Na agar se nanese suspenze vyšetřovaného mikroba, na povrch agaru se položí malé papírové disky napuštěné zkoumaným ATB. To difunduje do okolí disku, po kultivaci pozorujeme kolem každého disku zónu zábrany růstu (inhibice). Vznik inhibice dokazuje antimikrobiální účinek ATB, intenzita efektu odpovídá velikosti zóny inhibice – čím je atb účinnější, tím je zóna inhibice širší (difuzní disková metoda)



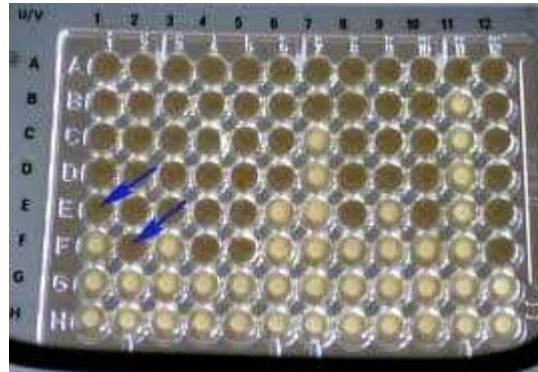
CITLIVOST MIKROORGANISMŮ NA ATB

Kvantitativní vyšetření:

Spočívá ve stanovení účinné koncentrace ATB, na které je testovaný mikrob citlivý.

Zjišťuje se **minimální inhibiční koncentrace MIC**.

Dále se stanovuje koncentrace atb, která mikroba dovede usmrtit – **minimální baktericidní koncentrace MBC**.



ZDROJE

- http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/obra
- Schindler Jiří, Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů, Grada 2010, ISBN 978-80-247-3170-4
- http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mik
- <http://www.collectio-jav.estranky.cz/clanky/mikro>
- <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/ob-sah/moc/loops.jpg>

ZDROJE

- <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obs>
- Výuková prezentace z Lékařská bakteriologie, Jan Smíšek ÚLM 3.LF UK 2009
- <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons>
- <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/mic.html>
- Podstatová Hana, Základy epidemiologie a hygieny , Galén 2009, ISBN 978-80-7262-597-0