



9.-13.1.2023



2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
UNIVERZITA KARLOVA



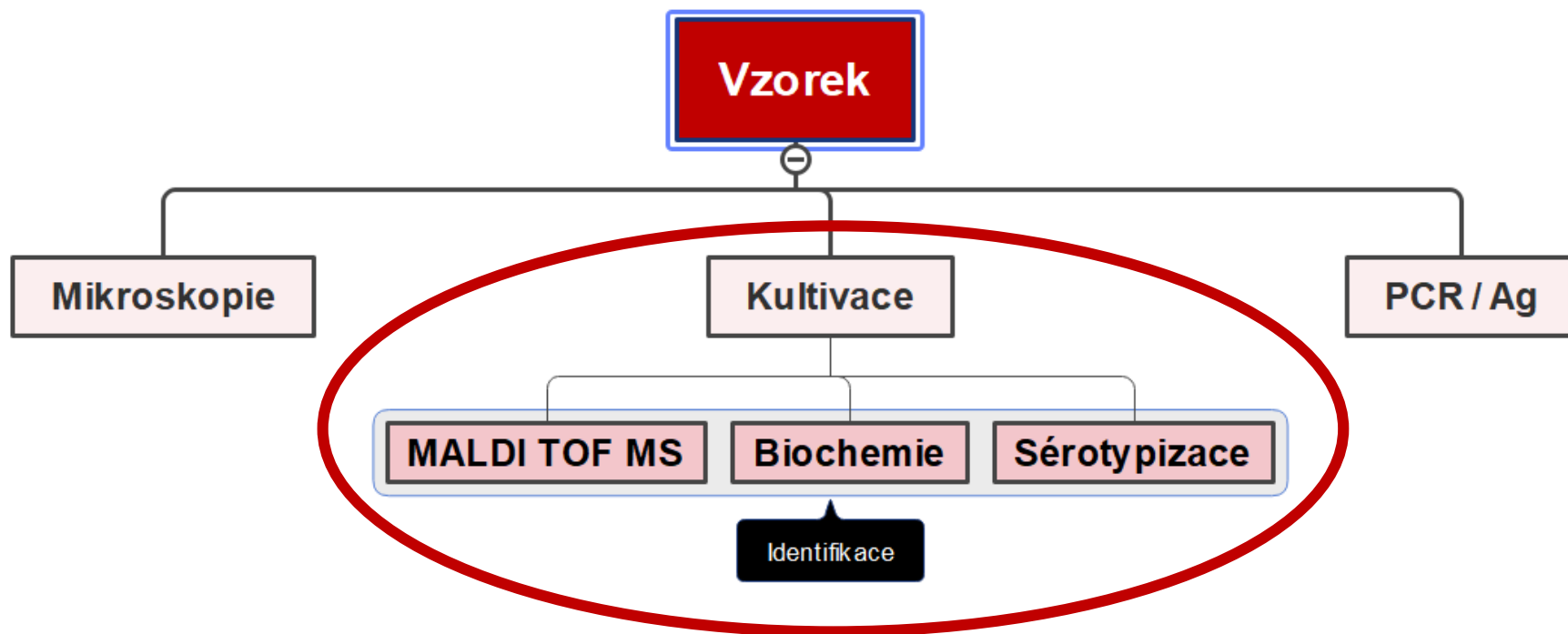
UNIVERZITA
KARLOVA

VP Klinická mikrobiologie Kultivace bakterií

Jakub Hurych

Ústav lékařské mikrobiologie 2.LF UK a FN Motol

Metody přímého průkazu



Kultivace

```
graph TD; A[Kultivace] --- B[Co to je?]; A --- C[Jak se to dělá]; A --- D[Co tím prokazujeme?]; A --- E[Jaké půdy?]; A --- F[Jaké to má výhody?];
```

Co to je?

Jak se to dělá

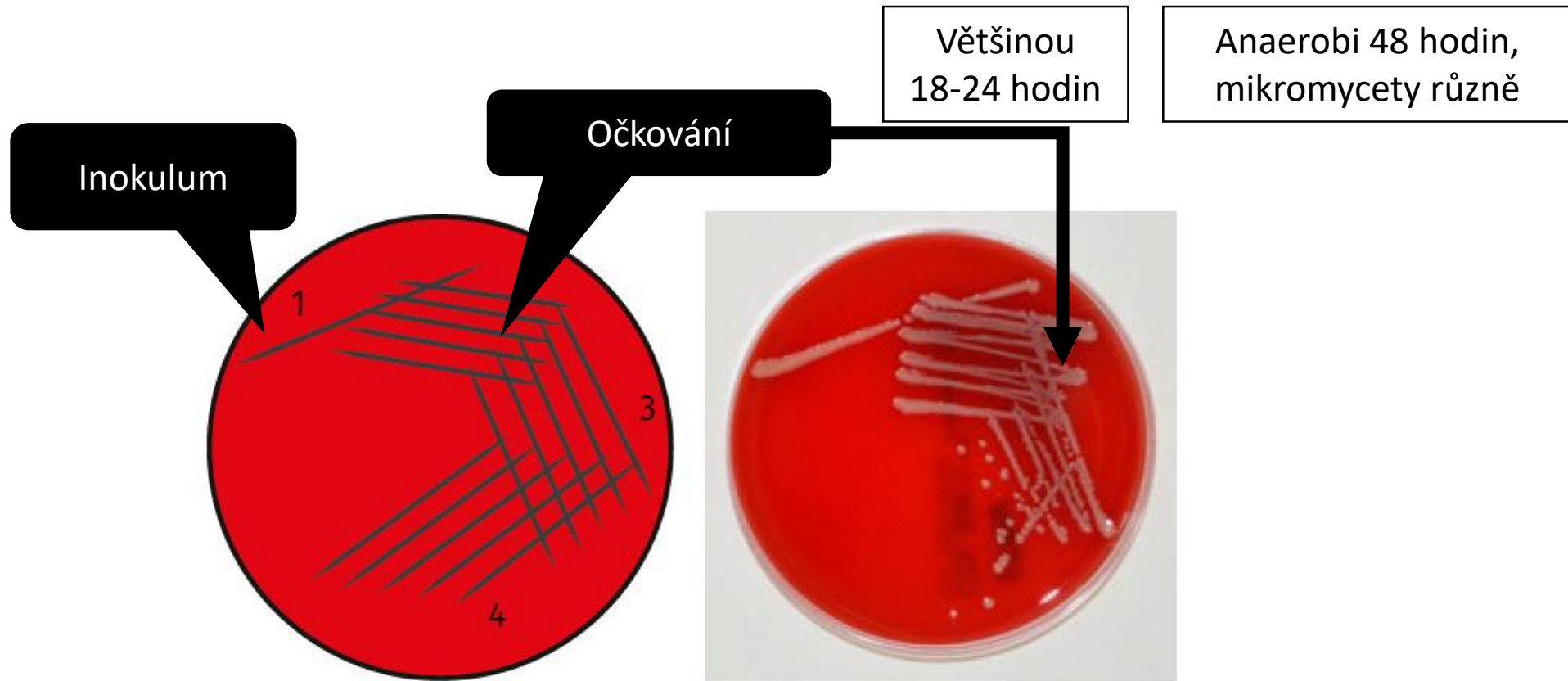
Co tím prokazujeme?

Jaké půdy?

Jaké to má výhody?

Kultivace bakterií

= Cílené a regulované množení bakterií sloužící k jejich detekci



Kromě bakterií: mikromycety, méně již parazity a vzácně i viry

Kultivace

```
graph TD; A[Kultivace] --- B[Co to je?]; A --- C[Jak se to dělá]; A --- D[Co tím prokazujeme?]; A --- E[Jaké půdy?]; A --- F[Jaké to má výhody?];
```

Co to je?

Jak se to dělá

Co tím prokazujeme?

Jaké půdy?

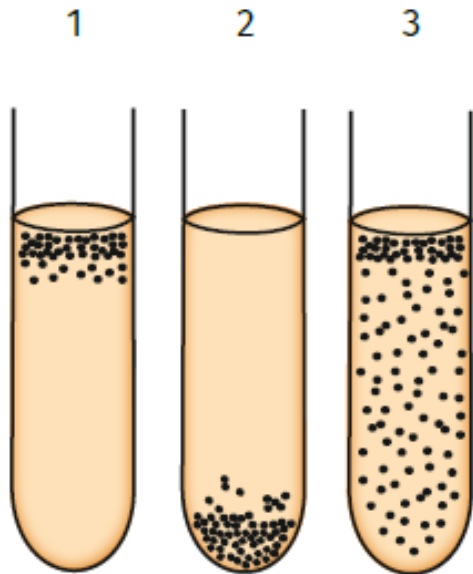
Jaké to má výhody?

Kultivační půdy

Zajišťují energetický **substrát** ke kultivaci mikroba

Dva základní typy:

1) Tekuté (médiá)

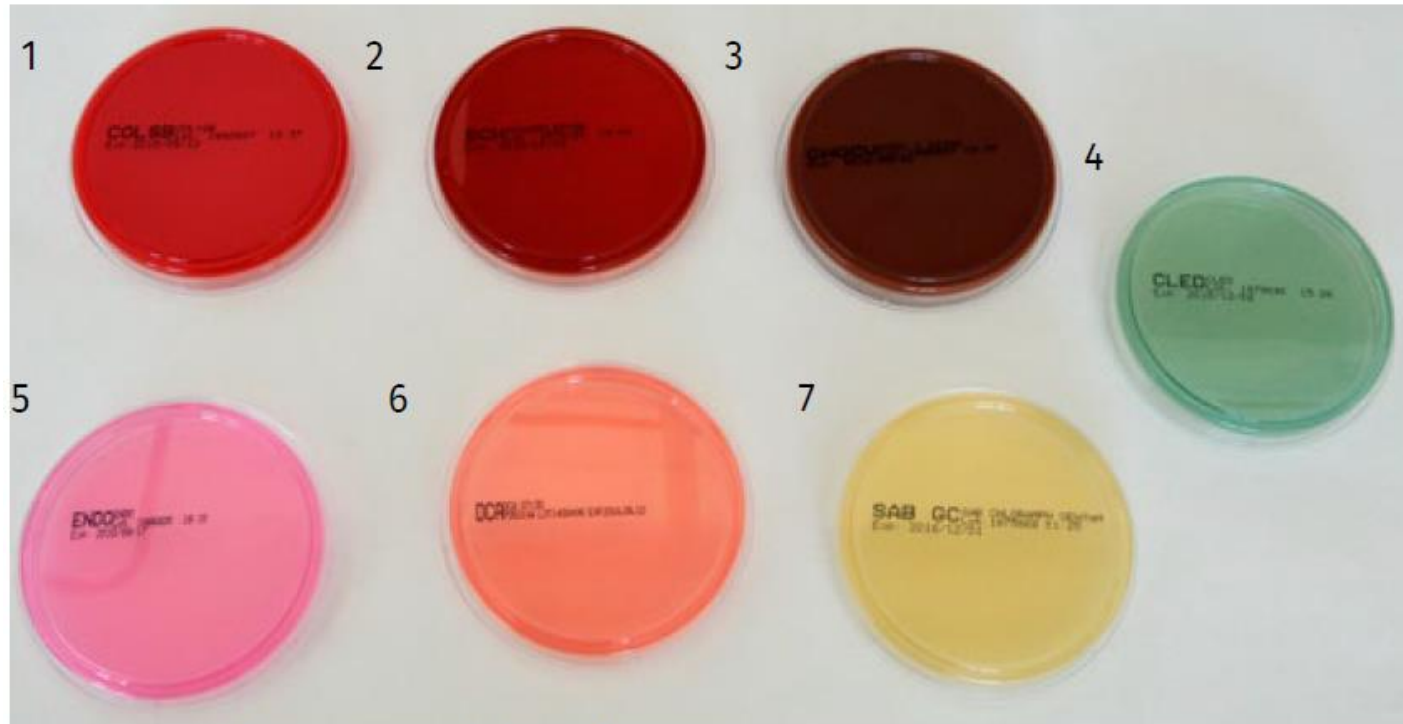


Podmínky	Možnosti
Energie	Půdy
Atmosféra	O ₂ vs. CO ₂ vs. anaerostat
Teplota	25°C vs. 37°C
Další	Vlhkost, pH, tlak

2) Pevné (půdy)



Pevné půdy



OBR. 194 UKÁZKA KULTIVAČNÍCH PŮD

1 – krevní agar, 2 – Schaedlerův agar (kultivace anaerobů), 3 – čokoládový agar,
4 – CLED půda, 5 – Endova půda, 6 – deoxycholátový agar, 7 – Sabouraudův agar



Pevné půdy

Půda	Využití
Krevní agar	Skoro všechno, hlavně G+ bakterie (hemolýza)
Schaedlerův agar	Anaerobi
Čokoládový agar	Kultivačně náročné bakterie
CLED agar	Moč
Endův / MacConkey agar	G- bakterie



Pevné půdy

Půda	Využití
Krevní agar	Skoro všechno, hlavně G+ bakterie (hemolýza)
Schaedlerův agar	Anaerobi
Čokoládový agar	Kultivačně náročné bakterie
CLED agar	Moč
Endův / MacConkey agar	G- bakterie
Deoxycholátový agar	<i>Salmonella</i>



Pevné půdy

Půda	Využití
Krevní agar	Skoro všechno, hlavně G+ bakterie (hemolýza)
Schaedlerův agar	Anaerobi
Čokoládový agar	Kultivačně náročné bakterie
CLED agar	Moč
Endův / MacConkey agar	G- bakterie
Deoxycholátový agar	<i>Salmonella</i>
Sabouradův agar	Kvasinky



Pevné půdy

Půda	Využití
Krevní agar	Skoro všechno, hlavně G+ bakterie (hemolýza)
Schaedlerův agar	Anaerobi
Čokoládový agar	Kultivačně náročné bakterie
CLED agar	Moč
Endův / MacConkey agar	G- bakterie
Deoxycholátový agar	<i>Salmonella</i>
Sabouradův agar	Kvasinky
Karmaliho půda	<i>Campylobacter</i>
CIN půda	<i>Yersinia</i>
Müller-Hintonova půda	ATB citlivost

Růst na půdách

- S-fáze – běžná, hladká
- **M-fáze** – mukózní, hlenovitá
- R-fáze – suchá, při absenci živin

Streptococcus pneumoniae
(M-fáze)



**Opouzdřený =
více virulentní**

Kultivace

```
graph TD; A[Kultivace] --- B[Co to je?]; A --- C[Jak se to dělá]; A --- D[Co tím prokazujeme?]; A --- E[Jaké půdy?]; A --- F[Jaké to má výhody?];
```

Co to je?

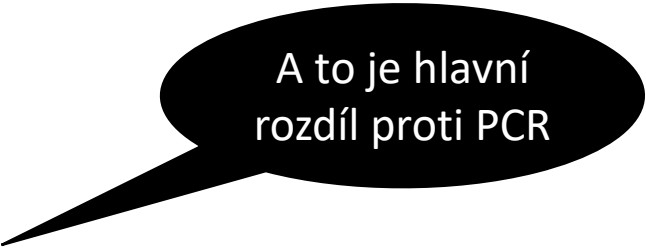
Jak se to dělá

Co tím prokazujeme?

Jaké půdy?

Jaké to má výhody?

Přednosti kultivace



A to je hlavní
rozdíl proti PCR

Vše se odvíjí od získání živé kultury

- **Detekce vlastností a fenotypů**
 - Hemolýza – projasnění s destrukcí erytrocytů
 - Fáze S, M, R
- **Stanovení citlivosti na antibiotika**
- **Možná sérotypizace** - pokud je patogeneticky nebo epidemiologicky důležité

Algoritmy interpretace kultivačních nálezů

Správný výběr kultivačních médií ①

Kvalita ②

Kvantita ①

Algoritmy interpretace kultivačních nálezů

Správný výběr kultivačních médií

Co očekávám z daného materiálu?

- g+ koky?
- kultivačně náročné bakterie
(hemofily, neiserie)?
- enterobakterie?
- salmonelly?
- anaerobi?
- C. difficile
- kvasinky?
- Proteus?
- enterokoky?
- legionellu?

Kvalita ②

Kvantita ①

Algoritmy interpretace kultivačních nálezů

Správný výběr kultivačních médií

Co očekávám z daného materiálu?

- g+ koky?
 - kultivačně náročné bakterie (hemofily, neiserie)?
 - enterobakterie?
 - salmonelly?
 - anaerobi?
 - C. difficile
 - kvasinky?
 - Proteus?
 - enterokoky?
 - legionellu?
- Krevní agar
 - Čokoládový agar
 - MacConkey agar
 - DCA
 - Schaedlerův agar
 - Brazierův agar
 - Sabouradův agar
 - CLED agar
 - CAP agar
 - BCYE

Kvalita ②

Kvantita ①

Algoritmy interpretace kultivačních nálezů

Správný výběr kultivačních médií ①

Kvalita

Když to neroste
Když to roste na dané půdě ⑥

Kvantita ①

Barva — Fermentuje to něco?

Velikost

Malý
Střední
Velký

Hemolýza

Alfa
Beta
Gamma

Fáze růstu

S-fáze
M-fáze
R-fáze

Zápach

Dle mikroba

- Pseudomonas
- Kvasinky
- Proteus
- Neisserie

Specifické fenomény

Plazení
CAMP
Satelitový fenomén

Barva – fermentace laktózy



Fermentuje: *Escherichia*, *Citrobacter*,
Enterobacter and *Klebsiella*



Nefermentuje: ostatní – vč. *Shigella*, *Salmonella*,
Serratia nebo nefermentující tyčinky

Barva – fermentace laktózy, co s tím dál



Fermentuje: *Escherichia*, *Citrobacter*,
Enterobacter and *Klebsiella*

- Kdy nám to nestačí?
- Aglutinace

Typ	Pozn.
O157:H7	Nejvíce ve světě
O26	Nejvíce v ČR
O104:H4	Německá epidemie (2011)
O103	
O111	
O1415	

Děti do 2 let
věku kvůli
HUS

Hemolyticko-uremický syndrom (HUS)

= trombocytopenie, hemolytická anémie a akutní postižení ledviny

typické pro **děti do 2 let**, v **epidemiích** (léto) - hovězí maso, nepasterizované výrobky.

Bakterie EHEC už usmrtila 35 lidí, z toho 34 v Německu

SVĚT 12. června 2011 20:24

BERLÍN - Počet úmrtí na infekci střevní bakterie EHEC v Německu vzrostl o další dvě osoby na 34 a úřady se obávají, že to ještě není konečná bilance už ustupující epidemie.

f t 1 příspěvek



Fermentuje: *Enterob*



I se Švédkou, která zemřela koncem května, si epidemie vyžádala už 35 mrtvých. Němečtí odborníci se navíc obávají těžkých a možná doživotních zdravotních následků u osob, u nichž se nákaza enterohemoragické E. coli (EHEC) projevila. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvádí, že nákaza nebo podezření na ni se objevila dohromady u 3255 osob.



Děti do 2 let věku kvůli HUS

Hemolyticko-uremický syndrom (HUS)

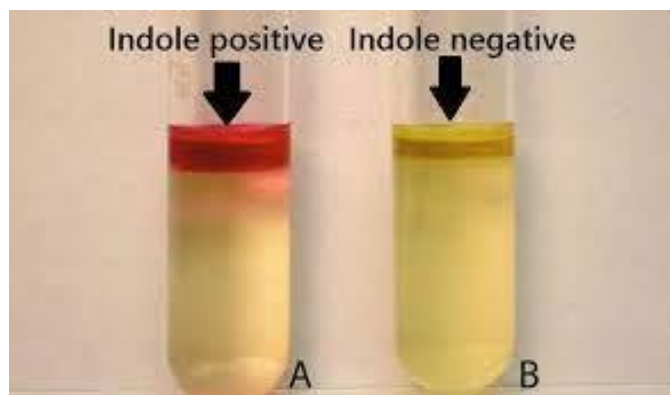
= trombocytopenie, hemolytická anémie a akutní postižení ledviny

typické pro děti do 2 let, v epidemiích (léto) - hovězí maso, nepasterizované výrobky.

Barva – fermentace laktózy, co s tím dál

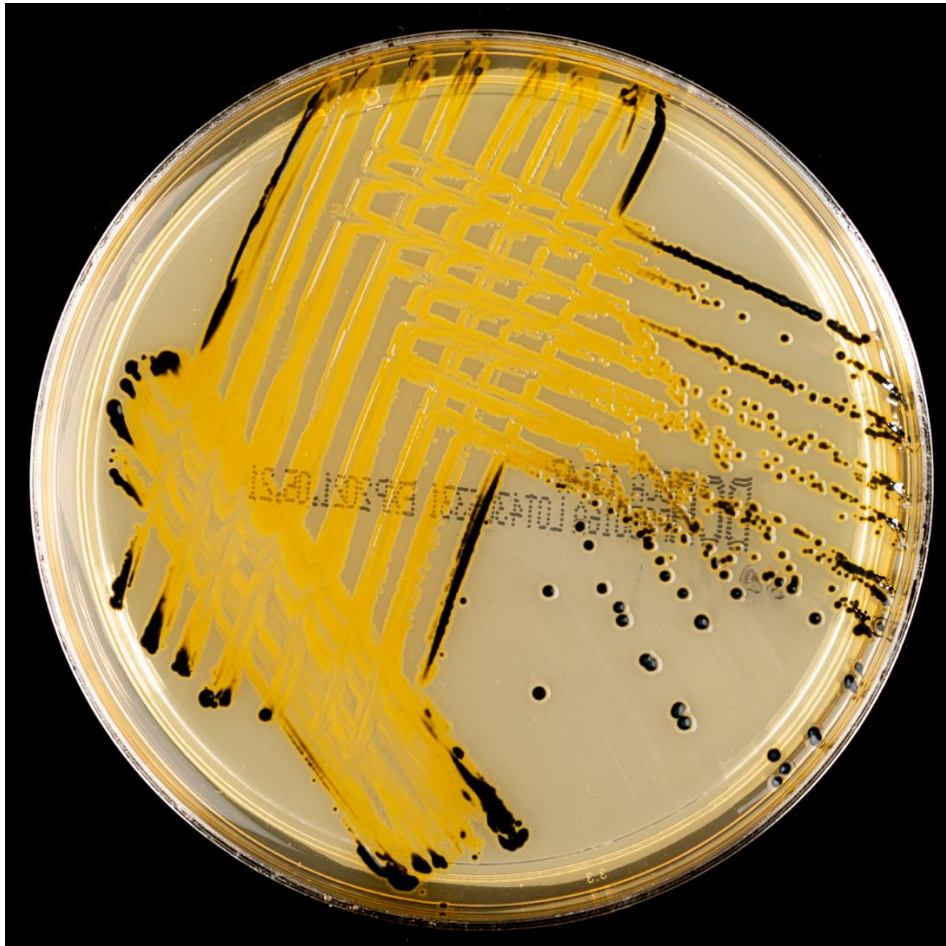
- Jak poznám, že je to *Shigella* a ne *E.coli*?
 - MALDI-TOF MS nepomůže

Klín	<i>E.coli</i>	<i>Shigella</i>
Plyn	+ (bublinky)	- (ne)
Indol	+ (růž.)	- (žlut.)



Nefermentuje: ostatní – vč. *Shigella*, *Salmonella*,
Serratia nebo nefermentující tyčinky

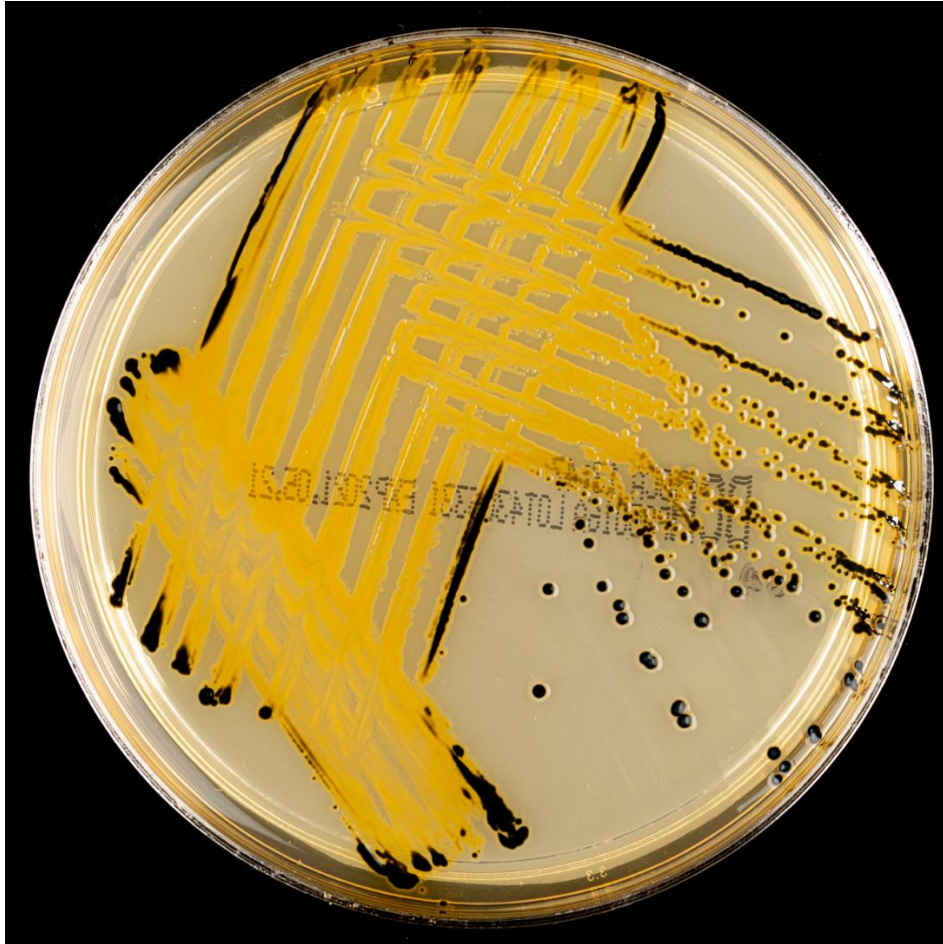
Barva – utilizace H₂S



Fermentuje: typicky *Salmonella* a
Citrobacter

Determinanty O-antigenu	Determinanty H-antigenu	
1,9,12	g,m	Enteritidis
1,4,12	i	Typhimurium
6, 7, 14	R	Infantis
9,12	d	Typhi (+ pouzderný antigen Vi)

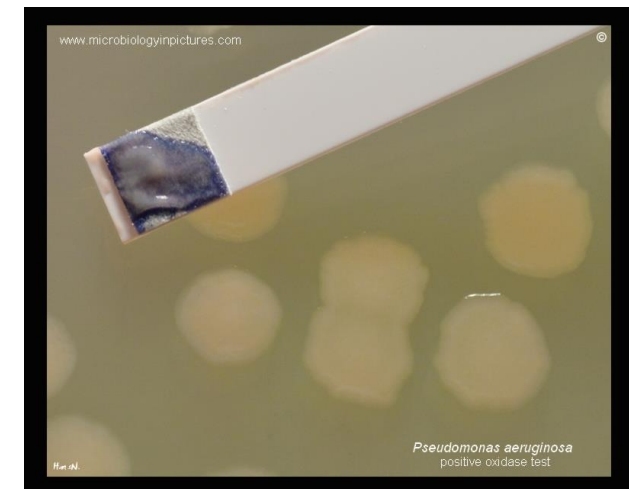
Barva – utilizace H2S



Fermentuje: typicky *Salmonella* a *Citrobacter*

Serotype	O Antigens	H Antigens Phase 1	H Antigens Phase 2
Agona	1, 4, [5], 12	f, g, s	[1, 2]
Anatum	3, {10} {15} {15, 34}	e, h	1, 6
Bareilly	6, 7, 14	y	1, 5
Blockley	6, 8	k	1, 5
Bovis Morbificans	6, 8, 20	r, [i]	1, 5
Brandenburg	1, 4, 12	e, h	e, n, z15
Bredeney	1, 4, 12, 27	l, v	1, 7
Chester	1, 4, [5], 12	e, h	e, n, x
Derby	1, 4, [5], 12	f, g	[1, 2]
Dublin	1, 9, 12, [VI]	g, p	-
Enteritidis	1, 9, 12	[f], g, m, [p]	[1, 7]
Gallinarium	1, 9, 12	-	-
Gloucester	1, 4, 12, 27	i	l, w
Hadar	6, 8	z10	e, n, x
Heidelberg	1, 4, [5], 12	R	1, 2
Indiana	1, 4, 12	z	1, 7
Infantis	6, 7, 14	R	1, 5
Javiana	1, 9, 12	l, z28	1, 5
Kentucky	8, 20	i	z6
Kottbus	6, 8	e, h	1, 5
Lagos	1, 4, [5], 12	i	1, 5
Lille	6, 7, 14	z38	-
Livingstone	6, 7, 14	d	l, w
Mbandaka	6, 7, 14	z10	e, n, z15
Meleagridis	3, {10} {15} {15, 34}	e, h	l, w
Montevideo	6, 7, 14	g, m, [p], s	[1, 2, 7]
Muenchen	6, 8	d	1, 2
Newport	6, 8, 20	e, h	1, 2
Orion	3, {10} {15} {15, 34}	y	1, 5
Paratyphi B	1, 4, [5], 12	b	1, 2
Saintpaul	1, 4, [5], 12	e, h	1, 2
Senftenberg	1, 3, 19	g, [s], t	-
Stanley	1, 4, [5], 12, [27]	d	1, 2
Thomson	6, 7, 14	k	1, 5
Typhimurium	1, 4, [5], 12	i	1, 2
Virchow	6, 7	r	1, 2
Weltevreden	3, {10} {15}	r	z6

Barva – produkce oxidázy



Hemolýza a velikost kolonií

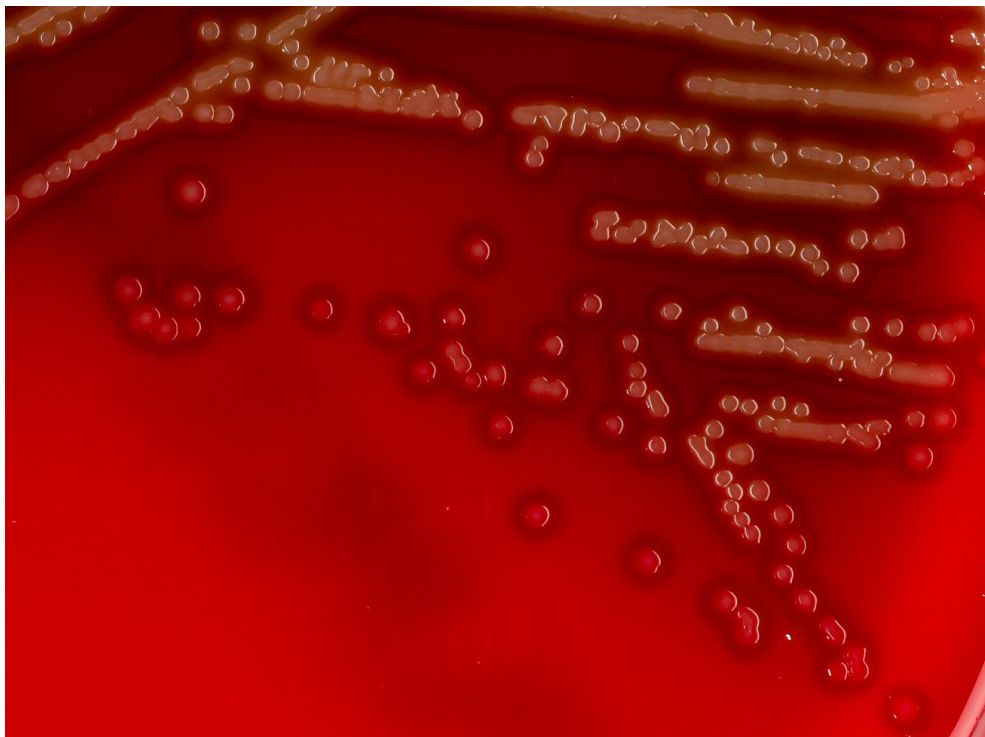


S. aureus

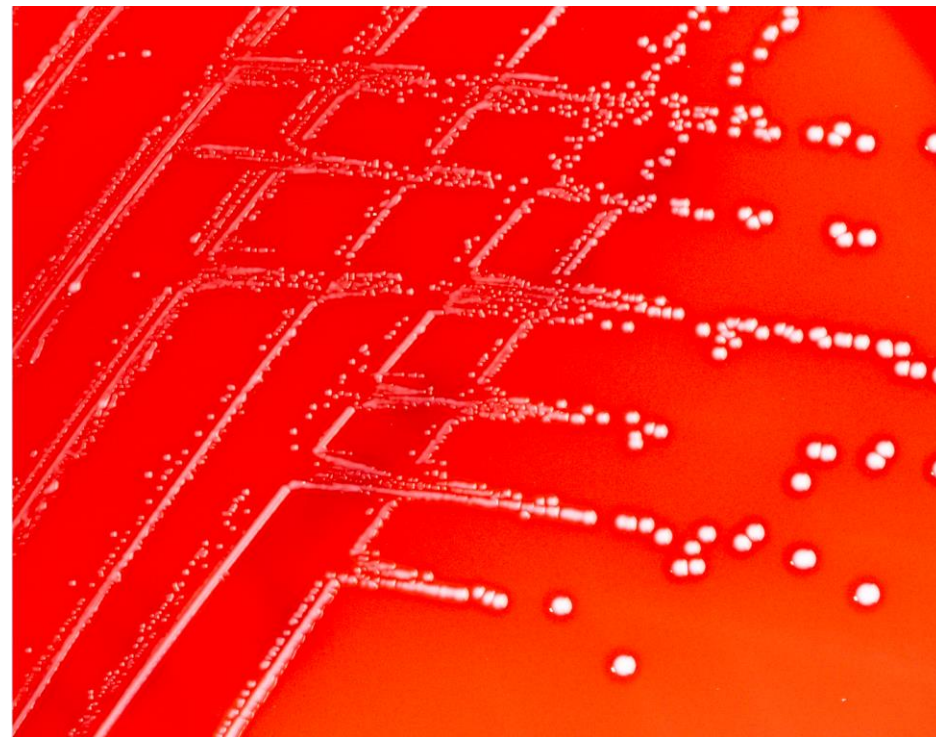


S. pyogenes

Hemolýza a velikost kolonií



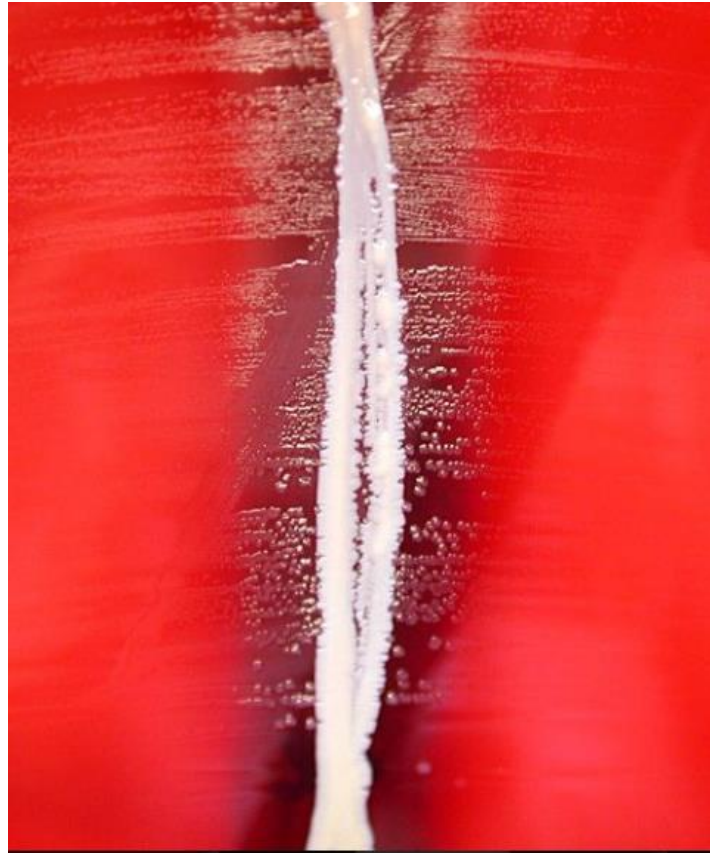
S. pneumoniae



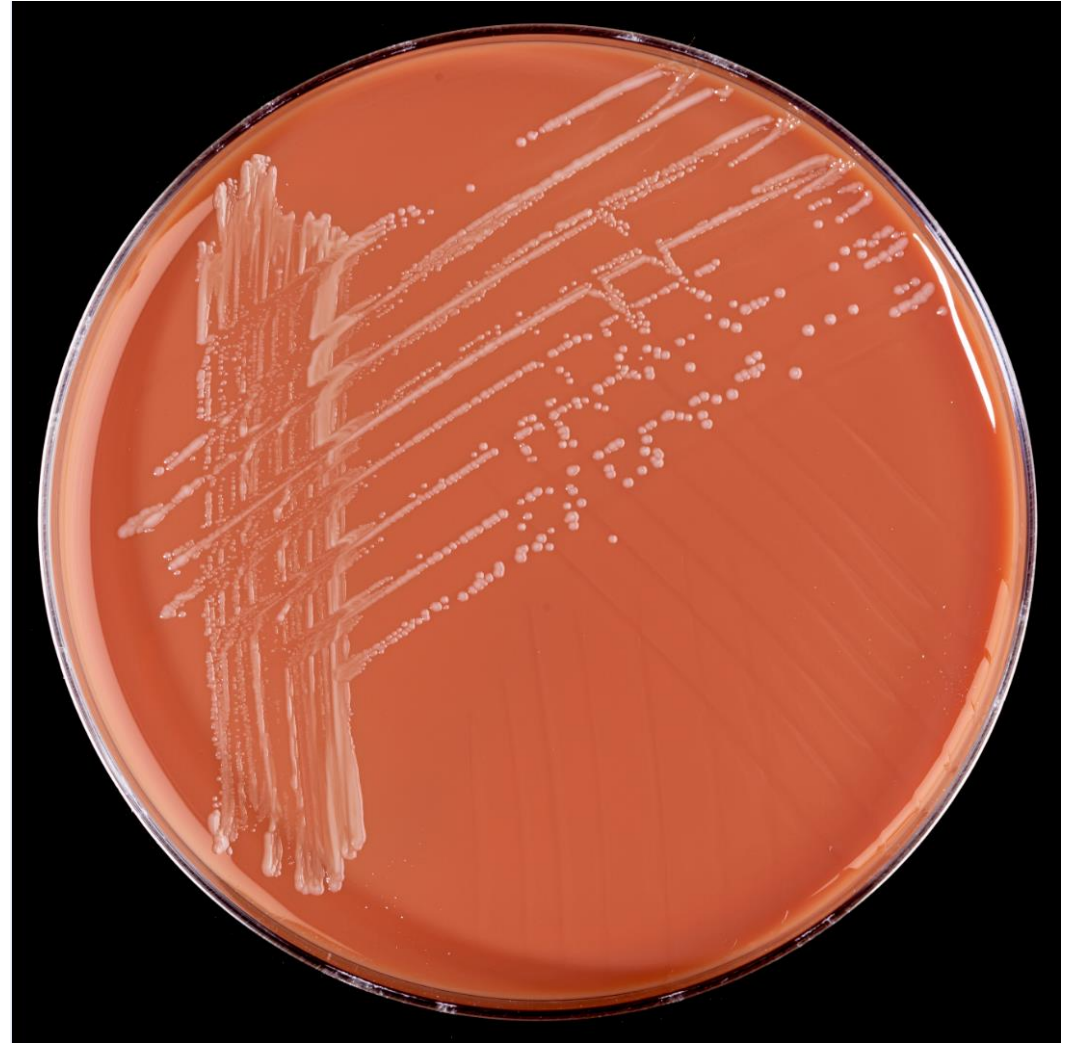
E. faecium

Růst na čokoládě

- Hemofily
- Neiserrie



Satelitový fenomén



A jak to smrdí?

- Proteus
- Pseudomonas
- Neisseria

Algoritmy interpretace kultivačních nálezů

Správný výběr kultivačních médií ①

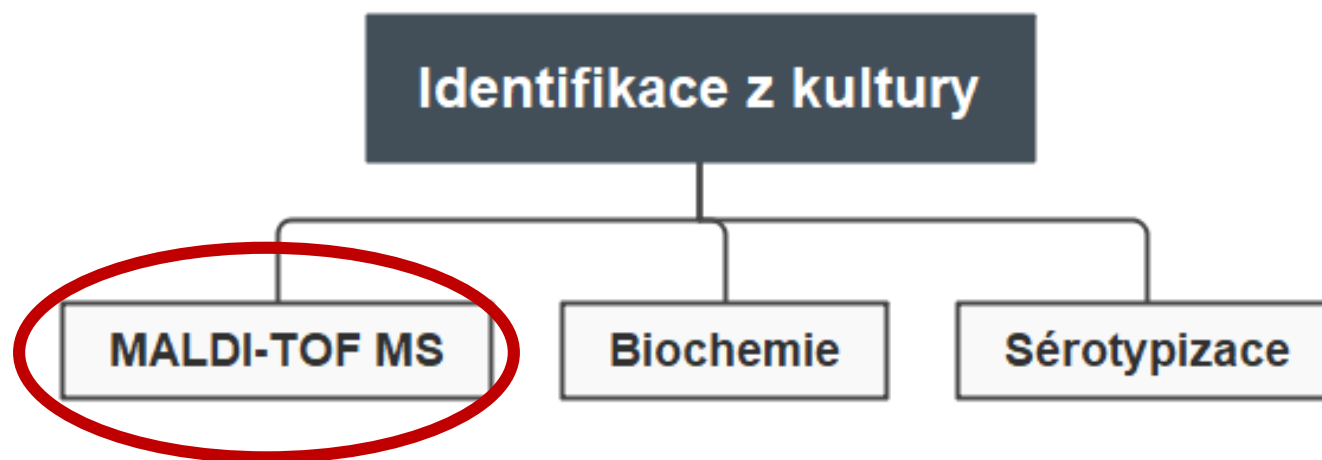
Kvalita ②

Kvantita

— Je to signifikantní? —

— Dle materiálu (sputum / moč)

Identifikace narostlých kolonií

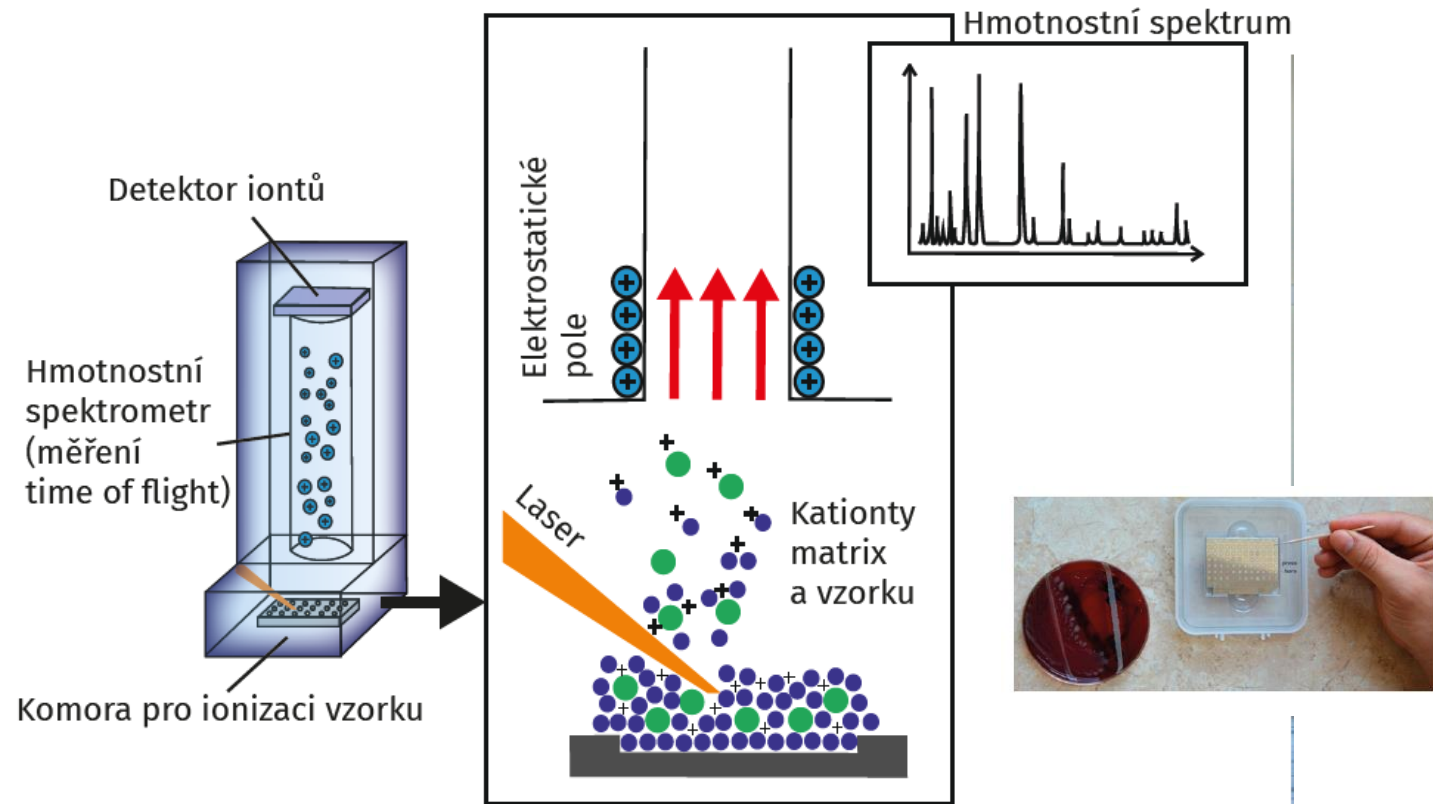


Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

- Princip metody **MALDI-TOF MS**
- Výhody a limitace metody

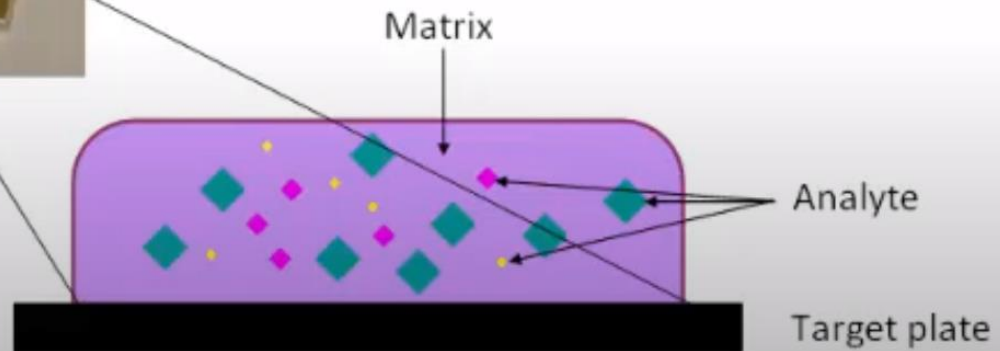


Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

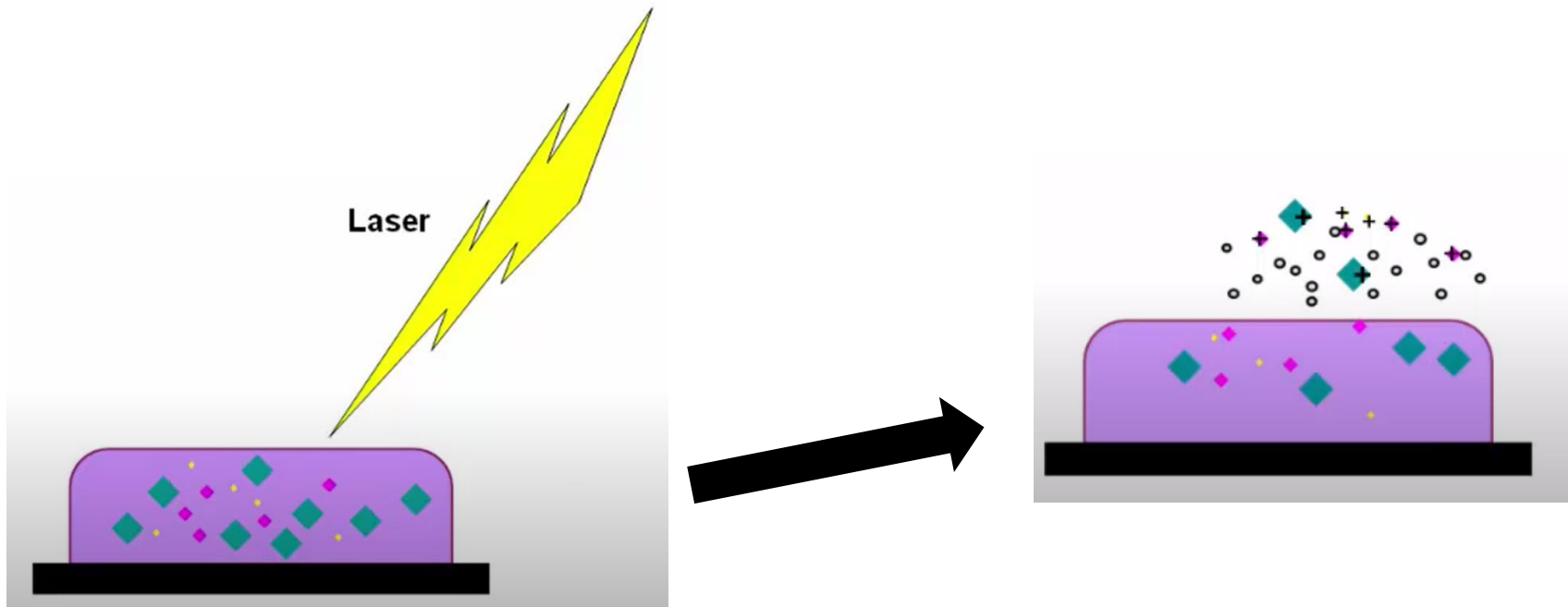


Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

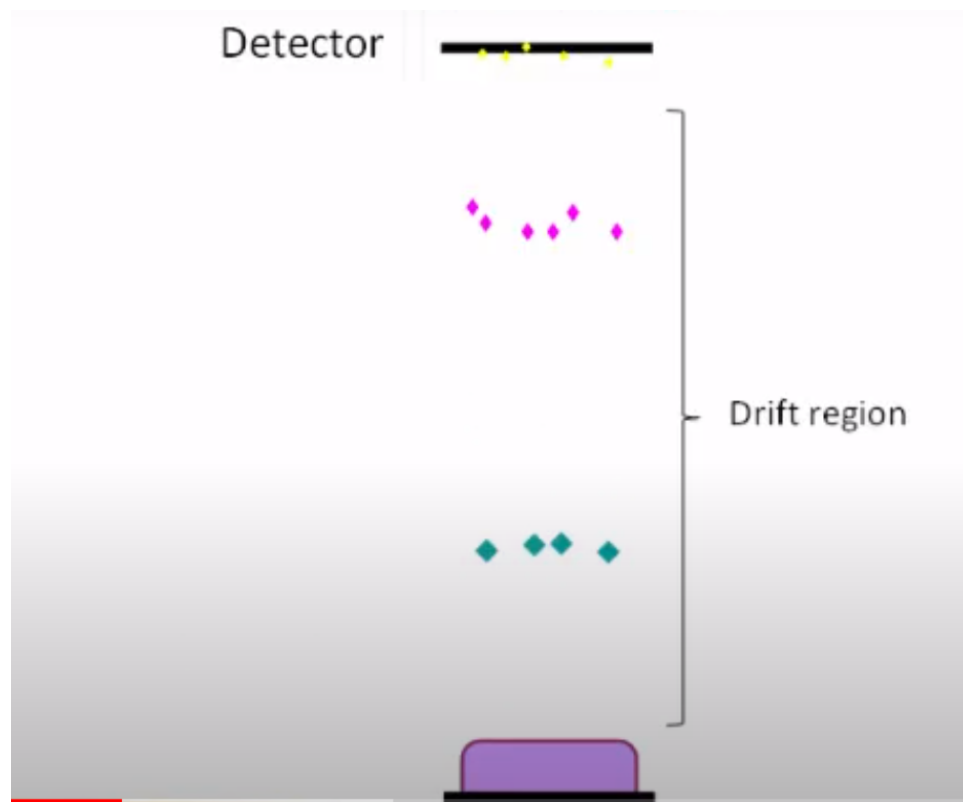
[Video YT](#)



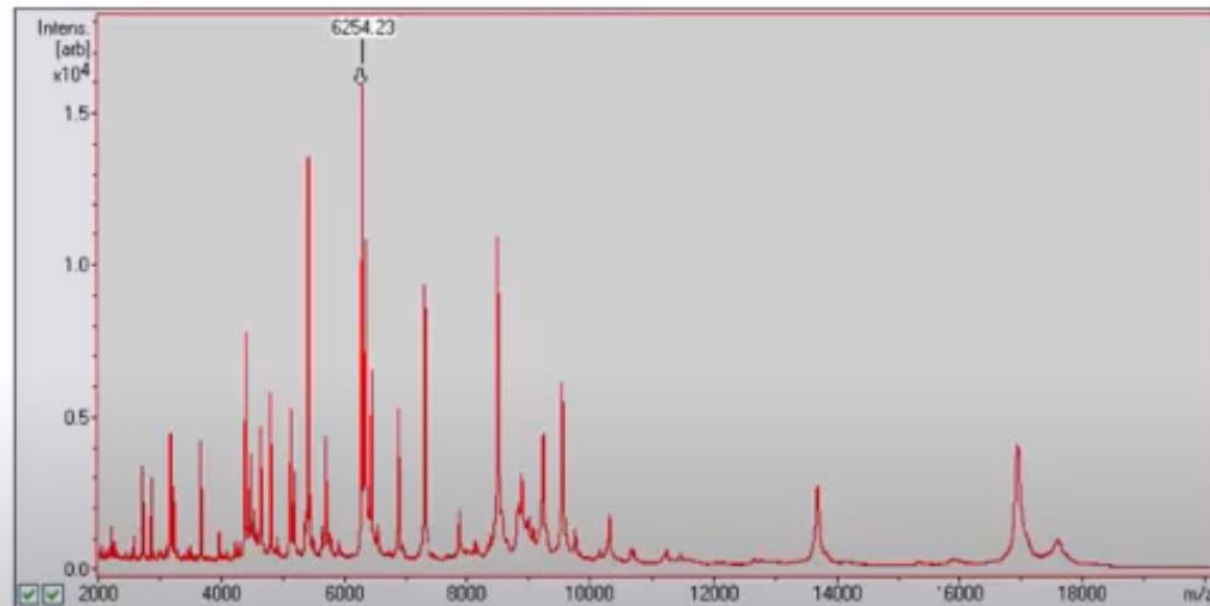
Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry



Jak to teda funguje - shrnutí



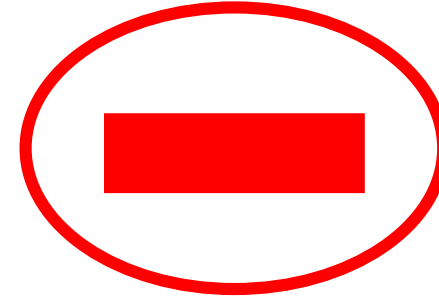
- **Laser ostřeluje, odpaří se a ionizují částice mikrobů**
- **Elektromagnetické pole je žene vakuovou trubicí k detektoru**
- **Měří jim čas jako sprinterům**
- Každý mikrob se rozpadá na částice se specifickými časy průletu
- **Časy (peaky na křivce) se porovnají s databází**

Výhody



- Nákladově efektivní
- Krátká doba zpracování, vysoký obrat vzorků
- Široké spektrum detekovaných mikroorganismů
- Interlaboratorní reproducibilita a adaptabilita

Limitace



- Nemá test citlivosti k ATB
- **Problémová detekce některých mikroorganismů (Bruker)**
 - Misidentifikace: *Shigella* jako *E.coli*
 - Nerozliší příbuzné druhy
 - *Klebsiella*
 - *Enterobacter*
 - *Listeria*
 - *Streptococcus mitis* group
- **Odlišné protokoly a databáze** – nemusí umožnit přenos dat mezi laboratořemi

Citlivost na ATB

- Volíme dle skupiny

Skupina	Specifika
Stafylokoky	Vankomycin, rifampicin, linezolid, ceftarolin
G+ koky jiné	Makrolidy a linkosamidy
Enterobakterie	ESBL+ kmeny
Nefermentující tyčinky	
Močové infekce	P.o. ATB na IMC (nitrofurantoin, fosfomicin, pivmecilinam)
Anaerobi	PNC, ampicilin, pip/taz, klindamycin, metronidazol, meropenem
Enterokoky	Ampicilin (!), vankomycin, teikoplanin