

**Καλλιεργητικά υλικά
και επιλογή τους
στο Κλινικό Εργαστήριο.
Τρόπος εμβολιασμού
κλινικών δειγμάτων -
Ανάγνωση καλλιεργειών**

Δρ. Ε. Τρίκα-Γραφάκου
Βιοπαθολόγος-Κλινικός Μικροβιολόγος
Διευθύντρια Μικροβιολογικού & Βιοχημικού
Εργαστηρίου
Γ.Ν.Ελευσίνας <<Θριάσιο>>

Καλλιεργητικά (Θρεπτικά) υλικά



- Τεχνητά υλικά που περιέχουν θρεπτικές ουσίες και παράγοντες κατάλληλους για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων
- Η σπορά στα θρεπτικά υλικά επιτρέπει:
 - την απομόνωση του πιθανού αιτίου της λοίμωξης
 - ταυτοποίηση του απομονωθέντος μικροβίου
 - τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά

Παρασκευή Θρεπτικών υλικών

- Παρασκευή στο Εργαστήριο από πρώτες ύλες
- Παρασκευή στο Εργαστήριο από αφυδατωμένη σκόνη έτοιμου θρεπτικού υλικού
- Έτοιμα θρεπτικά υλικά εμπορίου

Πρώτες ύλες θρεπτικών υλικών

- ✓ **πεπτόνες** (τρυπτόζη, τρυπτόνη, πρωτεόζη)
- ✓ **εκχύλισμα κρέατος** (Bacto-Beef-Extract)
- ✓ **εκχύλισμα μυκήτων** (Yeast Extract)
- ✓ **σάκχαρα** (τροφή ή μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων)
- ✓ **άγαρ** (στερεωτικό ζυμού, όχι τροφή για μικρόβια)
- ✓ **αναγωγικές ουσίες** (αναερόβιο περιβάλλον)
Θειογλυκολικό ή θειοθειικό Na, κυστεΐνη, ασκορβικό οξύ
- ✓ **εκλεκτικές ουσίες ή εκλεκτικά μίγματα**
(χρωστικές, άλατα, pH, αντιβιοτικά, εμπλουτιστικές ουσίες)
- ✓ **χρωματομετρικοί δείκτες** (ερυθρό της φαινόλης, ιώδες της βρωμοκρεσόλης, ουδέτερο ερυθρό)

Παρασκευή Θρεπτικών υλικών

- Ζύγισμα και διάλυση ουσίας/ουσιών
- Ρύθμιση pH
- Αποστείρωση

Τα θρεπτικά υλικά πρέπει να είναι
στείρα μικροβίων

- Διαμοίραση
- Συντήρηση (διάρκεια ζωής: 1-4 εβδομάδες)
Υλικά εμπορίου: ημερομηνία λήξεως

Αυτοματοποιημένο Σύστημα Παρασκευής Υλικών



Διάκριση Θρεπτικών υλικών

Ρευστότητα

Υγρά (χωρίς άγαρ)

Θρεπτικός ζωμός

Θειογλυκολικός ζωμός

αλκαλικό πεπτονούχο νερό

Ημίρρευστα (άγαρ 0.3-0.5%)

motility άγαρ, Stuart

Στερεά (άγαρ 1.5-2%)

αιματούχο

σοκολατόχρωμο

MacConkey άγαρ

Mueller-Hinton άγαρ

Διάκριση Θρεπτικών υλικών

Σύσταση

- ❖ **ΜΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΑ:** Δεν περιέχουν αναστολείς. Επιτρέπουν την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών (αιματούχο & σοκολατόχρωμο άγαρ)
- ❖ **ΕΚΛΕΚΤΙΚΑ:** Περιέχουν ανασταλτικές ουσίες. Επιτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηρίων εκλεκτικά (MacConkey άγαρ, KVLB άγαρ)
- ❖ **ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΤΙΚΑ:** Περιέχουν ουσίες που καταδεικνύουν ιδιότητες των βακτηρίων (MacConkey άγαρ, Charman)
- ❖ **ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΤΙΚΑ:** Περιέχουν ουσίες που καταστέλλουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων και προάγουν την ανάπτυξη άλλων (ζωμός σεληνίτη)
- ❖ **ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ:** Περιέχουν συστατικά για επιβίωση μικροβίων για μεγάλο χρονικό διάστημα (Stuart, Amies, Cary-Blair, Skim milk, *Brucella* broth, Γλυκερόλη)

Έλεγχος ποιότητας Θρεπτικών υλικών

Είναι απαραίτητος γιατί διασφαλίζει την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Η ποιότητα ελέγχεται από τους εξής χαρακτήρες:

- 1) Στεριρότητα
- 2) pH
- 3) Θρεπτική ικανότητα
- 4) Εκλεκτική ικανότητα
- 5) Διαφοροποιητική ικανότητα

Έλεγχος Στειρότητας

I. Στερεά Θρεπτικά υλικά

Ελέγχεται το 5% της ποσότητας κάθε παρτίδας.

Επώαση στους 35°-37°C επί 48h.

Εμφάνιση >2 αποικίες σε κάθε τρυβλίο → απόρριψη παρτίδας

II. Υγρά Θρεπτικά υλικά

Ελέγχεται όλη η ποσότητα

Επώαση στους 35°-37°C επί 18h

Θόλωση του ζυμού → απόρριψη όλης της ποσότητας

Έλεγχος pH

I. Στερεά Θρεπτικά υλικά

Χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο επιφάνειας.

II. Υγρά Θρεπτικά υλικά

Χρησιμοποιείται πεχάμετρο

Διαφορά $>0,2$ από την επιθυμητή τιμή
αναζήτηση λάθους και διόρθωση

Έλεγχος της Θρεπτικής, Εκλεκτικής και Διαφοροποιητικής Ικανότητας του Θρεπτικού υλικού

Θρεπτική ικανότητα: ικανοποιητική ανάπτυξη με την τυπική μορφολογία των αποικιών

Εκλεκτική ικανότητα: αναστολή της ανάπτυξης συγκεκριμένων μικροβίων

Διαφοροποιητική ικανότητα: παρουσία ή απουσία αναμενόμενων βιοχημικών αντιδράσεων

Έλεγχος της Θρεπτικής, Εκλεκτικής και Διαφοροποιητικής Ικανότητας του Θρεπτικού υλικού

II. Θρεπτικά υλικά εμπορίου

Συνοδεύονται από πιστοποιητικό ποιότητας και έχουν ελεγχθεί για τη θρεπτική, διαφοροποιητική και εκλεκτική ικανότητά τους

Εξαιρούνται υλικά με υψηλό ποσοστό ακαταλληλότητας → έλεγχος ποιότητας σε κάθε παρτίδα:

- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Mueller Hinton άγαρ
- Εκλεκτικά υλικά για την απομόνωση παθογόνων ναΐσσεριών
- *Campylobacter* agar

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	ΜΙΚΡΟΒΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
Blood agar	<i>Streptococcus group A</i> <i>S. pneumoniae</i>	Καλή ανάπτυξη, β-αιμόλυση Καλή ανάπτυξη, α-αιμόλυση
Ζυμοί αιμοκαλλιεργείων	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ανάπτυξη 24h Ανάπτυξη 24h
Brain heart infusion agar	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ανάπτυξη 24h
<i>Campylobacter</i> medium	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Escherichia coli</i>	Καλή ανάπτυξη 24h Αναστολή 48h
Σοκολατόχρωμο	<i>Haemophilus influenzae</i>	Καλή ανάπτυξη 24h
MacConkey agar	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Ροζ αποικίες Άχρες αποικίες
Salmonella-Shigella agar	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i>	Άχρες αποικίες / μαύρο κέντρο Μικρή ή καθόλου ανάπτυξη
Urea broth	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Escherichia coli</i>	Θετικό Αρνητικό
Bile-esculin agar	<i>Enterococcus spp</i> <i>α-Hemolytic Streptococcus, not D</i>	Καλή ανάπτυξη, μαύρες αποικίες Όχι ανάπτυξη
Indole (Kovac's)	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Κόκκινο χρώμα (θετικό) Όχι χρώμα (αρνητικό)

Η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας

- ✓ Επιλογή κατάλληλων θρεπτικών υλικών
- ✓ Τρόπος ενοφθαλμισμού κλινικών δειγμάτων
- ✓ Επιλογή συνθηκών επώασης
- ✓ Άμεσο παρασκεύασμα
- ✓ Ερμηνεία πρωτοκαλλιέργειας
- ✓ Προκαταρκτική ταυτοποίηση
- ✓ Η σημασία του καθαρού καλλιεργήματος

Επιλογή κατάλληλων Θρεπτικών υλικών

ΠΟΤΕ εκλεκτικά υλικά μόνα τους,
ΠΑΝΤΑ σε συνδυασμό με μη εκλεκτικά.

Επιπρόσθετα: **Υγρό** θρεπτικό υλικό

- ✓ στείρα βιολογικά υγρά
(πλην ούρων)
- ✓ Τεμάχια ιστού από χειρουργείο

Επιλογή υλικών βάσει ειδικών πρωτοκόλλων

Θρεπτικά υλικά για Αερόβια Καλλιέργεια ρουτίνας

I. Μη εκλεκτικά Θρεπτικά υλικά

αιματούχο (σε όλα τα δείγματα)
(αίμα προβάτου, ίππου, ανθρώπου)

g(+), g(-) βακτήρια
α, β, γ αιμόλυση

σοκολατόχρωμο (δείγματα
από στείρες περιοχές, γεννητικό,
αναπνευστικό σύστημα)
(CO₂, 5-10%)

g(+), g(-) βακτήρια
H. influenzae,
N. gonorrhoeae

Αερόβια καλλιέργεια ρουτίνας

II. Εκλεκτικά-Διαφοροποιητικά

MacConkey άγαρ

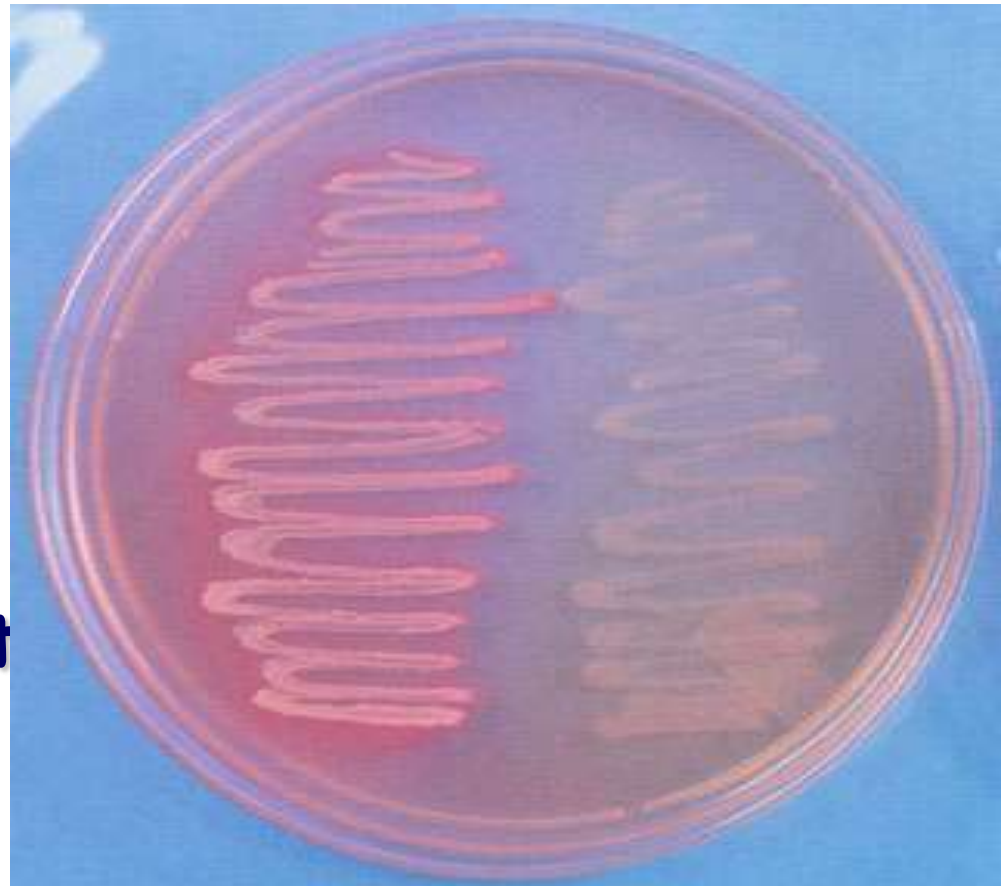
: με χολικά άλατα

: με crystal violet

MacConkey άγαρ

: χωρίς άλατα,

: χωρίς crystal violet



SS άγαρ

Εκλεκτικό και διαφοροποιητικό

Αναπτύσσονται:

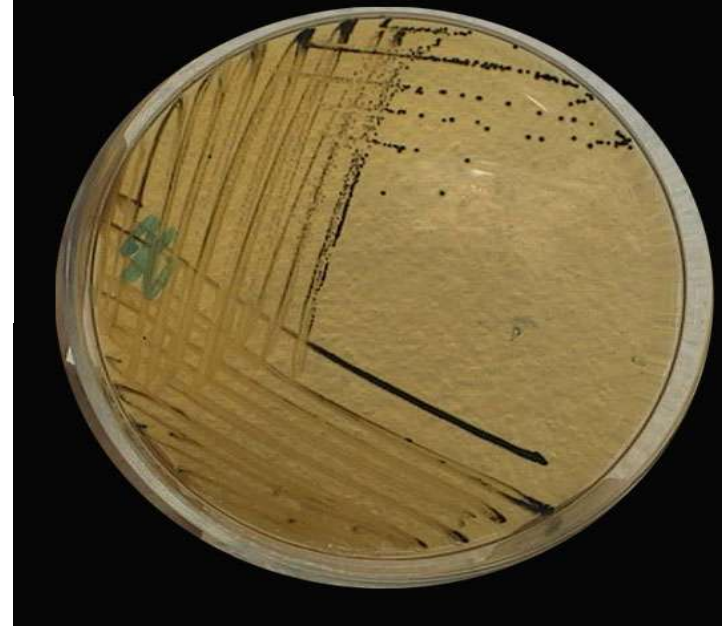
Salmonella → άχρες αποικίες
με μαύρο κέντρο

Shigella → άχρες αποικίες

Αναστέλλονται:

τα περισσότερα εντεροβακτηριακά

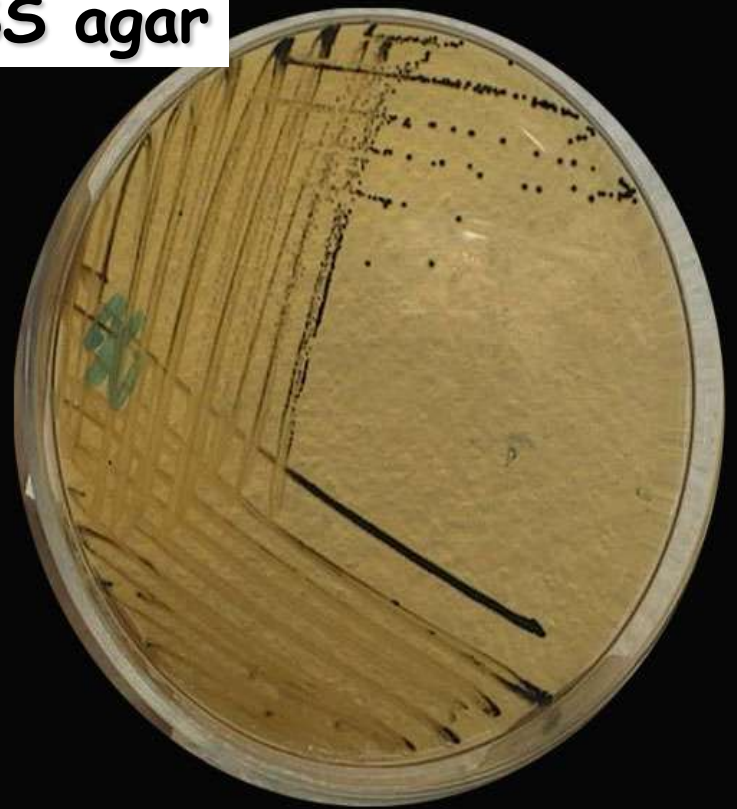
Θειοθειικό Na: πηγή S → βακτήρια που παράγουν H_2S → μαύρες αποικίες



XLD agar



SS agar



Salmonella spp.

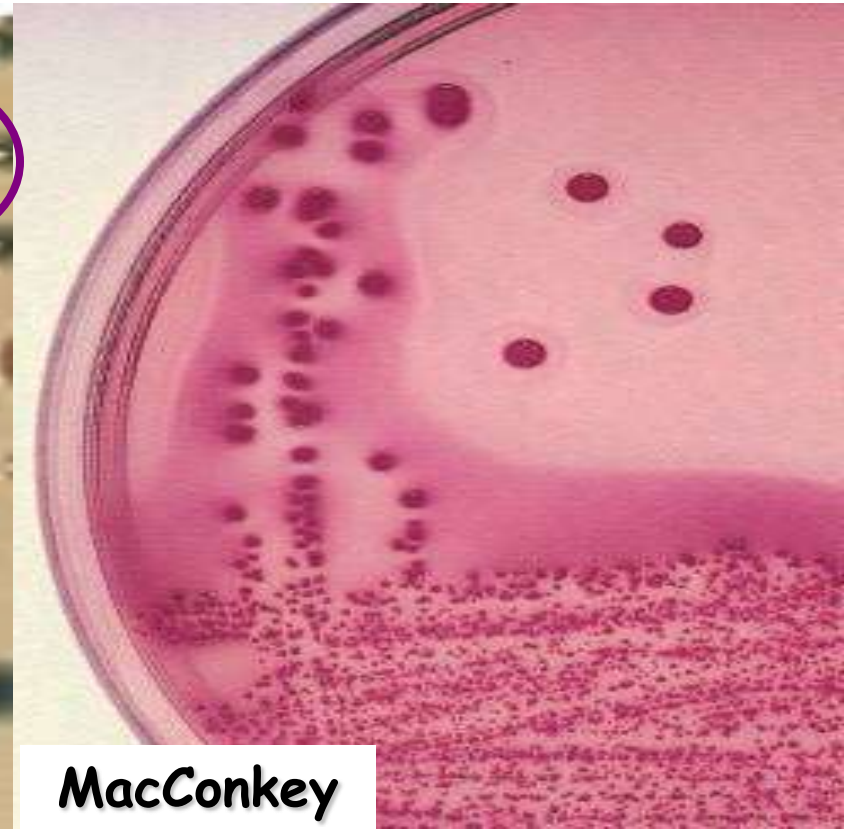
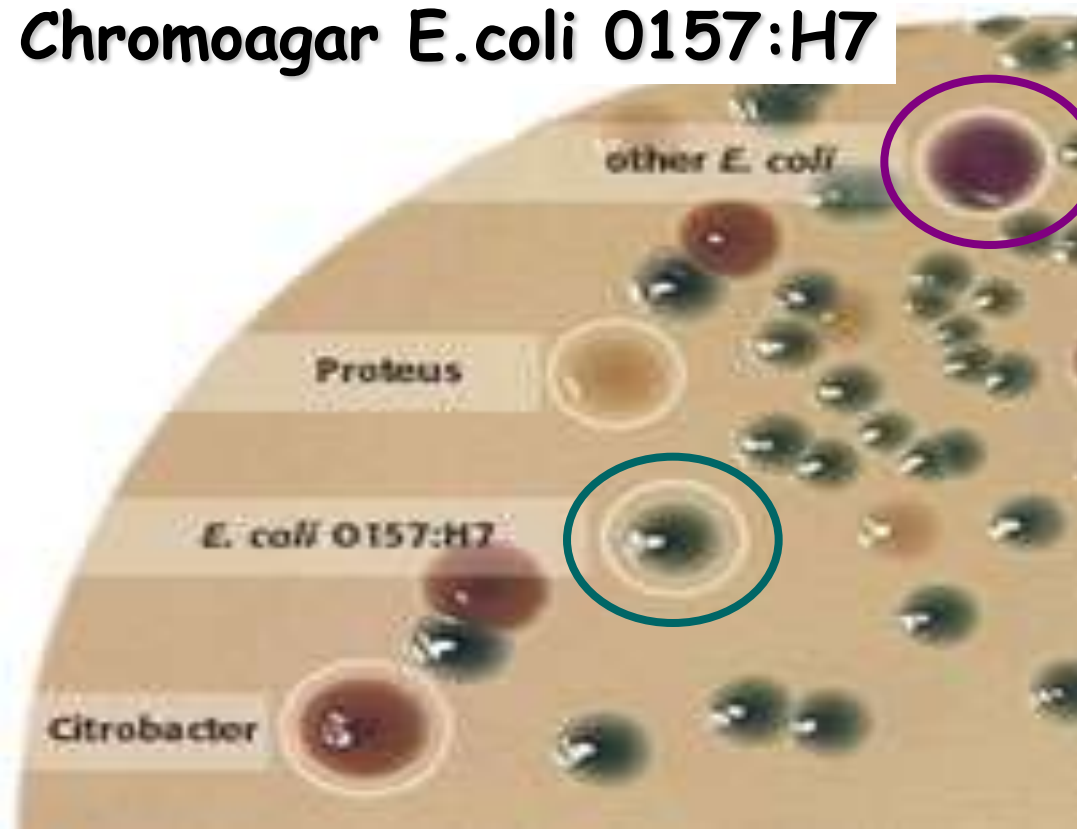


MacConkey agar

Χρωμογόνα Θρεπτικά υλικά

- Διαφοροποιητικά υλικά.
- Περιέχουν ειδικά χρωμογόνα υποστρώματα που όταν έρθουν σε επαφή με τα ένζυμα του μικροβίου ή μύκητα παράγουν χρώμα.
- Συμβάλλουν στην προκαταρκτική ταυτοποίηση.

Chromoagar E.coli O157:H7



MacConkey

Sabouraud άγαρ

Κλασσικό μυκητολογικό υλικό

Κατάλληλο για δείγματα ρουτίνας

Όχι πολύ καλό για απαιτητικούς και βραδείας αναπτύξεως μύκητες

Τροποποιήσεις: με αντιβιοτικά

με ακτιδιόνη

με δεξτρόζη 2%

με λάδι → *Malassezia*

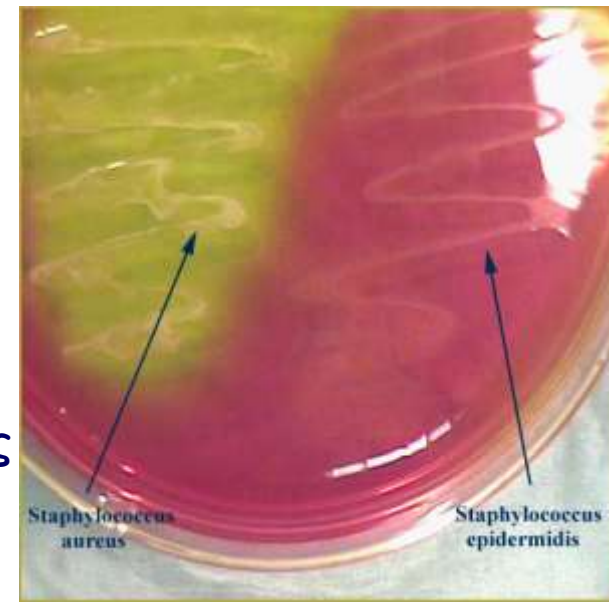


Charman (Mannitol άγαρ)

Εκλεκτικό και διαφοροποιητικό

Αναπτύσσονται: όλοι οι σταφυλόκοκκοι και αλατόφιλα βακτήρια

S. aureus: ζύμωση μαννιτόλης → κίτρινες αποικίες

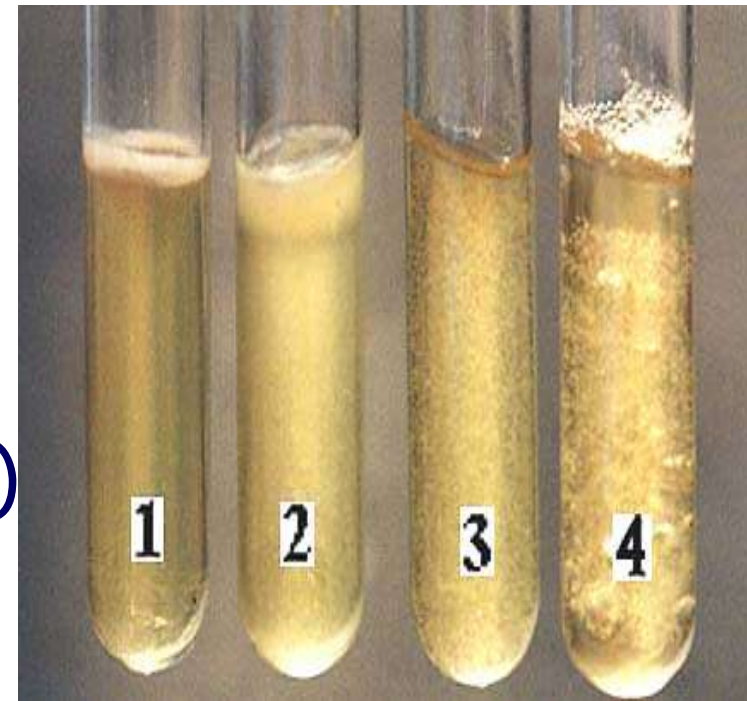


Αερόβια καλλιέργεια ρουτίνας

III. Εμπλουτιστικά

Θρεπτικοί ζωμοί

- ✓ Brain heart infusion (BHI)
- ✓ Tryptic soy broth (TSB)
- ✓ Thioglycolate (THIO)
- ✓ Chopped meat broth (CMB)



Αναερόβια καλλιέργεια ρουτίνας

Θρεπτικά υλικά αναεροβίων

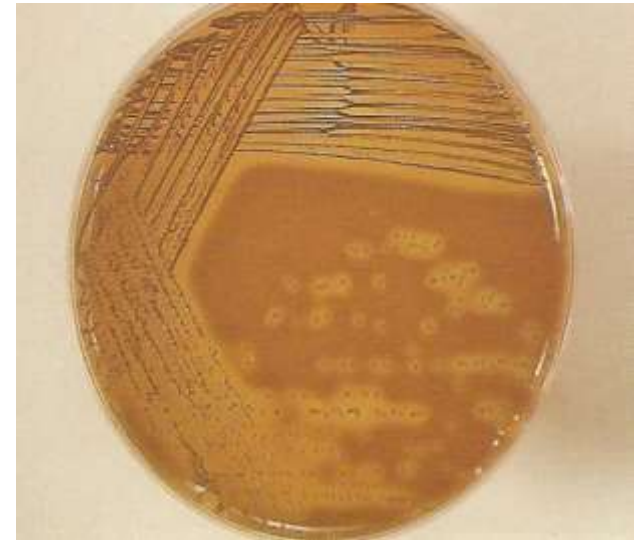
- ✓ Παρουσία αιμίνης (5 $\mu\text{g/ml}$) και βιταμίνης K (1 $\mu\text{g/ml}$)
- ✓ Ιδανικά υλικά τα λιγότερο εκτεθειμένα στο O_2 , φρέσκα, προανηγμένα

Αιματούχο αναερόβιο

Μη εκλεκτικό, εμπλουτιστικό
Αίμα προβάτου 5%

Αναπτύσσονται: όλα τα κλινικώς
σημαντικά αναερόβια

- ✓ BHI blood agar
- ✓ Brucella blood agar
- ✓ CDC anaerobe agar
- ✓ Columbia blood agar
- ✓ TSA blood agar
- ✓ Schaedler blood agar



KVLB ή LKV (Kanamycin-Vancomycin-Laked-Blood agar)

ΕΚΛΕΚΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

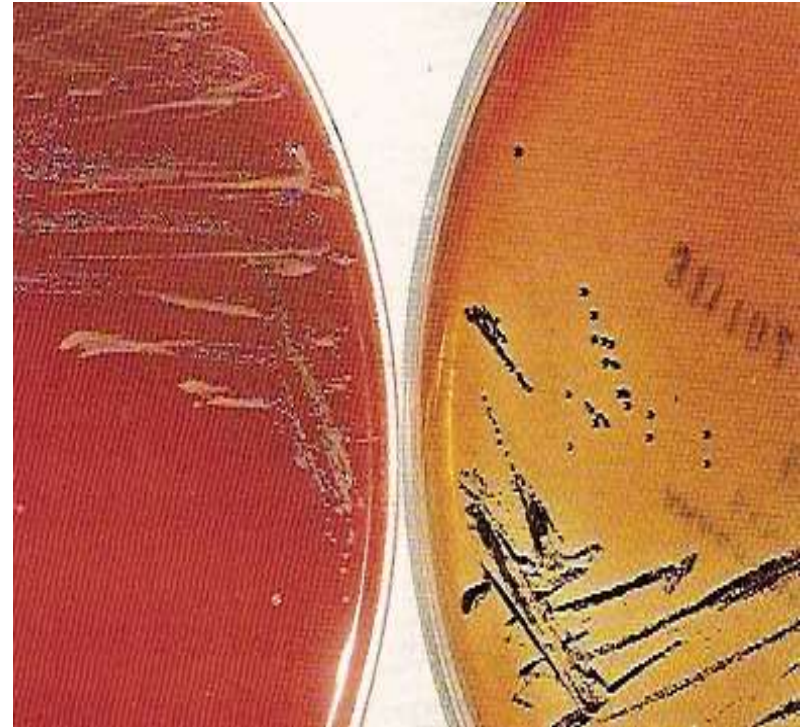
καναμυκίνη 75mg, βανκομυκίνη 7,5mg,
αιμολυμένο αίμα προβάτου

- **Αναπτύσσονται:** βακτήρια ανθεκτικά στην καναμυκίνη και την βανκομυκίνη

Bacteroides group
Prevotella spp (εμφάνιση χρωστικής)

- **Αναστέλλονται:** τα περισσότερα αερόβια και αναερόβια ευαίσθητα στην καναμυκίνη και τη βανκομυκίνη

Porphyromonas spp



BBE

(*Bacteroides bile esculin agar*)

Εκλεκτικό και διαφοροποιητικό

Χολή βοός 20%, εσκουλίνη,
εναμμώνιο κιτρικούχο σίδηρο, γενταμικίνη 100μg/ml

➤ Αναπτύσσονται:

- ✓ *Bacteroides fragilis* group (μαύρες αποικίες)
- ✓ μερικά *Fusobacterium*,
- ✓ *Bilophila wadsworthia*
- ✓ Εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στη γενταμικίνη
- ✓ Εντερόκοκκοι, μύκητες

➤ Αναστέλλονται:

τα περισσότερα αερόβια και αναερόβια



ΡΕΑ (Phenylethyl alcohol agar)

Εκλεκτικό υλικό με αίμα προβάτου

L-κυστεΐνη, άγαρ, αίμα προβάτου, phenylethyl alcohol

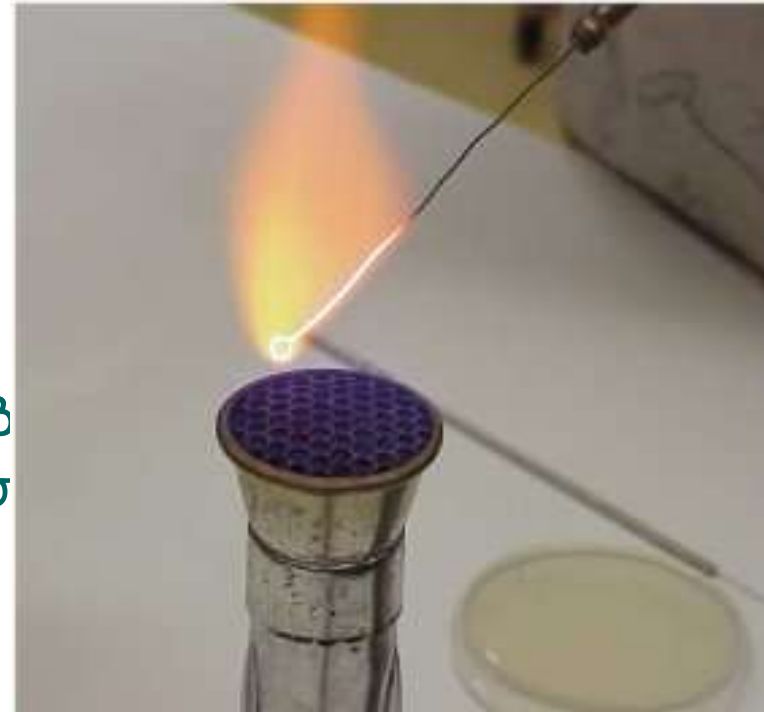
Αναπτύσσονται: τα περισσότερα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά αναερόβια βακτήρια

Αναστέλλονται: - δυνητικά αναερόβια Gram(-) βακτηρίδια
- ερπυσμός του *Proteus* spp. και του *Clostridium septicum*

Ενοφθαλμισμός κλινικών δειγμάτων

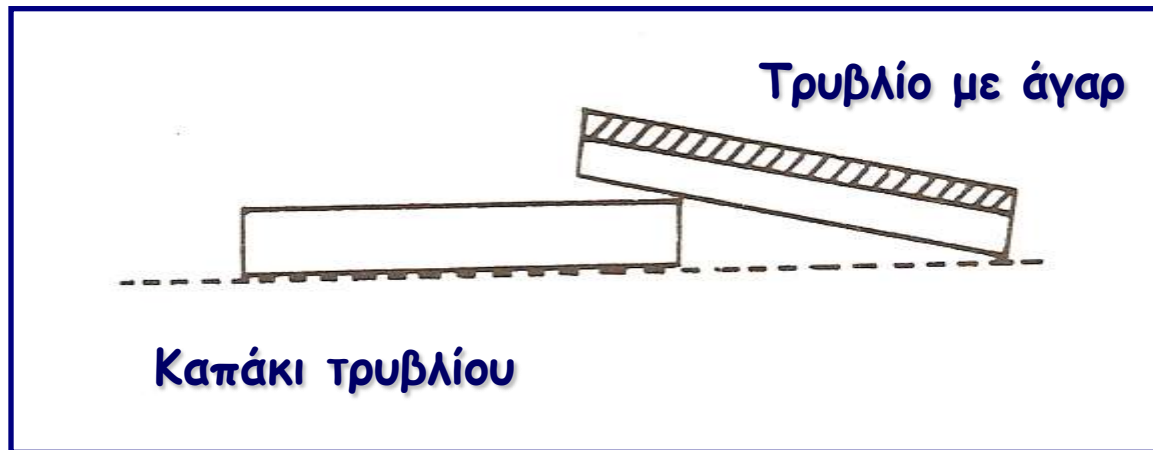
Απαραίτητος εξοπλισμός

- ✓ Κατάλληλα θρεπτικά υλικά
- ✓ Αντιδραστήρια χρώσεων
- ✓ Αναλώσιμα όπως:
 - κρίκοι ενοφθαλμισμού
 - αντικειμενοφόρες πλάκες
 - αποστειρωμένα: ψαλίδι, λαβ
 - στυλεός, σ
- ✓ Τεχνολογικός εξοπλισμός:
 - Θάλαμος νηματικής ροής
 - Επωαστικοί κλίβανοι
 - Λύχνος Bunsen



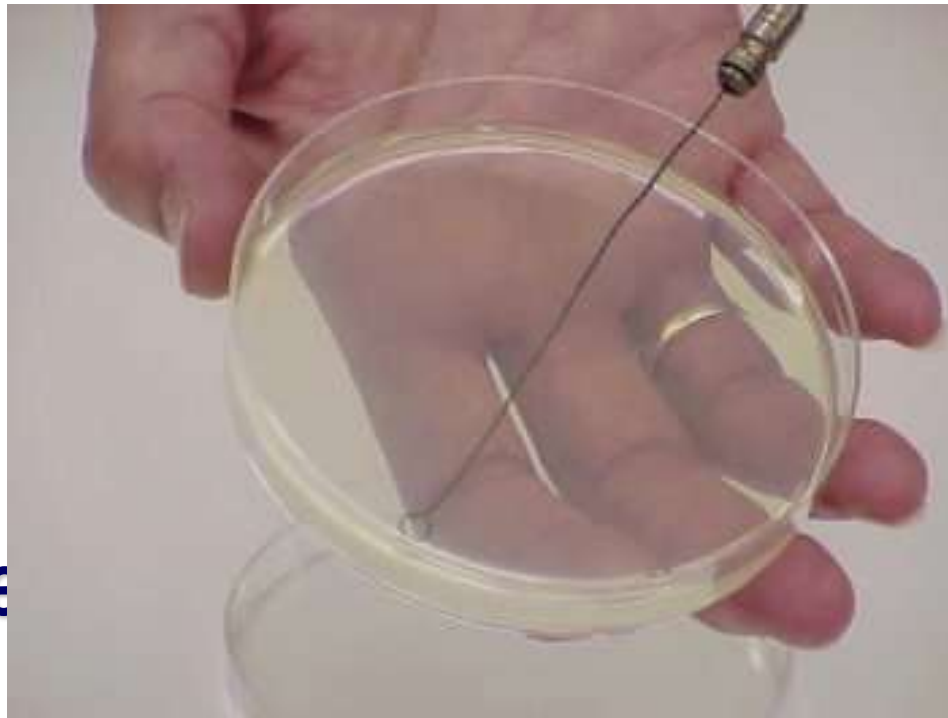
Προετοιμασία τρυβλίου για ενοφθαλμισμό

Στεγνώνουμε πάντα τα τρυβλία !!
(κλίβανος O_2 , 10-30 min)



Τεχνικές ενοφθαλμισμού

- Σε στερεό θρεπτικό υλικό (τρυβλίο)

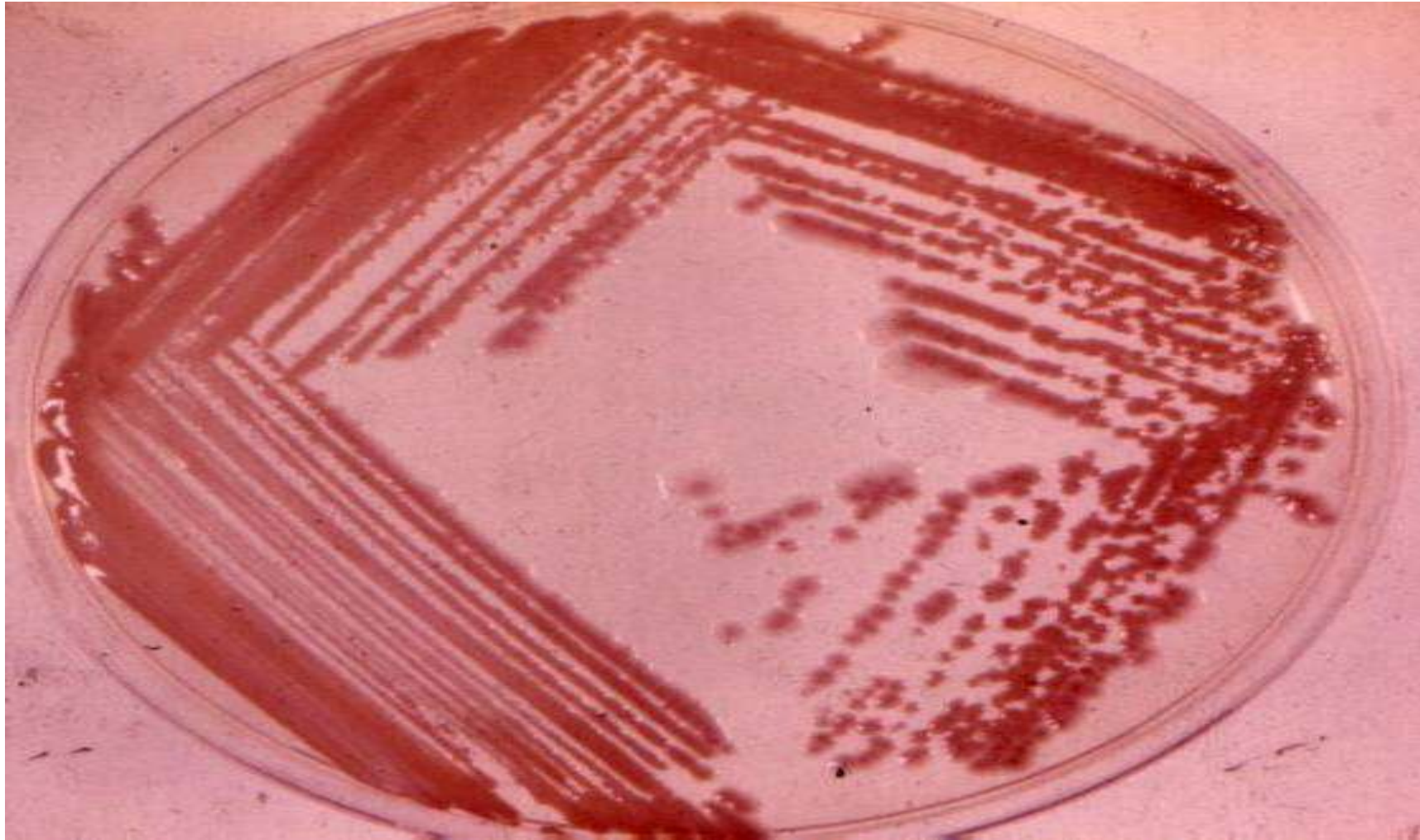


έργεια

- Σε υ

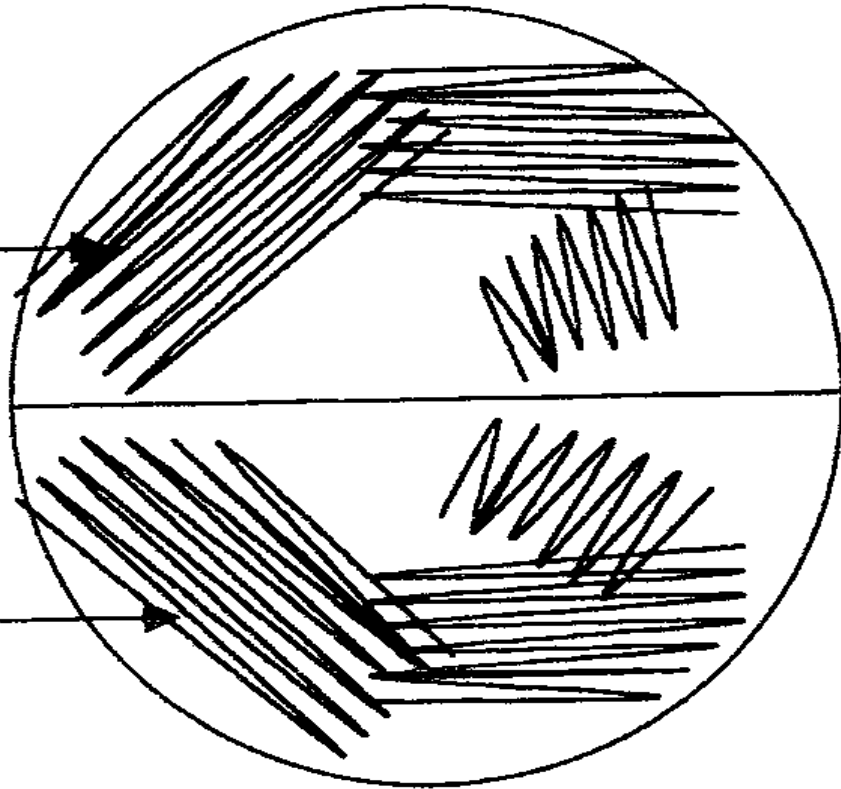
μίρρευστο)

Τεχνική για απομόνωση αποικιών σε ολόκληρο τρυβλίο



Τεχνική για απομόνωση αποικιών σε μισό τρυβλίο

Βιολογικό
δείγμα



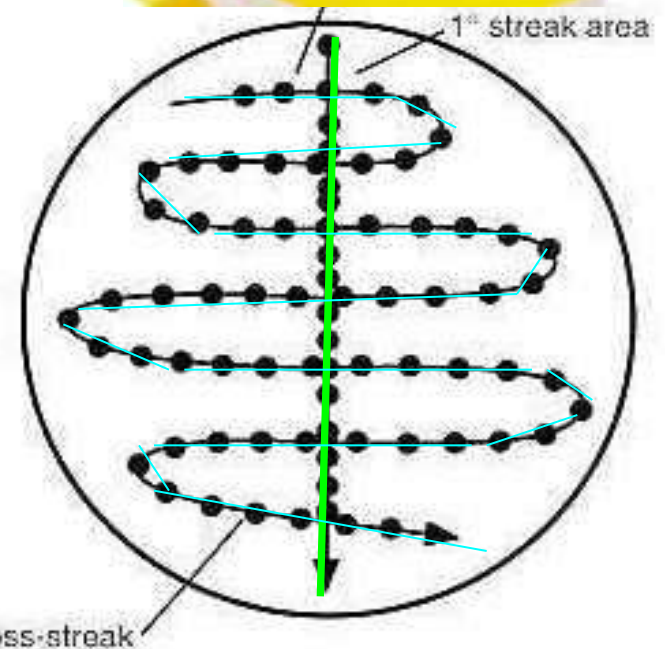
Προσδιορισμός των μονάδων παραγωγής αποικιών (colony forming units, cfu)

Καλλιέργεια ούρων

Βαθμονομημένος κρίκος

1 μ l \times 1000 cfu/ml

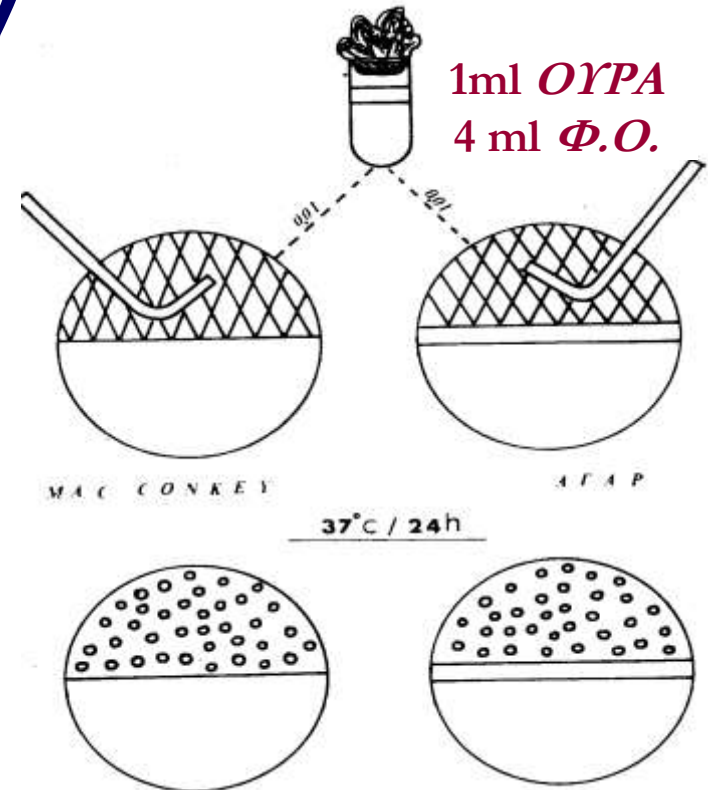
10 μ l \times 100 cfu/ml



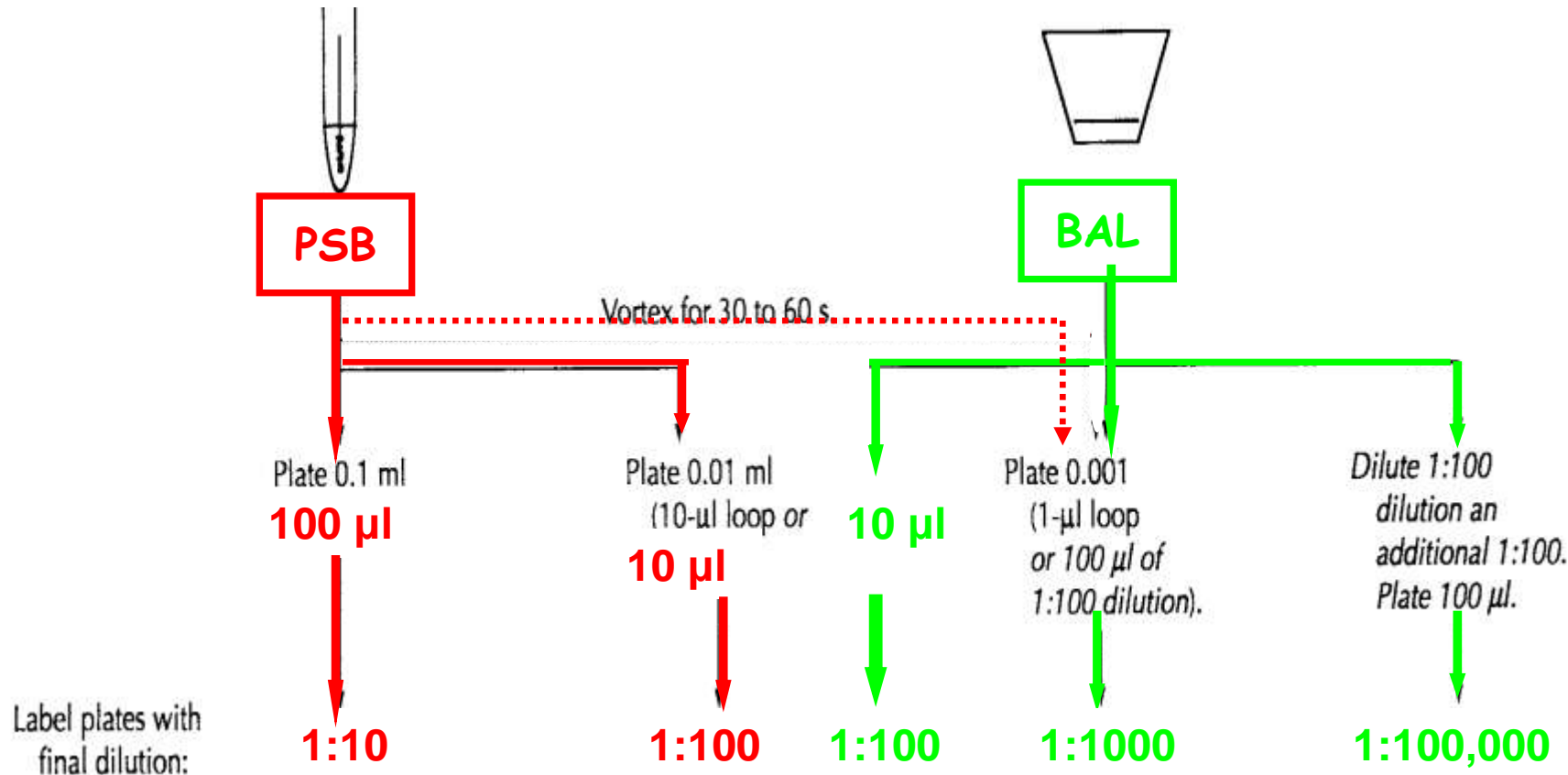
Προσδιορισμός των μονάδων παραγωγής αποικιών (colony forming units, cfu)

Καλλιέργεια ούρων

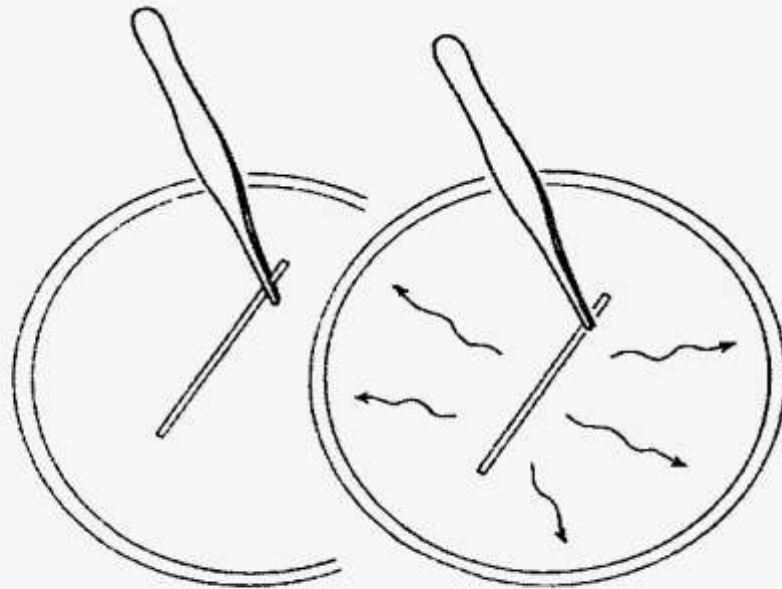
Μετά από αραιώση



Δείγμα με προστατευμένη βούρτσα (PSB) Βρογχοκυψελιδικό Έκπλυμα (BAL)



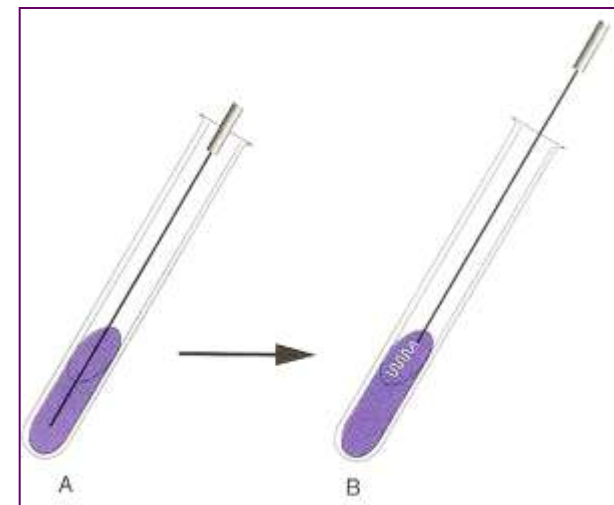
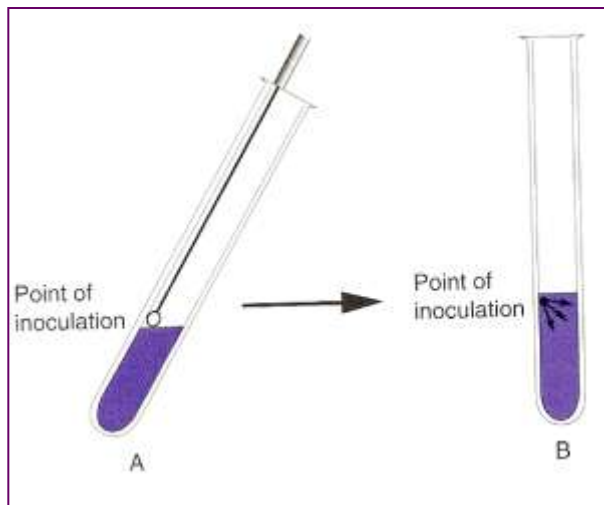
Μέθοδος Μaki



Ενοφθαλισμός άκρου καθετήρα στο άγαρ

>15 cfu: πιθανή λοίμωξη σχετιζόμενη με τον καθετήρα

Ενοφθαλμισμός σε σωληνάριο με υγρό και στερεό θρεπτικό υλικό



Υγρό θρεπτικό υλικό

Άγαρ με κεκλιμένη επιφάνεια



Άμεσο παρασκεύασμα

Άμεσο παρασκεύασμα κατά Gram

- **Γίνεται σε δείγματα:**
στείρων βιολογικών υγρών, πύου, κατώτερου αναπνευστικού, γεννητικού συστήματος, ούρων.
- **Δε γίνεται σε δείγματα:**
ρινικού, φαρυγγικού, κοπράνων, άκρων ενδαγγειακών καθετήρων.
- Σε ανεπαρκή ποσότητα δείγματος παραλείπεται η Gram χρώση και όχι η καλλιέργεια

Μετά τον εμβολιασμό θα φυλάξουμε τα βιολογικά δείγματα:

κόπρανα, ούρα

ΟΧΙ

δείγματα από στείρες περιοχές

7ημ., 4°C

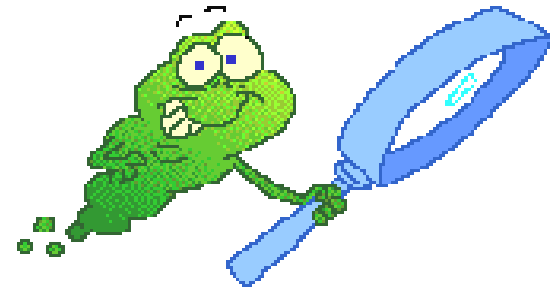
δείγματα από μη στείρες περιοχές

1-2ημ., 4°C

ENV (PCR)

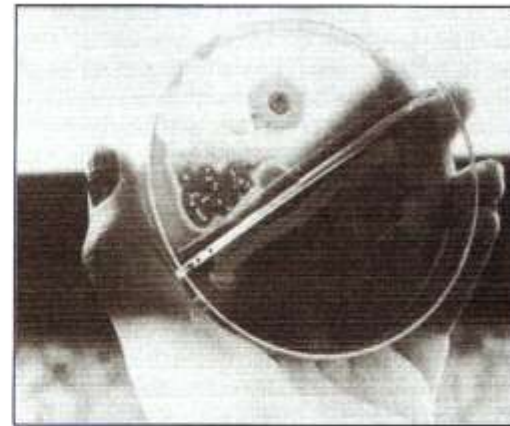
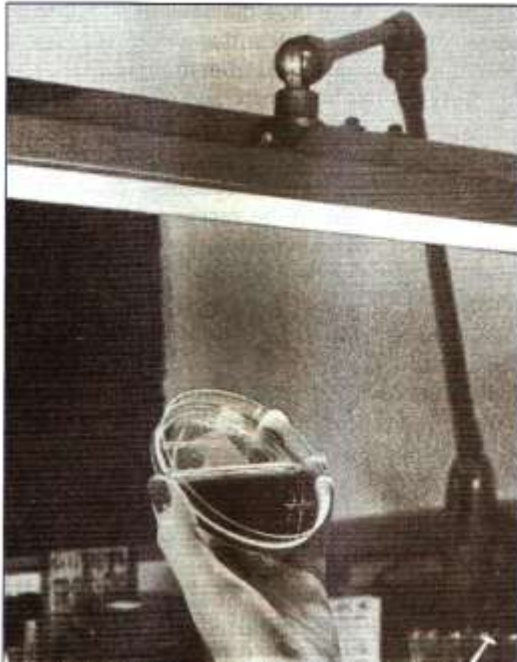
-20 °C

Ερμηνεία πρωτοκαλλιέργειας



1. Αρίθμηση αποικιών
2. Μακροσκοπική εξέταση μορφολογίας αποικιών
3. Μικροσκοπική εξέταση μορφολογίας μικροβίου (Gram χρώση)
4. Προκαταρκτική ταυτοποίηση παθογόνου μικροβίου - Αναφορά αποτελέσματος
5. Η σημασία της καθαρής καλλιέργειας

Προσπίπτων-Διελαύνων φωτισμός



Αριστερά: προσπίπτων φωτισμός
Δεξιά: διελαύνων φωτισμός

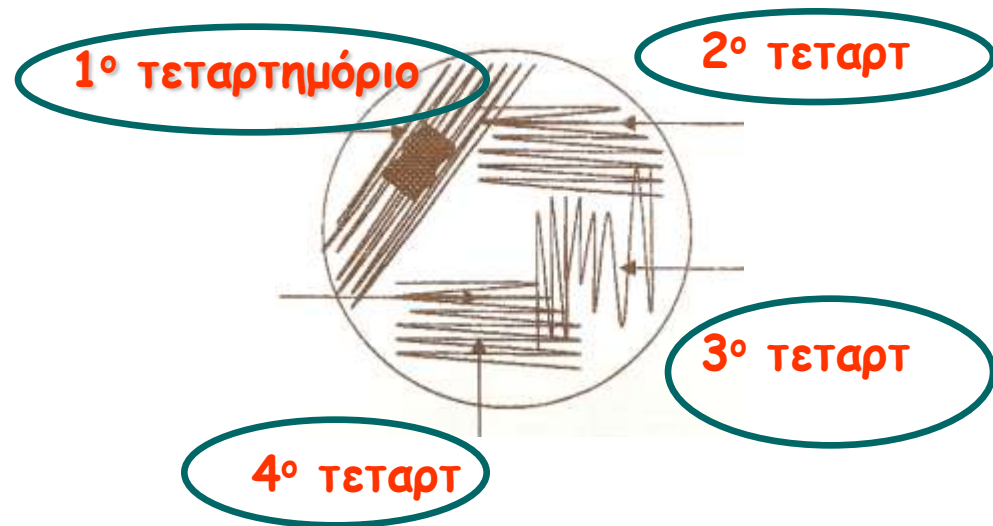
1. Αρίθμηση αποικιών

○ Σπάνια ανάπτυξη → 1-5 αποικίες



Αριθμός + cfu/ml
Αριθμός + cfu

ποσοτικές καλλιέργειες
άκρα ενδαγγειακών καθετήρων



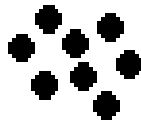
2. Μακροσκοπική εξέταση μορφολογίας αποικιών

Περιγραφή μορφολογίας αποικιών

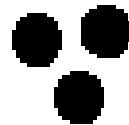
- Μέγεθος
- Χρώμα
- Σχήμα
- Εμφάνιση επιφανείας
- Ύψος
- Πυκνότητα
- Περιφέρεια
- Σύσταση

Περιγραφή μορφολογίας αποικιών

Σχήμα



Punctiform



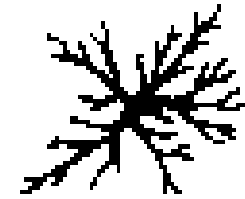
Circular



Filamentous



Irregular



Rhizoid



Spindle (lens)

Ύψος



Flat



Raised



Convex

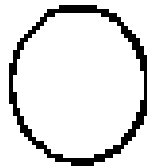


Pulvinate

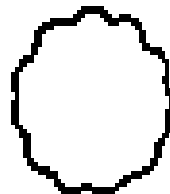


Umbonate

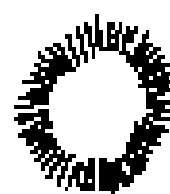
Περιφέρεια



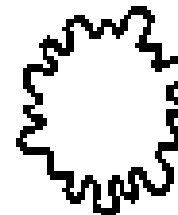
Entire
(even)



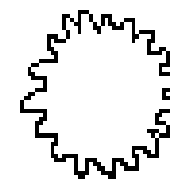
Undulate
(wavy)



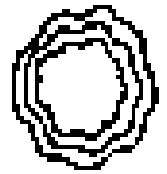
Filamentous



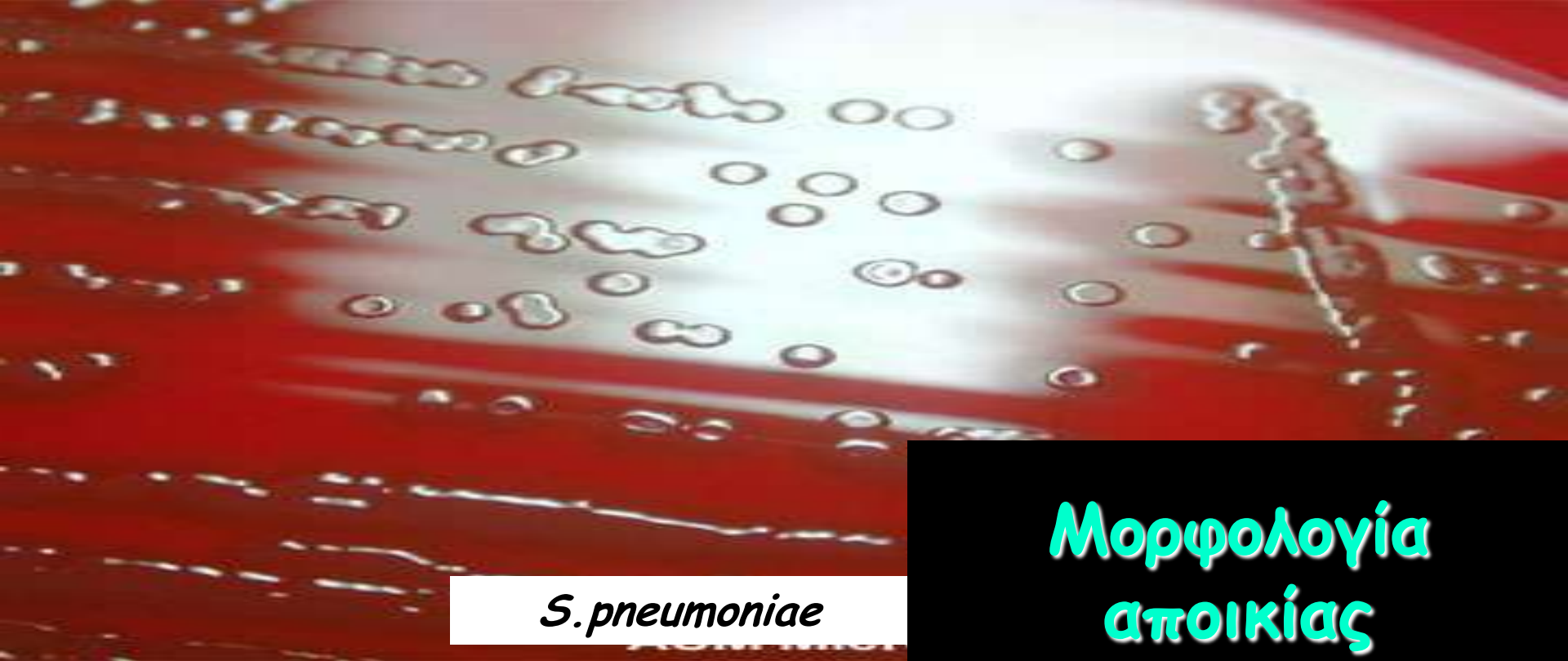
Lobate
(lobes)



Erose
(serrated)



Curled



S. pneumoniae

**Μορφολογία
αποικίας**



Pasterella multocida



Serratia marcescens

Συσχέτιση μορφολογίας αποικιών στα διάφορα υλικά



Blood agar



MacConkey
agar

E. coli



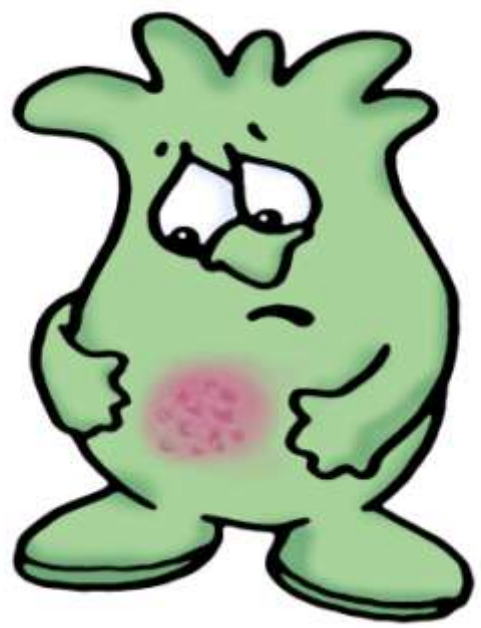
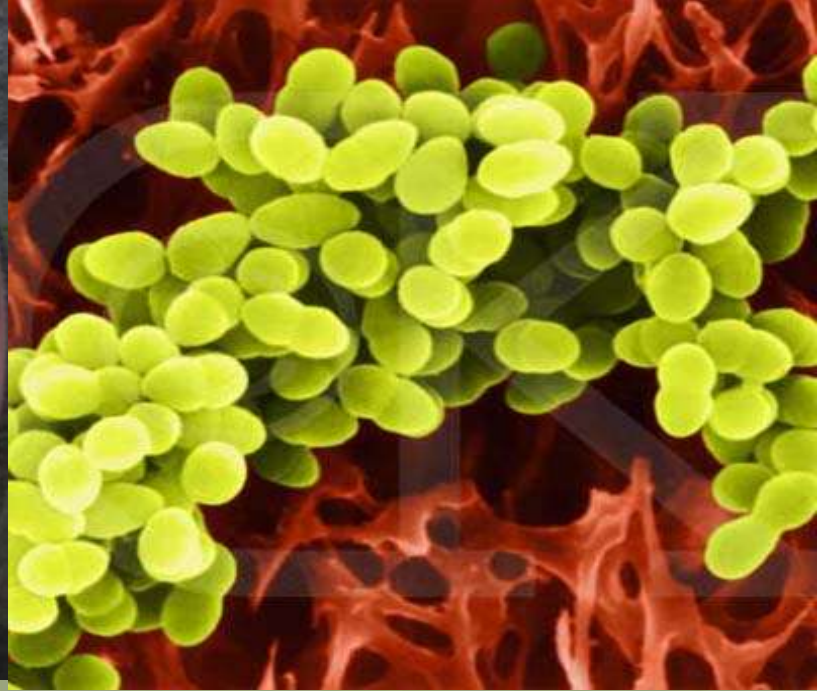
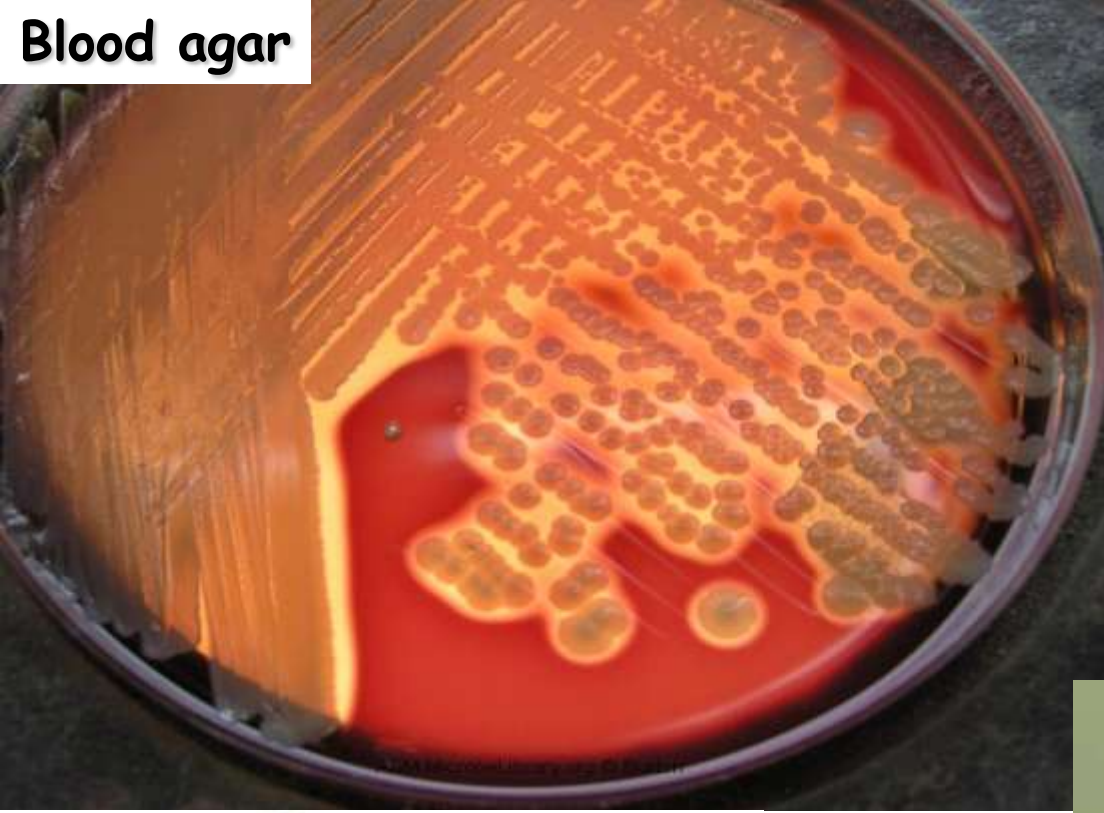
Blood agar



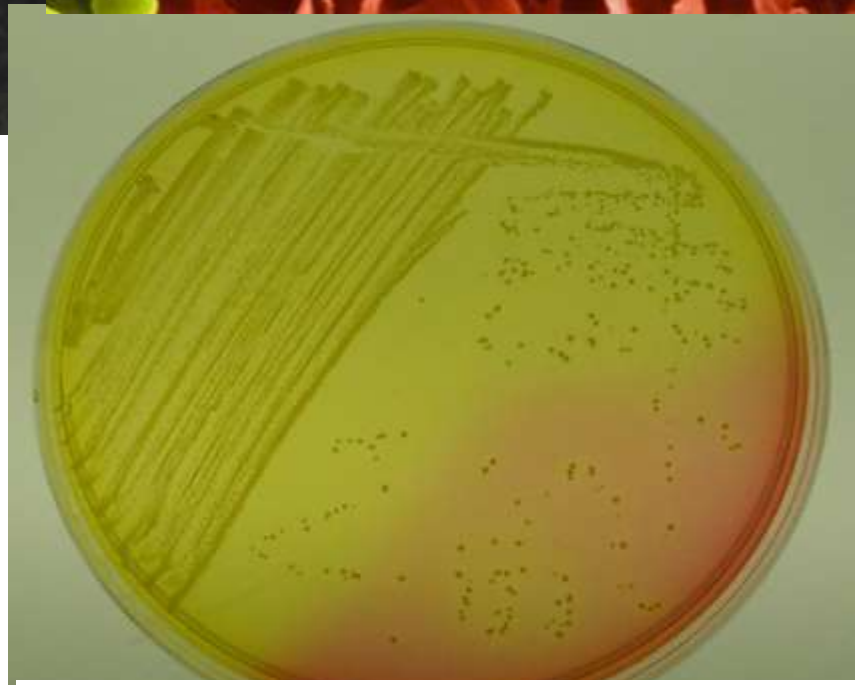
MacConkey
agar

Proteus mirabilis

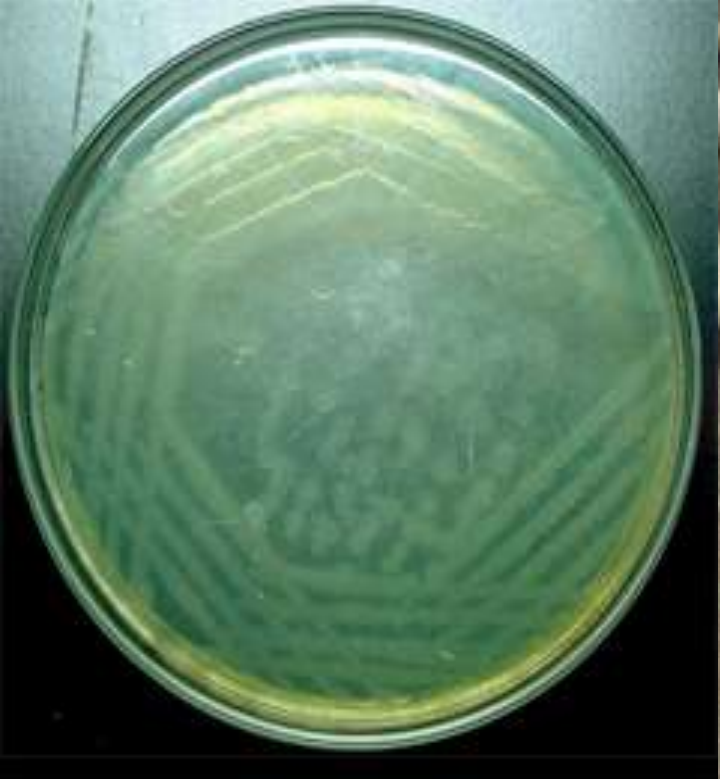
Blood agar



St. aureus



Mannitol salt agar (Chapman)



Pseudomonas aeruginosa

Χρώμα αποικίας



Serratia marcescens

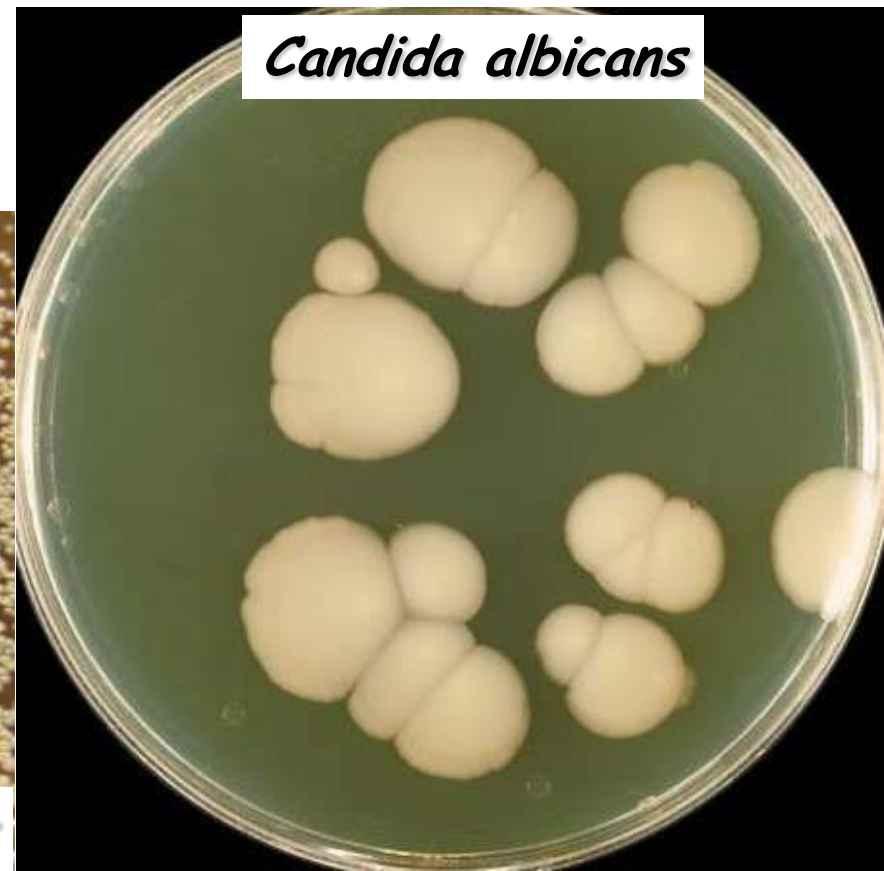


Klebsiella pneumoniae

Σύσταση αποικίας

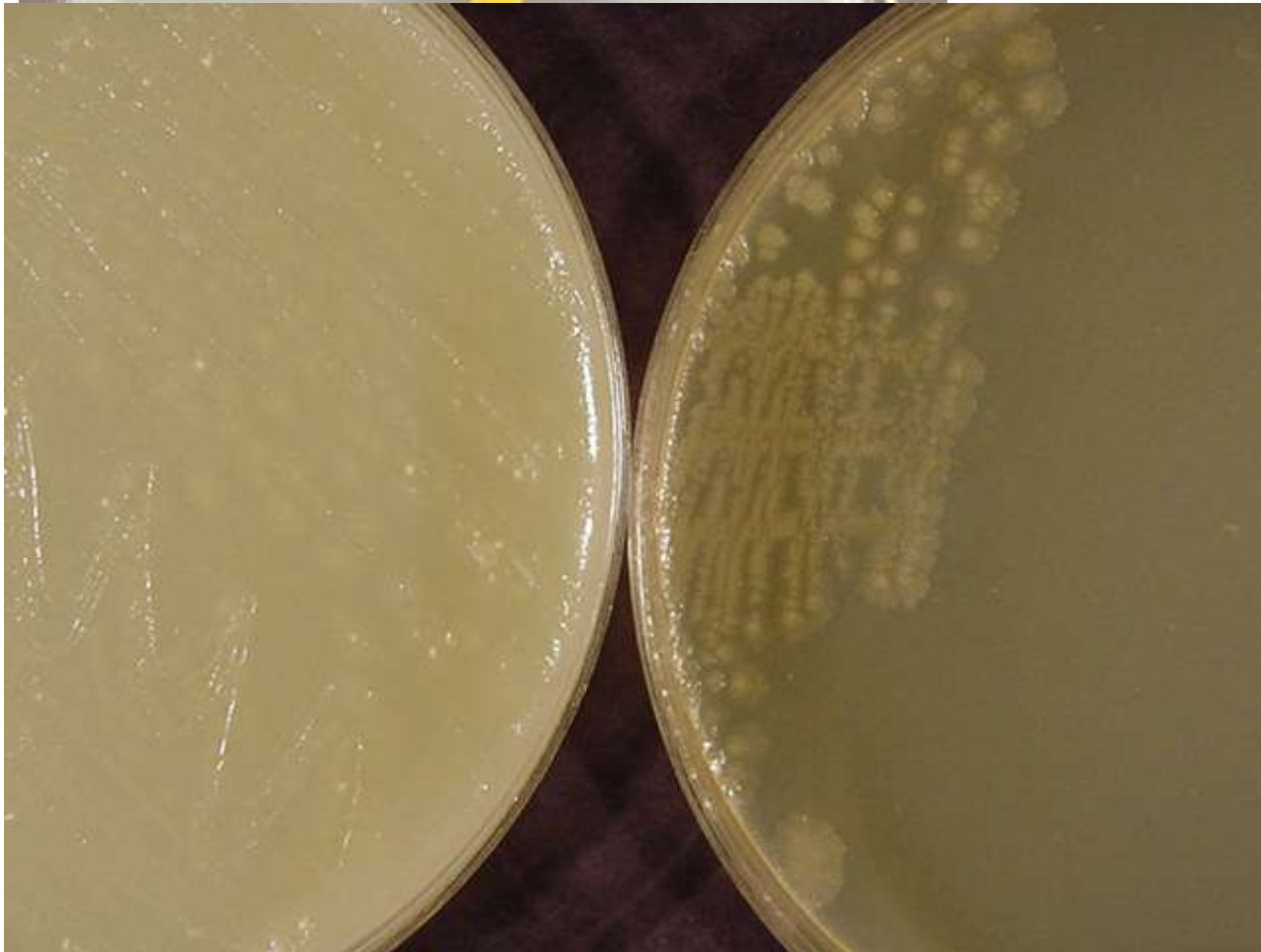


Nocardia asteroides



Candida albicans

ΘΡΕΠΤΙΚΟ



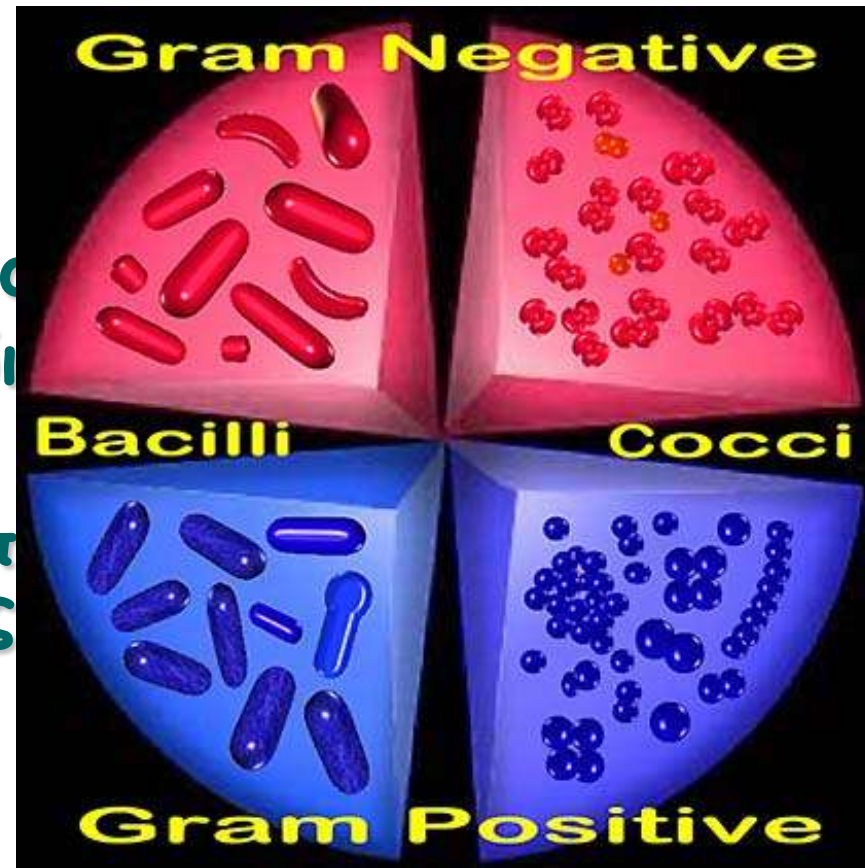
P. aeruginosa

Χαρακτηριστική οσμή

- *P. aeruginosa*: «γιασεμί»
- *Proteus mirabilis*: «καμένη σοκολάτα»
- *Streptococcus milleri* group: «καραμέλα»
- *Eikenella corrodens*: «χλωρίνη»

3. Μικροσκοπική εξέταση μορφολογίας μικροβίου (Gram χρώση)

- Gram (+) , Gram(-)
- Βακτηριακό κύτταρο: ο
διάταξη, παρουσία ειδικών
- Ανάλογα συνθηκών επ
καλλιέργειας και είδος



Οξυγονοάντοχο
C. tertium

Αερόβιες συνθήκες

Αναερόβια επώαση

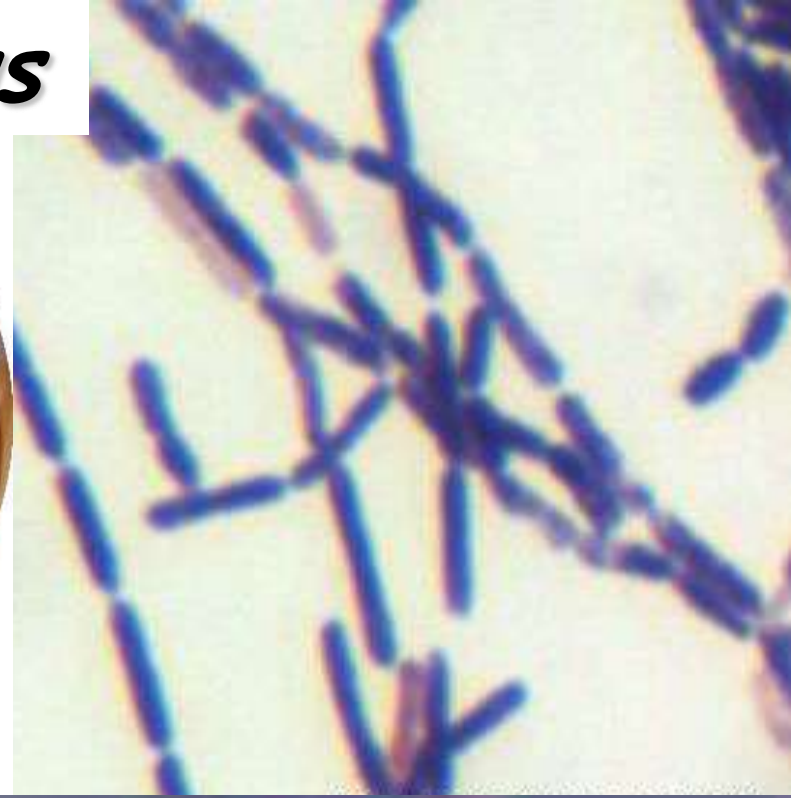
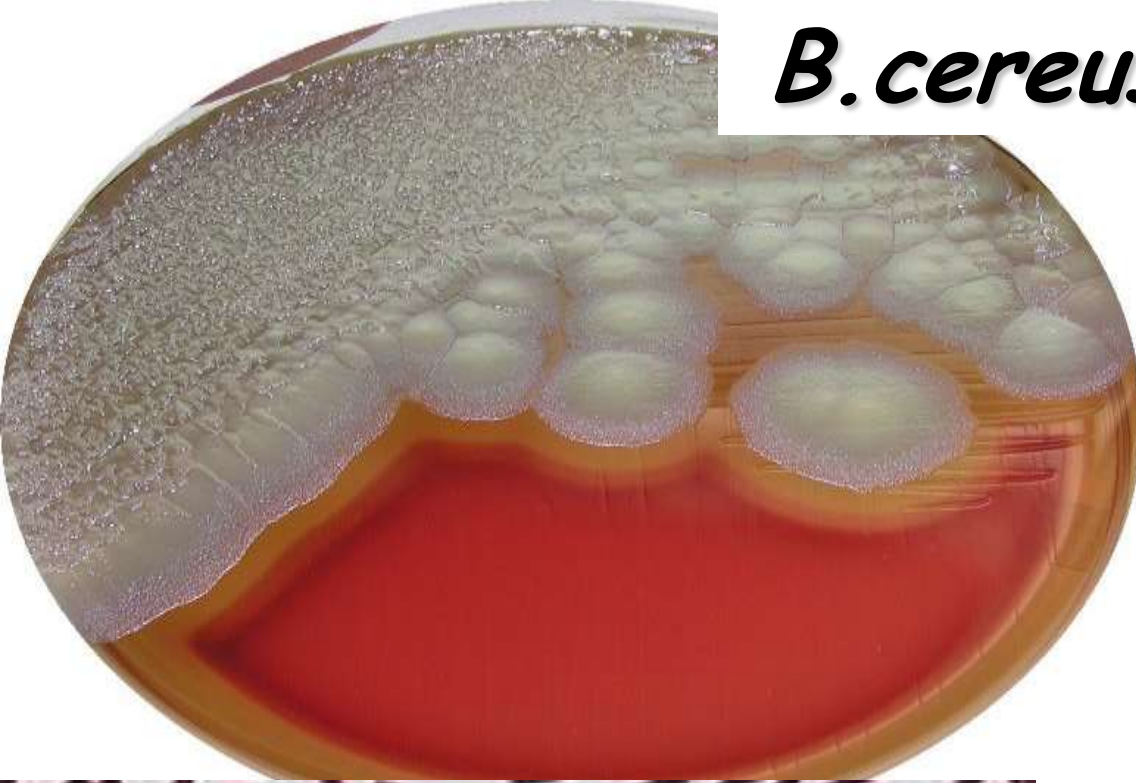


Μορφολογία αποικίας στο Θρεπτικό υλικό

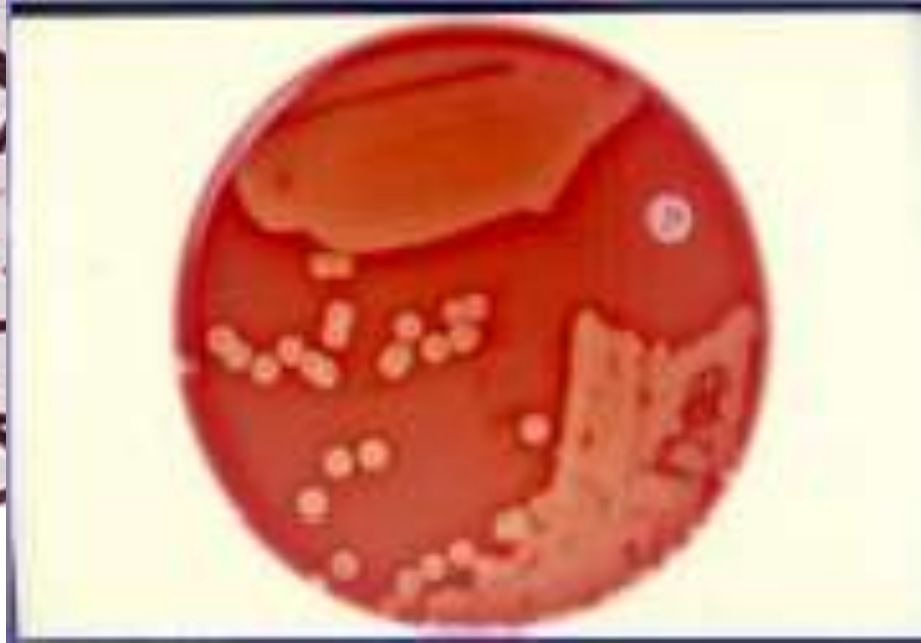


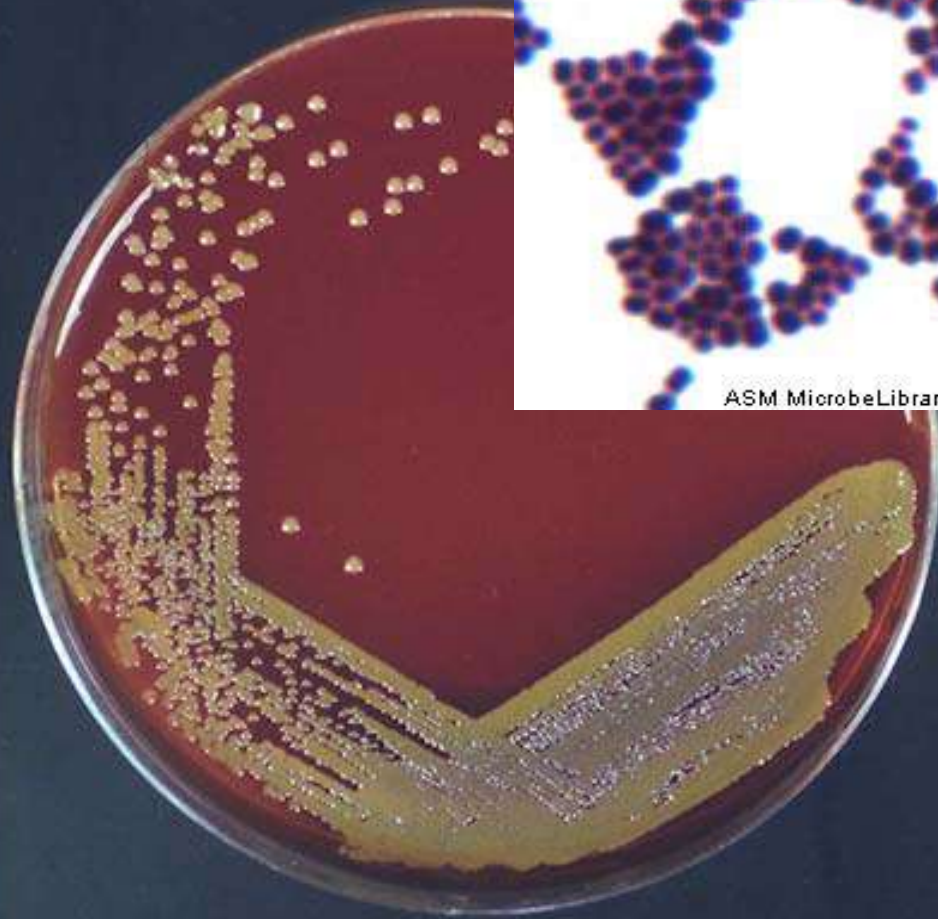
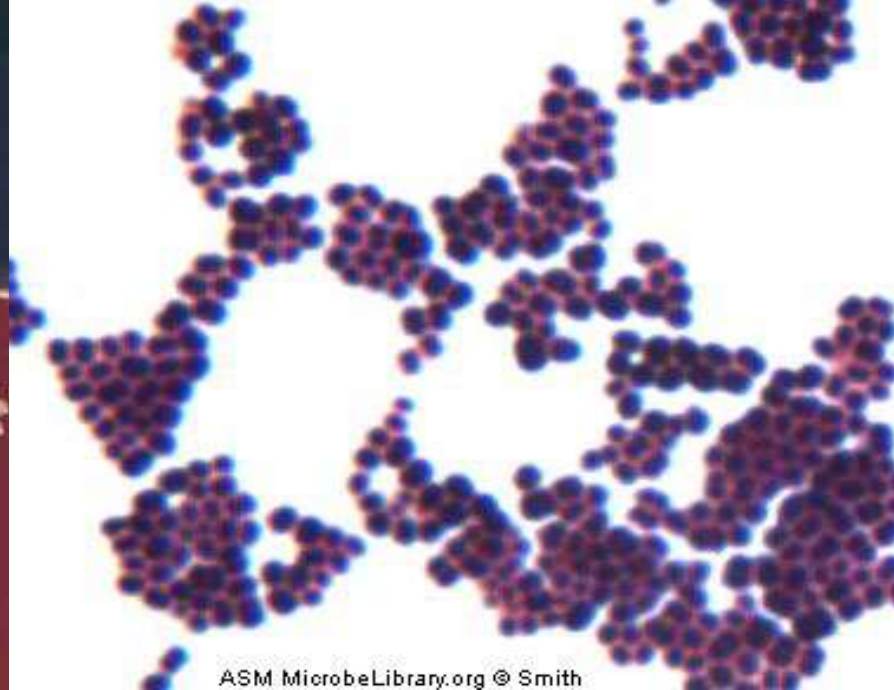
Μικροσκοπική εξέταση μορφολογίας
μικροβίου (Gram χρώση)

B. cereus

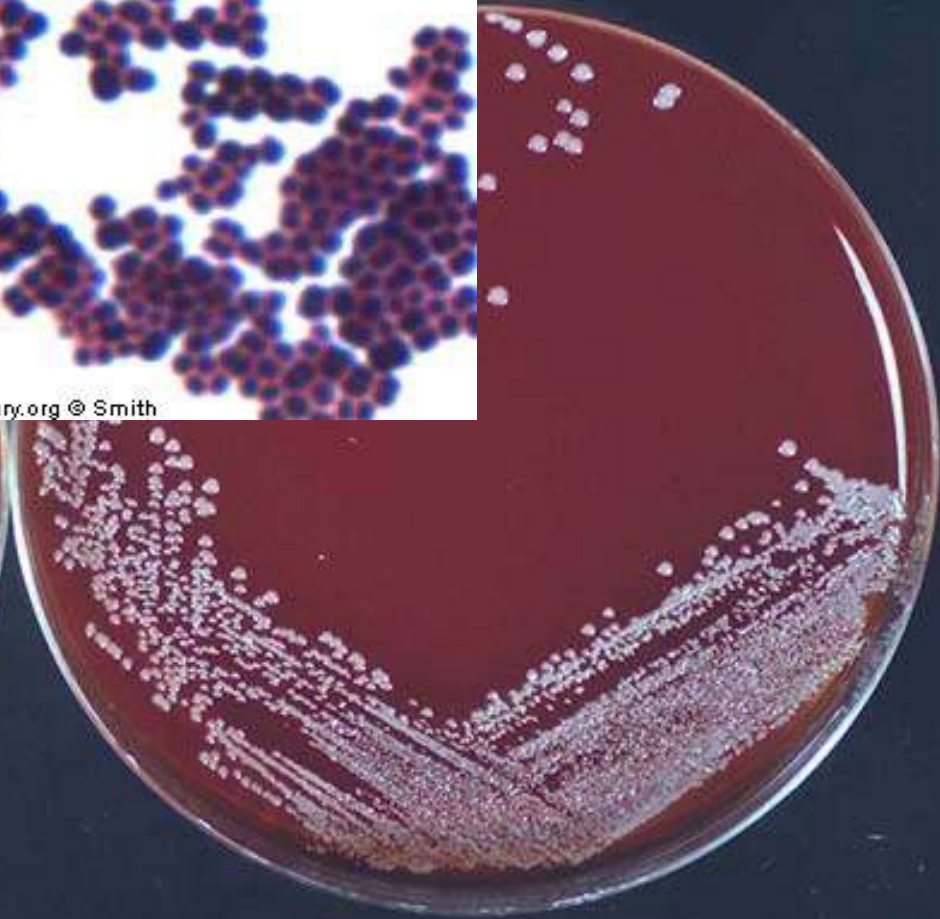


C. perfringens





S. aureus



S. epidermidis

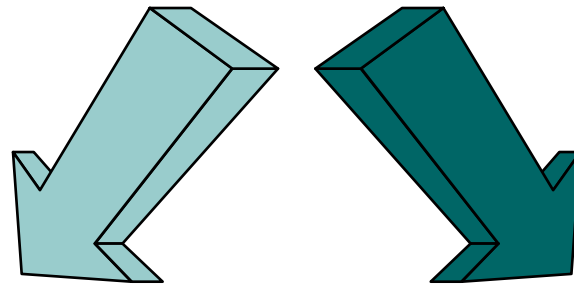
Προκαταρκτική ταυτοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού

Μεμονωμένες αποικίες

→ Προκαταρκτική ταυτοποίηση με άμεσες, ταχείες ταυτοποιητικές δοκιμές και αναφορά αποτελέσματος.

Ανακαλλιέργεια για μεμονωμένες αποικίες.

Η σημασία της καθαρής καλλιέργειας



**Τελική Ταυτοποίηση
μικροοργανισμού**

- Χρώσεις
- Βιοχημικές δοκιμές
- Ορολογικές δοκιμές
- Μοριακή τυποποίηση

**Προσδιορισμός
ευαισθησίας
στα αντιμικροβιακά**

