



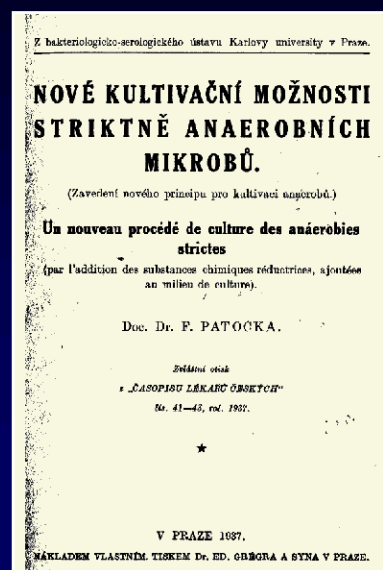
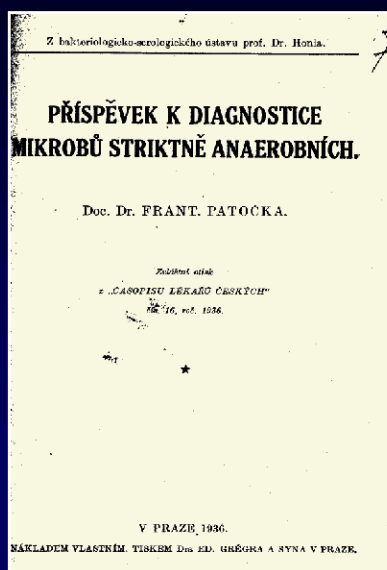
Aktuální možnosti kultivace v definované plynové atmosféře

Tomáš Látal¹, Dittmar Chmelař²

¹ Trios spol. s r.o., Praha, CZ

² NRL pro anaeroby, ZÚ se sídlem v Ostravě, CZ

Je něco nového ?



Úvod: názvosloví a definice

Rozdělení bakterií dle vztahu ke složení atmosféry

- anaerobní
- anaerobní aerotolerantní
- kapnofilní
- organismy, které pro reprodukci a přežití nepotřebují molekulární O_2
- schopné růstu v atmosféře obsahující molekulární O_2 , lépe však rostou bez jeho přítomnosti
- mohou nebo nemusí být anaerobní, ale rostou lépe v přítomnosti zvýšené koncentrace CO_2

Úvod: názvosloví a definice

Rozdělení bakterií dle vztahu ke O_2

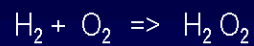
- fakultativně anaer.
- mikroaerotolerantní
- anaerby extrémně citlivé na O_2 (EOS)*
- striktně anaer.
- umírněně anaer.
- reprodukují se shodně v přítomnosti i nepřítomnosti O_2
- rostou v anaerobním prostředí, v mikroaerofilním prostředí (do 5% O_2), ale ne v prostředí >15% O_2 nebo ve vzduchu
- rostou pouze v prostředí bez O_2
- neschopné reprodukce v přítomnosti >0.5% O_2
- neschopné reprodukce v přítomnosti >2-8% O_2

* EOS = extremely oxygen sensitive anaerobes

Úvod

Princip toxicity O₂

- anaerobní bakterie nezabíjí plynný O₂
- toxicita kyslíku – vznik látek se silným oxidačním účinkem – peroxidy, OH⁻



- anaerobní bakterie nemají katalytické systémy eliminující látky se silnými oxidačními účinky – absence kataláz, superoxiddismutáz

Úvod

Vzorky k anaerobnímu vyšetření

- rána, absces, krev, jiné primárně sterilní tělní tekutiny
- maximální zkrácení doby mezi odběrem a inokulací média s minimalizací kontaktu se vzduchem



Úvod

Principy zajištění kult. anaerobních podmínek

- redukční činidlo v médiu
- chemicky generovaná kultivační atmosféra
- odstranění vzduchu a nahrazení bezkyslíkatým plynem

!!! vždy pouze ventilované Petriho misky !!!

Systémy pro chemické generování kultivační atmosféry

???

- Takto už asi ne...



Konstrukce

kovový uzávěr

zavzdušňovací ventil

Schraderův ventil

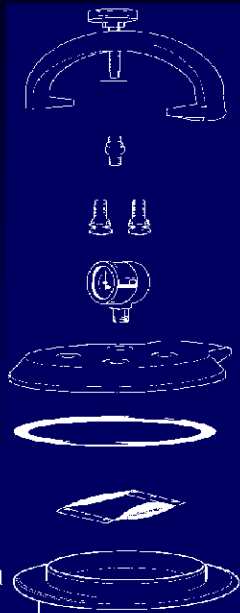
tlakoměr

kovové víko

těsnící kroužek

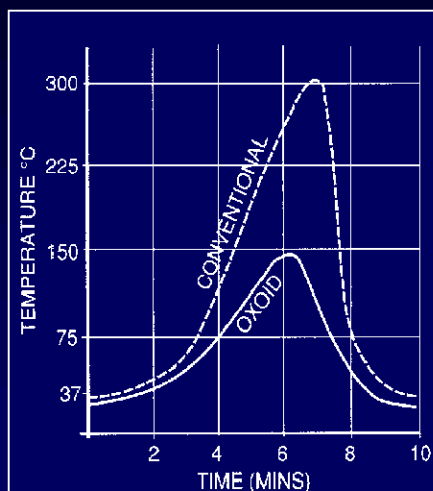
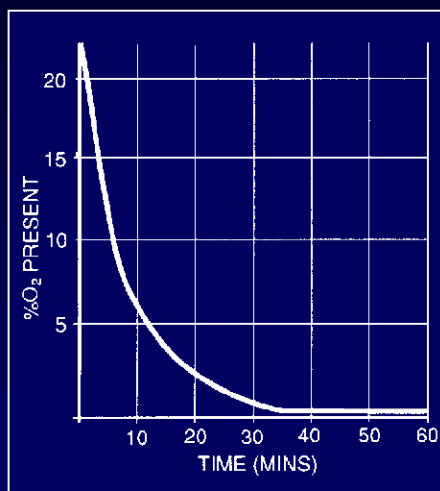
katalyzátor

průhledná kult. nádoba



1998 © Oxoid Manual

Časové souvislosti chemických vyvíječů



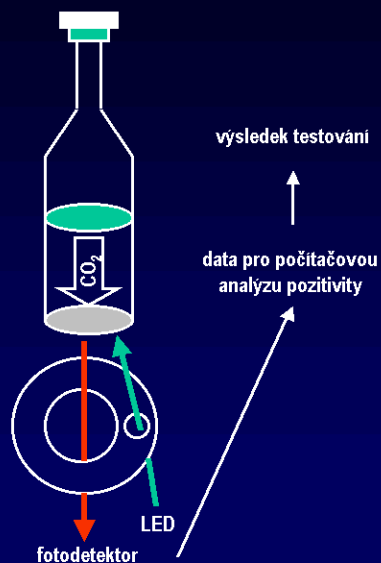
1998 © Oxoid Manual

Zhodnocení

- nepřesný objem zbytkového O_2
- dlouhé ustalování atmosferických poměrů v nádobě
- (ne)těsnost nádob
- zbytkové teplo během katalýzy uvolňované do prostoru kultivační nádoby
- ekonomika ?
- životnost katalyzátorů ?
- životnost nádob ?

Hemokultivační systémy - princip

- lahvička s médiem a definovanou kultivační atmosférou - zlatý standard kultivace hemokultur
- bakterie uvolňují CO_2 do tekutého kultivačního média, barvivo v senzoru reaguje s CO_2
- změna absorpance / změna reflektance => fotodetektor vyhodnocuje změny
- testovací cyklus probíhá 1x / 10 min.



Anaerobní kultivace hemokultur
Hemokultivační systémy



Bactec 9240



Bactec 9050



BacT/Alert 120/240

Foto © P. Čermák

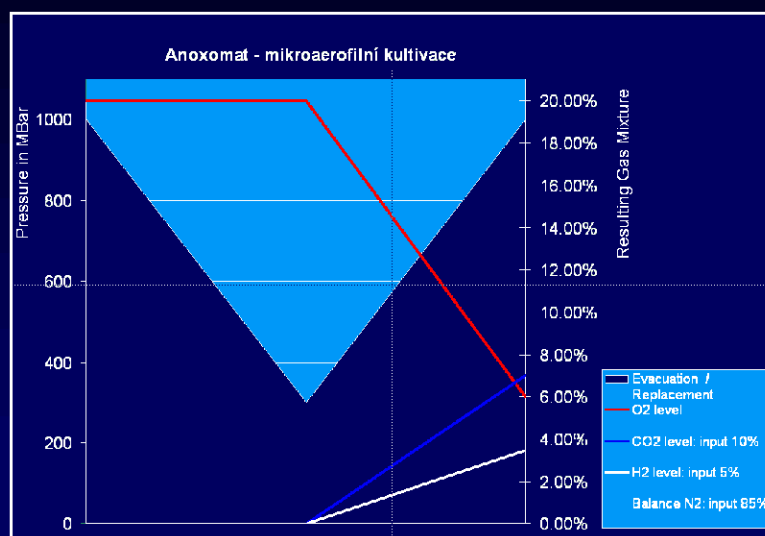
Anaerobní kultivace hemokultur
Zhodnocení

- automatizovaný systém s dokonalou anaerobiózou
- vysoká rychlost detekce positivity
- minimální falešná pozitivita
- limitně nulová falešná negativita
- velmi kvalitní standardní tekuté růstové médium
- vzorek v anaerobióze prakticky od okamžiku odběru
- lze využít i pro jiné primárně sterilní klinické vzorky

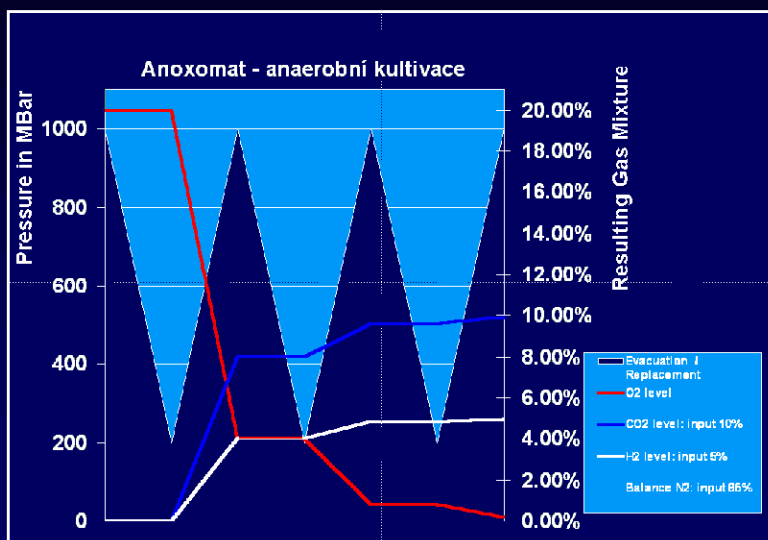
Princip evakuačních systémů

- minimální složení systému:
 - prostor pro uložení kultivačních médií
 - vakuová pumpa
 - systém ventilů pro napouštění/vypouštění vzduchu/atmosféry
 - plynová lahev
- cyklus systému:
 - odstranění vzduchu z prostoru s kultivačními médii
 - nahrazení definovanou atmosférou z plynové lahve
 - 1 cyklus
 - promývání
 - uzavření prostoru s médii

MART Anoxomat



"Vakuové" systémy
MART Anoxomat



dle O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.

Vakuové systémy
MART Anoxomat



dle O.K. SERVIS BioPro, s.r.o.

Vakuové systémy
LAS (Trios)

LAS:

- vakuový balicí stroj se systémem ventilů pro napouštění/vypouštění vzduchu/atmosféry
- plynová lahev

Cyklus systému:

- vložení kultivačních médií do sáčku
 - 2 - 4 - 12 PM
 - sety MIC, identifikační kity, ...
- odstranění vzduchu z vakuové komory
 - 1 nebo více cyklů
 - 9 přednastavených programů
- nahrazení definovanou atmosférou z plynové lahve
- uzavření sáčku dvojitým plynotěsným svárem
- zavzdušnění vakuovací komory
- uložení sáčku ke kultivaci v termostatu

Vakuové systémy
LAS (Trios)

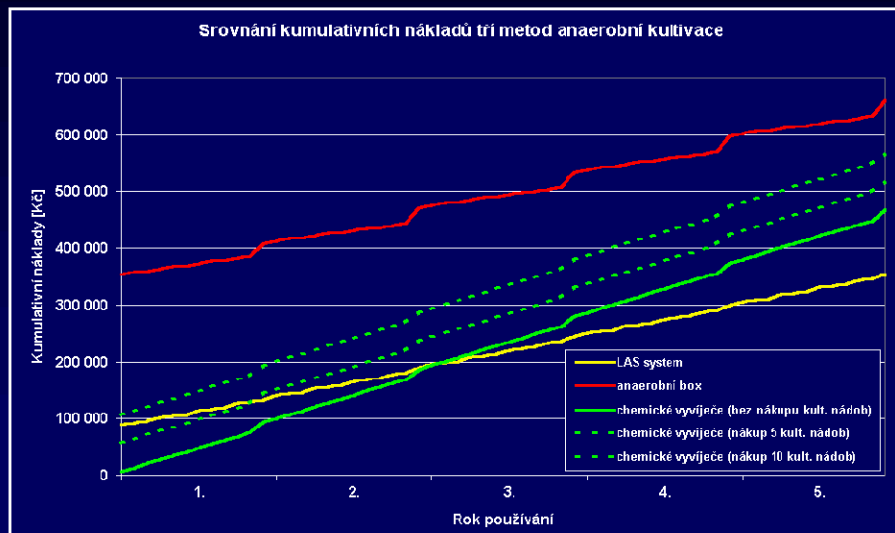


LAS S1 / S2



LAS D1 / D2

Srovnání nákladů 3 metod anaerobní kultivace



Vakuové systémy

LAS (Trios) - zhodnocení

- přesný objem zbytkového O_2
- okamžitá anaerobióza
- absolutní těsnost kultivačního sáčku (dvojitý plynotěsný svár)
- nulové zbytkové teplo z katalýzy
- ekonomičnost fixních i variabilních nákladů
- jednorázový katalyzátor (2 g)
- snadná obsluha a manipulace

Anaerobní boxy - princip

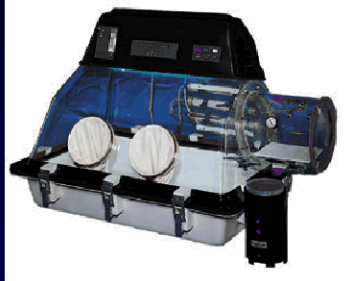
- uzavřený systém pro kompletní zpracování anaerobních vzorků, tj. inokulace, kultivace, identifikace a odečtení se odehrává v jednom prostředí
 - přechodová komora, kultivační
 - temperovaná komora
 - manipulační rukávy
 - komfort obsluhy, funkčního vybavení a příslušenství přímo úměrný ceně systému
- anaerobiózy se dosahuje "promýváním" atmosféry

Anaerobní boxy



Foto © D. Chmelář (Olympus C-3030 Zoom)

Anaerobní boxy



Anaerobní boxy - zhodnocení

- přesná atmosféra
- míra striktnosti anaerobiózy ?
- relativně vysoká spotřeba plynu
- velmi výhodná manipulace přímo v definované atmosféře
- výměna katalyzátoru !!!
- ekonomika provozu ?

Technické podmínky pro umišťování tlakových lahví

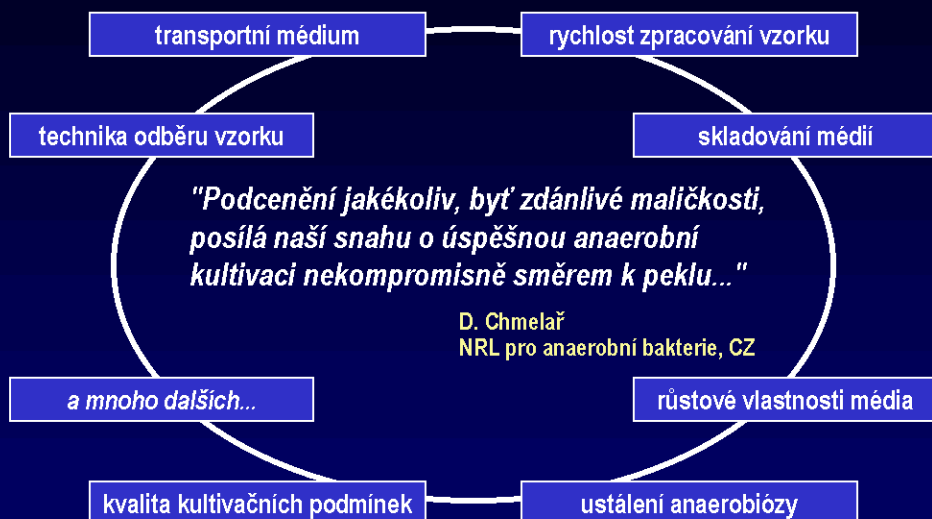
- ČSN 07 8304 „Tlakové nádoby na plyny – Provozní pravidla“
- ČSN 01 8003 „Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích“

Obecně:

- max. 8 lahví á 50 l v jedné provozní místosti
 - ukotvení lahve (ochrana před padem a nárazem)
 - maximální vzdálenost od zdrojů otevřeného ohně
 - větrání místnosti
 - viditelné označení místosti a budovy
-
- zajištění koncentrace H₂ ve směsi pod mezí výbušnosti !

Podrobnosti viz. <http://www.trios.cz> => sekce **Dokumenty ke stažení**

Závěr - Upozornění referenční laboratoře...



Miniatlas anaerobních bakterií
Clostridium perfringens



Foto © D. Chmelář (Olympus C-3030 Zoom)

Miniatlas anaerobních bakterií
Clostridium botulinum

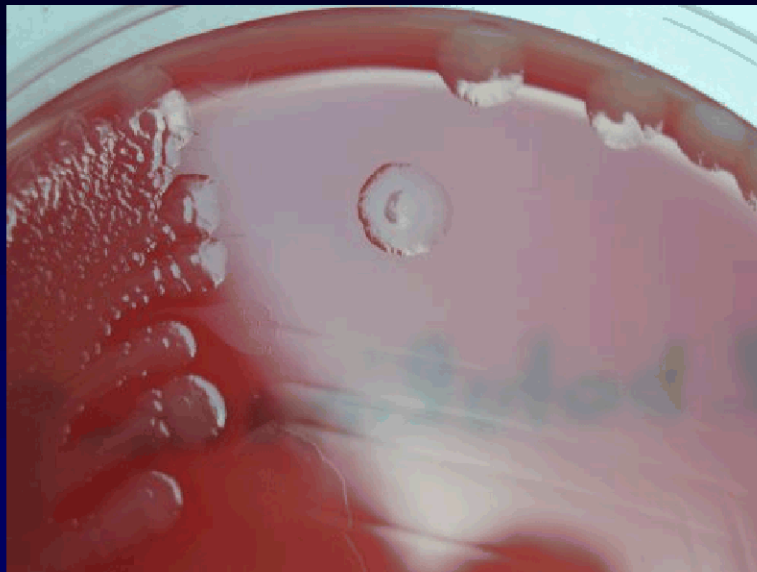


Foto © D. Chmelář (Olympus C-3030 Zoom)

Miniatlaz anaerobních bakterií
Clostridium tetani



Foto © D. Chmelář (Olympus C-3030 Zoom)

Miniatlaz anaerobních bakterií
Clostridium difficile



Foto © D. Chmelář (Olympus C-3030 Zoom)

Miniatlaz anaerobních bakterií
Bacteroides fragilis



Foto © D. Chmelář (Olympus C-3030 Zoom)

Miniatlaz anaerobních bakterií
Fusobacterium nucleatum



Foto © D. Chmelář (Olympus C-3030 Zoom)

...děkuji za pozornost ...

A handwritten signature in white ink on a dark blue background. The signature appears to be "Petr Janda" written in a cursive style.

Celá prezentace je k dispozici na <http://www.trios.cz> => sekce **Přednášky**