



Cultivarea bacteriilor

Cultivarea bacteriilor: creșterea bacteriilor pe medii de cultură în condiții in vitro.

Medii de cultură: complexe de substanțe care permit creșterea și multiplicarea bacteriilor (conțin substanțe nutritive, au pH corespunzător, umiditate corespunzătoare, sunt sterile, trebuie asigurată aero/anaerobioza)

Însămânțare: punerea în contact a unei culturi bacteriene sau a unui produs patologic cu mediile de cultură.

Colonie bacteriană: aglomerare de bacterii vizibilă cu ochiul liber, formată din multiplicarea unei singure bacterii de pe mediul de cultură

Izolare: repicarea unei singure colonii pe alte medii de cultură cu scopul de a obține cultură pură

Clasificarea mediilor de cultură

După consistență:

- lichide (repartizate în eprubete)
- solide (geloza dreaptă, înclinată, în placă)
- semisolide (în eprubete)

După conținutul de substanțe nutritive:

- Medii naturale: conțin substanțe nutritive în forma lor naturală, fără a fi prelucrate în prealabil
- Medii artificiale

Metode de însămânțare

- Pe medii solide
 - însămânțare prin epuizare (se obțin colonii izolate)
 - însămânțare în sector (se obțin colonii confluențe)
 - însămânțare prin înțepare
- Pe medii lichide
 - omogenizarea unei colonii în mediu lichid



Însămânțarea prin epuizare

Obținerea culturii primare

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs patologic
- Se descarcă ansa pe mediu de cultură:
 - se însămânțează un prim sector
 - se sterilizează ansa
 - din primul sector însămânțat se trasează câteva striuri paralele în sensul acelor de ceasornic
 - se continuă însămânțarea prin striuri paralele, terminându-se printr-un striu în zig-zag
- În ultimul sector bacteriile sunt dispersate, astfel încât după incubare se vor forma **colonii izolate**

Obținerea culturii pure

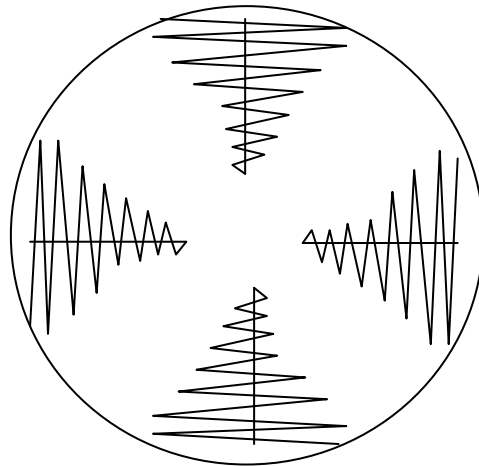
- Se replică o singură colonie din cultura primară pe un mediu de cultură proaspăt, fie prin epuizare, fie prin însămânțare în sector

Însămânțarea în sector

Pe o placă pot fi însămânțate mai multe specii bacteriene

Prin însămânțare în sector nu se obțin colonii izolate !

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs patologic
- Se descarcă ansa pe mediu de cultură sub forma unui sector de cerc





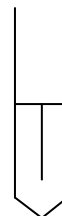
Însămânțarea pe medii în coloană înclinată

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs
 - Se descarcă ansa pe partea înclinată a mediului de cultură sub forma unui striu
- NU se obțin colonii izolate, bacteriile cresc sub diferite modele

Însămânțarea prin înțepare

Se practică pentru însămânțarea mediilor solide turnate în coloană dreaptă

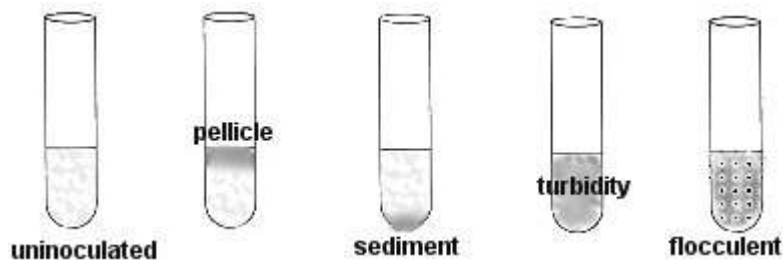
- Se încarcă acul de inoculare cu produs
- Se înțeapă mediul în direcție verticală pe o distanță de $\frac{3}{4}$ din înălțimea coloanei



Însămânțarea în mediu lichid

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs
- Se omogenizează produsul recoltat în mediul de cultură lichid

În funcție de specie, bacteriile cresc difuz în tot volumul mediului / la suprafață / la fundul eprubetei





Cultivarea virusurilor

Cultivarea virusurilor pe culturi celulare

Virusurile pot fi izolate pe celule vii, receptive.

Cultura celulară: sistem biologic in vitro alcătuit din celule izolate vii, care își păstrează capacitatea de multiplicare și nu se organizează în țesuturi.

Condiții necesare pentru păstrarea în viață a celulelor din cultura celulară:

- condiții aseptice
- mediu nutritiv (mediu de cultură lichid ce conține substanțe nutritive, sursă de energie, factori de creștere, vitamine, sistem tampon, indicator, antibiotice și antifungice) – mediile comercializate Eagle, Hanks, M199
- pH adecvat
- temperatură constantă
- atmosferă cu 10% CO₂

În funcție de proveniența celulelor, culturile celulare se clasifică în:

- culturi de origine animală sau umană
- culturi de celule embrionare sau adulte
- culturi de celule normale sau tumorale

Culturile celulare primare sunt culturi realizate direct din țesuturile sursă.

Liniile celulare stabilizate derivă din culturile primare, se mențin în viață timp nelimitat prin subcultivări.

Realizarea culturilor primare din țesuturi solide

- se prelevă țesutul sursă în condiții aseptice
- se fragmentează țesutul în bucăți de aprox. 1 mm³, se spală cu soluție salină tamponată (SST) pentru îndepărtarea sângelui
- disocierea enzimatică a celulelor: tripsinizarea fragmentelor tisulare în soluție de tripsină 0,25% (enzimă proteolitică, desface legăturile peptidice) pe agitator magnetic – desfacerea legăturilor intercelulare
- colectarea celulelor izolate în vas colector – se face prin filtrare pentru a obține numai celule izolate
- repetare tripsinizării până la epuizarea țesutului, în timpul tripsinizării vasul colector se păstrează la temperatura de 4°C pentru inactivarea tripsinei



- centrifugarea suspensiei de celule izolate, îndepărtarea supernatantului (tripsina), spălare cu SST, în final suspendarea celulelor în mediu nutritiv
- controlul viabilității celulelor cu colorație vitală albastru de tripan (se colorează celulele moarte) – pentru a se realiza cultura, 90% din celule trebuie să fie vii)
- numărarea celulelor, ajustarea lor la concentrație de 300000 celule/ml, repartizare volume egale în flacoane de culturi celulare
- incubare în poziție culcată
- urmărirea formării culturii cu microscopul invers

Culturi provenite din celule:

- normale: celulele se atașează de peretele flaconului, se multiplică până acoperă peretele flaconului, realizează o cultură monostrat (fenomenul inhibiției de contact)
- tumorale: se multiplică și după acoperirea suprafeței disponibile, cresc în mai multe straturi și în suspensie

Subcultivarea culturilor celulare

După 5-7 zile de la realizarea culturii se epuizează substanțele nutritive, sursele de energie, se acidifică mediul. Pentru menținerea celulelor în viață, acestea trebuie pasate, subcultivate. Se realizează prin *versenizare*:

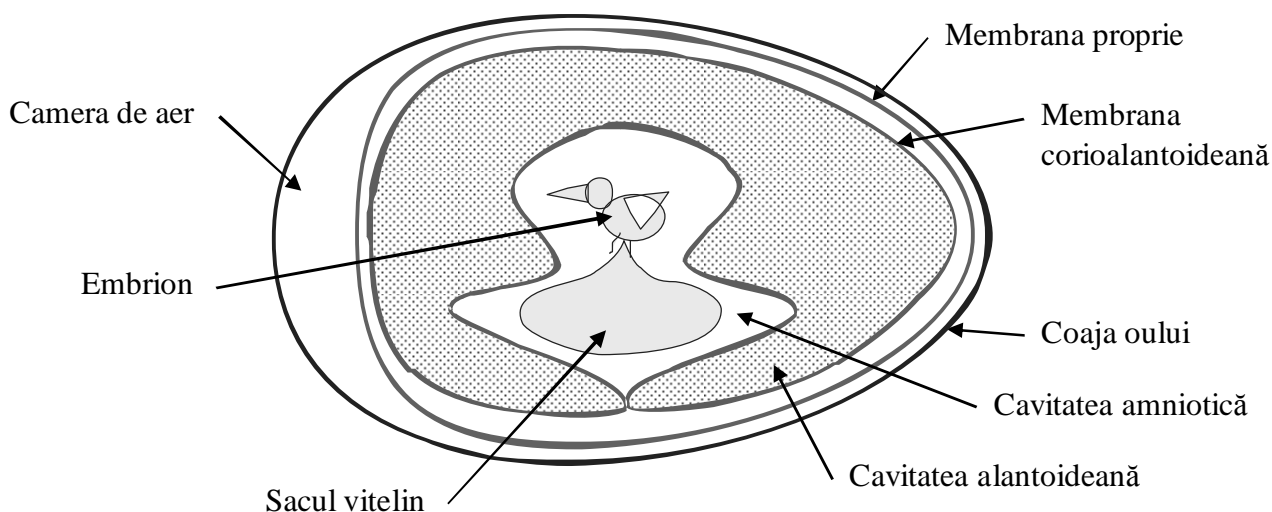
- celulele se detașează de pe peretele flaconului cu soluție de EDTA (versen)
- se centrifughează
- se spală cu soluție SST
- se resuspendează în mediu nutritiv
- se verifică viabilitatea celulelor, se numără celulele și se ajustează la concentrația optimă. Se repartizează volume egale în flacoane de cultură celulară.
- Culturile primare realizate din **celule normale** adulte pot fi subcultivate de câteva ori (4-6) după care celulele mor (apoptoză)
- Culturile realizate din **țesuturi embrionare** pot fi subcultivate de mai multe ori (celule nediferențiate), de 60-80x, după care mor.
- Liniile celulare pot fi subcultivate nedefinit. Aceste se obțin din **țesuturi tumorale** (*HeLa, KB, Detroit*, etc) sau din culturi celulare efectuate din țesuturi normale care au suferit transformare malignă spontană (*Vero*). Liniile celulare sunt bine caracterizate, se manevrează ușor, pot fi folosite pentru izolarea virusurilor.



Inocularea suspensiilor virale în culturile celulare, identificarea izolatelor virale

- se îndepărtează mediul nutritiv și se introduce în flacon suspensia virală pregătită în prealabil.
- după o incubare de 1 oră (penetrarea virusurilor în celulele receptiv) suspensia se decantează, se adaugă mediu de întreținere (mai sărac în substanțe nutritive decât mediul nutritiv, dar care permite supraviețuirea celulelor)
- se incubează
- în zilele următoare se urmăresc modificările survenite în cultura celulară.

Izolarea virusurilor pe oul de găină embrionată



Inocularea virusurilor se poate face pe:

- membrana corioalantoideană
- cavitata alantoideană
- cavitata amniotică
- sacul vitelin
- venele alantoidiene
- embrion



Inocularea pe membrana corioalantoideană

- la ovoscop se notează pe coajă poziția camerei de aer și zona unde membrana corioalantoideană este cel mai bogat vascularizată
- se antiseptizează coaja în cele două locuri notate anterior
- se perforază cu un ac coaja în zona camerei de aer
- cu o freză se decupează un triunghi din coajă la nivelul membranei
- se perforază membrana proprie și se aspiră aerul din camera de aer cu ajutorul unei tetine din cauciuc (membrana proprie se dezlipsește de membrana corioalantoideană)
- se îndepărtează porțiunea vizibilă din membrana proprie, evidențiindu-se direct membrana corioalantoideană
- se depune pe membrană produsul de inoculat cu o pipetă
- după inoculare se astupă orificiile create cu lamelă de sticlă și parafină

Izolarea virusurilor la animale de laborator

La această metodă se recurge în momentul în care celelalte metode sunt nesatisfăcătoare.

Este necesară cunoașterea metodelor de contenție a animalelor

Înainte de inoculare animalele sunt marcate, dacă este necesar sunt anesteziate (intervenții dureroase), iar locul inoculării se epilează și se antiseptizează.

Inocularea se face prin diferite căi:

- intradermic
- subcutanat
- intramuscular
- intravenos
- intraperitoneal
- intranasal
- intracerebral

Suspensiile virale sunt inoculate prin injecție, inhalare, ingestie, badijonare, etc...