**Занятие 11**

**Бактериологический метод. Выделение чистых культур аэробных и анаэробных бактерий (II и III дни). Культуральные свойства бактерий. Идентификация бактерий по ферментативной активности. Современные методы идентификации**

**Получение чистой культуры этап II.**

* II этап получения чистой культуры начинается с изучения культуральных свойств выросших на среде бактерий. На II день чашки Петри достают из термостата и приступают к **изучению культуральных свойств** бактерий.
* Наблюдается последовательное разобщение микроорганизмов на средах в чашках, в которые производили посев по методу Дригальского. Обычно на поверхности среды во второй, или в третьей чашке наблюдается рост микроорганизмов в виде **изолированных колоний**
* При посеве на 4 сектора, после инкубации чашек, наблюдается последовательное уменьшение количества микроорганизмов на питательной среде и обычно в последнем секторе микроорганизмы растут в виде **изолированных колоний.**
* Считается, что начало одной колонии дает одна единственная бактериальная клетка. Поэтому, на практике для получения чистой культуры обеспечивается рост микроорганизмов в виде изолированных колоний на поверхности или в глубине плотной питательной среды. На данном этапе получения чистой культуры производится пересев изолированных колоний на другие питательные среды, и их последующая инкубация в течение 1-2 дней.

**Культуральные свойства микроорганизмов.**

* Культура –это популяция, образуемая бактериями в оптимальных условиях. Колония - популяция (скопление) бактерий на плотной питательной среде
* Чистая культура - совокупность микроорганизмов, принадлежащих к одному виду и образующих популяцию на плотной питательной среде
* Штамм – чистая культура микроорганизмов одного вида, выделенных из разных (или одинаковых) источников в определенное время

**Культуральные свойства лежат в основе идентификации микроорганизмов, так как являются характерным признаком для каждого рода и вида. С этой целью идентификации изучается характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах.**

**Культуральные признаки бактерий на плотных питательных средах.**

* Бактерии образуют *колонии* на плотных питательных средах
* Популяция, образуемая одной бактерией на поверхности или в глубине плотной питательной среды, называется *колонией*

**Морфология колоний:**

**При изучении морфологии колонии учитываются следующие признаки:**

* **Размеры**
* **Форма**
* **Цвет**
* **Структура**
* **Высота**
* **Края**

**Размеры колоний**

* Крупные (˂ 4-5)
* Средние (2-4 мм)
* Мелкие (1-2 мм)
* Точечные (˃1 мм)

**Консистенция колоний**

* Плотные
* Мягкие
* Вязкие
* Слизистые

**Цвет колоний.**

**В процессе роста на питательных средах некоторые бактерии продуцируют пигменты**

**Прозрачность колоний.**

* **По степени прозрачности различают**

**-**прозрачные

-полупрозрачные

-мутные

**Подсчет колоний.**

В случае малого количества колоний их считают на глаз, если же колоний много, то подсчет производят в камере, которая представляет собой разделенную на квадраты пластину на подставке. Чашка Петри помещается под пластину и производят подсчет колоний, попавших в поле 10 крупных квадратов площадью 1sm2 . Общее количество колоний в одном квадрате вычисляют по формуле

X=пr2 x1sm2  п=3,14

r- радиус чашки= 5sm

Если в одном квадрате будет 10, то:

X=3,14x52 x10 = 785

**Определение общего количества клеток в 1 мл жидкости**

**1.Подсчет клеток под микроскопом в «счетной камере» (Горяева, Тома—Цейса, Нейбауэра)**

**2. Счетчики**

**Электронный счетчик Култера**

**Нефелометрия (спектрофотометрия)**

**3.Подсчет клеток на мембранных фильтрах**

**Для определения концентрации микроорганизмов может использован непрямой метод определения, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой взвеси со стандартным образцом мутности.**

**Примером такой стандартизации микробной взвеси является использование стандарта Мак-Фарланда (McF).**

**Он изготовлен из:**

**1 % раствора серной кислоты**

**1 % раствора бария хлорида**

**Получение чистой культуры III этап.**

На третьем этапе выделения чистой культуры проверяют чистоту выделенной культуры. С этой целью, готовят мазок из культуры, выросшей на скошенном агаре, окрашивают по методу Грама и микроскопируют. При наличии в мазке бактерий с одинаковой морфологией подтверждается чистота выделенной культуры. После выделения чистой культуры изучают ее биохимические (ферментативные) свойства. Завершительный этап бактериологического исследования состоит в идентификации выделенной чистой культуры, то есть определении ее таксономического положения. *Идентификация* микроорганизмов проводится по их культуральным, тинкториальным, морфологическим, ферментативным, антигенным и др. свойствам.

**Изучение биохимических (ферментативных) свойств бактерий**

* Изучение биохимических (ферментативных) свойств бактерий основывается на изучении их **ферментов и метаболитов**
* Ферментативные свойства являются основным таксономическим признаком, учитываемым при идентификации микроорганизмов
* Для идентификации бактерий определяют **сахаролитические, протеолитические и другие ферменты**

**Микробные ферменты**

* Синтез ферментов микроорганизмов детерминируется на генном уровне. В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов, которые принадлежат к 6 классам:

1. ***оксидоредуктазы*** катализируют реакции окисления-восстановления,
2. ***трансферазы*** - катализируют реакции переноса различных групп от донора к акцептору,
3. ***гидролазы*** катализируют расщепление крупных молекул пептидов, полисахаридов, липидов до мономеров,
4. ***лигазы*** катализируют образование химических связей между молекулами,
5. ***лиазы*** катализируют реакции разрыва связей в субстрате не гидролитическим путем,
6. ***изомеразы*** катализируют перенос групп внутри молекулы с образованием изомерных форм

Ферменты могут локализоваться как внутри клетки– **эндоферменты,** так и выделяться в окружающую среду – **экзоферменты**.

* ***Эндоферменты*** проявляют деятельность в пределах клетки, ***экзоферменты*** секретируются во внешнюю среду и обеспечивают распад и проникновение макромолекул в клетку
* ***Конститутивные и индуцибельные*** ферменты
* ***Ферменты метаболизма*** – оксидоредуктазы, трансферазы, лиазы, лигазы, гидролазы, изомеразы
* ***Ферменты агрессии или патогенности*** – гиалуронидаза, нейраминидаза, лецитиназа и пр.

**Изучение ферментативной активности микробов.** Основной таксономический признак, который учитывают при идентификации микроорганизмов - это спектр их ферментативной активности. С целью идентификации бактерий определяют сахаролитические, протеолитические и др. ферменты

**Изучение способности микроорганизмов ферментировать углеводы (*сахаролитических свойств*).**

* Для этого используют среды Гисса, которые называют «пестрый ряд». Они представлены набором пробирок с питательной средой в жидкой или полужидкой форме, в каждую из которых добавлены определенный углевод (сахар) и индикатор, меняющий окраску в кислой среде.
* При расщеплении какого-то углевода в пробирке наблюдается изменение цвета среды, если же исследуемая культура не расщепляет углевод, то цвет среды в других пробирках останется неизменным. Поэтому набор сред называется «пестрый ряд».

**Среды «цветного» ряда Гисса.**

* Некоторые бактерии расщепляют углеводы **только до кислоты,** некоторые расщепляют **до кислоты и до газа**, что также учитывается при идентификации.
* Для определения газообразования в пробирки с жидкой средой вкладывают стеклянный поплавок, который всплывает в случае образования газа при расщеплении углеводов.
* В полужидких средах Гисса газообразование определяют по образованию пузырьков
* ***Для определения сахаролитической активности*** на третий день бактериологического исследования выделенную чистую культуру вносят петлей в пробирки с «пестрым» рядом и инкубируют при 37°C в течение 18-24ч или дольше.
* Расщепление бактериями углеводов протекает до образования кислых продуктов, при этом происходит изменение цвета среды; при расщеплении углеводов до кислоты и газа, параллельно с изменением цвета среды происходит образование пузырьков газа внутри поплавков. При использовании полужидких сред пузырьки газа образуются дне пробирок. При отсутствии ферментации цвет среды не меняется.
* Поскольку для каждого углевода используется отдельная пробирка, цвет в которых меняется в связи с ферментацией углеводов благодаря индикатору, весь ряд пробирок приобретает «пёстрый» вид .
* **Короткий «пестрый» ряд** представлен жидкими средами, содержащими моно- и дисахариды - глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу и шестиатомный спирт –маннит.
* **Длинный «пестрый» ряд** помимо вышеуказанных углеводов, содержит различные моносахариды (арабинозу, ксилозу, рамнозу, галактозу и др.), полисахариды (инулин, крахмал, гликоген и др.) и спирты ( глицерин, дульцит, инозит и др.)
* Во все среды в качестве индикатора добавляют реактив Андраде

**Изучение способности микроорганизмов расщеплять белки (*протеолитической активности).***

Изучение протеолитической активности выделенной бактериальной культуры основывается на определении способности разжижения желатина, и образования конечных продуктов расщепления белков - аммиака, индола, сероводорода и др.

**Определение протеолитических ферментов**. Наличие *протеолитических ферментов* определяют при посеве бактериальной культуры уколом в столбик 10-20% желатина. Инокуляты инкубируют при температуре 20-220C в течение нескольких дней. При положительном результате наблюдают разжижение желатина в виде воронки либо в виде перевернутой елочки. В пробирках с пептонной водой можно определить способность к продукции индола, сероводорода и аммиака в течение 2-3дн при 37ºC

**Определение способности продуцировать индол.**

* *Метод Эрлиха:* в пробирке смешивают бактериальную культуру и 2-3 мл эфира, добавляют несколько капель реактива Эрлиха (раствора, приготовленного на основе парадиметиламидобензальдегида, этилового спирта и концентрированной соляной кислоты). В случае индолообразования смесь окрашивается в розовый цвет.
* *Метод Мореля*: индолообразование определяют с помощью индикаторной бумажки, смоченной в щавелевой кислоте и укрепленной пробкой над пробиркой с питательным бульоном. При положительном результате индикаторная бумага краснеет.

**Определение индолообразования реактивом *Ковача.***

Бактериальную культуру инкубируют в среде с триптофаном при 37°C. Под влиянием бактериального фермента триптофаназы, триптофан распадается на индол, аммиак и пировиноградную кислоту. Добавление к среде диметиламинобензальдегида (реактива Ковача) вызывает образование кольца красного цвета

**Определение образования сероводорода.**

* **Полоску индикаторной бумаги, смоченную в ацетате свинца закрепляют в пробирке пробкой.**
* **Почернение нижней части полоски после инкубации пробирки является показателем образования H2S (за счет образования сульфида свинца).**
* **Бактериальную культуру инокулируют иглой в столбик среды, содержащей сульфат железа, тиосульфат натрия и сульфид натрия. При образовании сероводорода столбик агара чернеет**.

**Определение аммиака.**

* Для определения способности к образованию аммиака, проводят посев в МПБ, и между его поверхностью и пробкой закрепляют полоску лакмусовой бумаги.
* При положительном результате бумажка синеет.

**Определение каталазной активности.**

* К капле 1-3% перекиси водорода на предметном стекле добавляют исследуемую культуру. Каталаза расщепляет перекись водорода до воды и кислорода.
* Появление пузырьков газа свидетельствует о наличии каталазы.

**Оксидазный тест.**

**Принцип теста**. Определенные виды бактерий вырабатывают либо цитохромоксидазу, либо индофенолоксидазу (железосодержащий гемопротеин), которые катализируют перенос электронов на кислород. В оксидазном тесте бесцветный краситель *p*-фенилендиамин дигидрохлорид, используемый как искусственный акцептор электронов, при участии оксидазы окисляется и образует окрашенное вещество индофенол синий

**Постановка теста**. Исследуемую культуру помещают на полоску или диск индикаторной бумаги. При положительном результате наблюдается появление синей или лиловой окраски в течение 10-30 сек.

**Применение дифференциально- диагностических сред.**

* Использование дифференциально-диагностических сред позволяет проводить дифференциацию микроорганизмов, а также иногда их идентификацию.
* Дифференциация микроорганизмов на таких средах основывается прежде всего на их ферментативных свойствах.
* В лабораториях помимо среды Гисса, используются среды ***Эндо, Мак Конки, среда с метиленовым синим и эозином (EMB-агар) и пр.***

**Среда Эндо.**

***Состав 1% лактозы и индикатор (****фуксин который обесцвечивается сульфитом натрия)*

Среда имеет розовый цвет. Бактерии, ***сбраживающие лактозу*** в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая даёт цветную реакцию с реактивами, в результате чего их колонии окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском. Колонии бактерий, ***не сбраживающих лактозу,*** имеют белый или слабо-розовый цвет (цвет питательной среды).

**Среда Клиглера.**

**Состав:** глюкоза - 0,1%, лактоза -1%, индикатор, сульфат железа, тиосульфат натрия.

**Готовая среда** разлита в пробирках, в виде косого агара розового цвета,

**Инокуляцию** проводят петлей на скошенную часть агара, и иглой в столбик

* При ферментации глюкозы столбик среды окрашивается в желтый цвет, цвет скоса не меняется,
* При ферментации глюкозы и лактозы - пожелтение всей среды (E.coli),
* При образовании H2S наблюдается почернение агара.

**TSİ(triple sugar iron) агар *трехсахарный железосодержащий агар.***

Состав:

* 1% лактоза
* 1% сахароза
* 0,1% глюкоза (при расщеплении которой столбик агара желтеет)
* Сульфат железа (при выделении сероводорода наблюдается образование нерастворимого черного преципитата, связанного с восстановлением тиосульфата в кислой среде в присутствии соли железа.
* Индикатор феноловый красный

**İMVİC тест (включает 4 теста).**

* **Тест на индол**
* **Тест с индикатором метил-рот**
* **Реакция Фогеса-Проскауэра**
* **Цитратный тест**

**Результат IMViC теста у различных бактерий**



**API система*(Application programming interface)***

Перед проведением APİ теста проводят получение чистой культуры и некоторые первичные тесты по идентификации

**Тест 1**: Результат микроскопии мазка, окрашенного по Граму (грам-, грам+, палочковидные, кокковидные и пр.)

**Тест 2**: Тесты на ферменты дыхания🡪 оксидазу, каталазу

**Современные автоматизированные системы идентификации микроорганизмов.**

* **Анализатор Vitek 2 Compact** – полностью автоматическая система, обеспечивающая идентификацию микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным препаратам за один день. Идентификация осуществляется путем автоматического определения биохимических свойств микроорганизмов, но если полная идентификация невозможна, то степень достоверности результатов об идентифицируемых микробах возможно указать в процентах, основываясь на данных компьютерной программы.
* Все используемые анализаторные системы требуют получения идеальной чистой культуры идентифицируемых микроорганизмов
* После внесения инокулята (выделенной чистой культуры) в кассету, требуется определенное время для инкубации и уточнения результатов
* В завершении анализа система устанавливает видовую и родовую принадлежность микроорганизмов из инокулята, и определяет их чувствительность или резистентность к антимикробным препаратам
* Анализатор также позволяет установить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) противомикробного препарата и сделать выводы о механизмах резистентности

**Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация MALDİ-TOF**

Автоматизированная система основанная на масс спектрометрии

**Принцип**

Физическое определение клеточных белков с помощью масс-спектрометрии

**+** сравнение полученного спектрального профиля с базой данных

***Biomerieux VİTEK-2***

Анализатор Vitek-2 Compact представляет собой автоматическую систему.

Идентификация микроорганизмов

Определяется чувствительность к антимикробным препаратам (в течение 1 дня)

Имеет пластиковых карты с 64 углублениями.

Грамотрицательные бактерии

грамположительные бактерии

Дрожжевые грибы

Анаэробные бактерии, нейссерии, гемофильные бактерии

Из высоковирулентных микроорганизмов: Brucella melitensis, Burkholderia pseudomallei, Francisella tularensis, Burkholderia mallei, Escherichia coli O157, Vibrio cholerae, Yersinia pestis.

Время получения результата 6-8 часов.