

Лекция 5. КУЛЬТУРАЛЬДЫ (БАКТЕРИОЛОГИЯЛЫҚ) ЗЕРТТЕУ ӘДІСІ

Бактериологиялық зерттеу әдісі (BLMI) – қоректік орталарда өсіру арқылы бактериялардың таза дақылдарын бөліп алуға және олардың морфологиялық, культуральды, биохимиялық, генетикалық, серологиялық, биологиялық және экологиялық ерекшеліктерін зерттеуге негізделген түрге сәйкестендіруге негізделген әдіс.

Инфекциялардың бактериологиялық диагностикасы Денсаулық сақтау министрлігі бекіткен типтік диагностикалық схемалар арқылы жүзеге асырылады.

Таза дақыл – қасиеттері зерттеліп жатқан қоректік ортада өсетін бір түрдегі бактериялар.

Штам – белгілі бір көзден белгілі бір уақытта оқшауланған бір түрдегі микроорганизмдердің анықталған таза дақылы. Бір түрдің штамдары биохимиялық, генетикалық, серологиялық, биологиялық және басқа қасиеттері бойынша, сондай-ақ оқшаулану орны мен уақыты бойынша елеусіз ерекшеленуі мүмкін.

Лекция 6

Культуральды (бактериологиялық) зерттеу әдістерінің мақсаты

1. Этиологиялық диагностика: микроорганизмдердің таза дақылын бөліп алу және оны идентификациялау.
2. Қосымша қасиеттерді анықтау, мысалы, микроорганизмнің антибиотиктерге және бактериофагтарға сезімталдығы.
3. Микроорганизмдердің санын анықтау (Ауру қоздыратын инфекцияларды диагностикалауда маңызды).
4. Микроорганизмдерді типтеу, яғни генетикалық және эпидемиологиялық (фаговарлар мен сероварлар) маркерлерді зерттеу негізінде түр ішілік айырмашылықтарды анықтау. Ол эпидемиологиялық мақсатта қолданылады, өйткені ол әртүрлі науқастардан және әртүрлі сыртқы орта объектілерінен, әртүрлі ауруханаларда, географиялық аймақтарда оқшауланған микроорганизмдердің ортақтығын орнатуға мүмкіндік береді.

Бактериологиялық зертханалық зерттеулер үшін әртүрлі, факультативті аэробтар үшін және облигатты анаэробтар үшін бірнеше кезеңді қамтиды.

Аэробтар мен факультативті анаэробтардың таза дақылын бөліп алудағы Бактериологиялық зертханалық зерттеу кезеңдері.

Бірінші кезең мыналарды қамтиды:

1. Материалды жинау, тасымалдау, сақтау, алдын ала өңдеу. Кейде егу алдында оқшауланған микроорганизмнің қасиеттерін ескере отырып, материалды іріктеп өңдеу жүргізіледі. Мысалы, Туберкулез микобактериясы бар қақырықты немесе басқа материалды қышқылға төзімділіктің болуына зерттеу алдында материал қышқыл немесе сілтілер ерітінділермен өңделеді.
2. Байыту ортасына себу (қажет болса). Ол сынақ материалында аз мөлшерде бактерия болса, мысалы, гемокультурасын оқшаулау кезінде жүзеге асырылады. Ол үшін дене қызуы көтерілген кезде алынған қанды үлкен көлемде (ересектерде 8–10 мл, балаларда 4–5 мл) 1:10 қатынасында (қанның бактерицидтік әсерін жеңу үшін) ортаға егеді. факторлар); егу 37 °C температурада 18-24 сағат бойы инкубацияланады.

3. Зерттелетін материалдың микроскопиясы. Зерттелетін материалдан жұғынды дайындалады, Грам тәсілімен немесе басқа әдіспен боялады және микроскопталады. Қазіргі микрофлораны, оның мөлшерін бағаланады. Әрі қарай зерттеу барысында біріншілік жұғындыда болатын микроорганизмдерді бөліп алу керек.

4. Оқшауланған колонияларды алу үшін қоректік ортаға егу. Материал оқшауланған колонияларды алу үшін дифференциалды диагностикалық немесе селективті ортасы бар пластинаға механикалық бөлу арқылы ілмекпен немесе шпательмен егіледі. Егістен кейін ыдысты төңкеріп тастайды (колонияларды конденсация сұйықтығының тамшыларымен жағып алмау үшін), қол қойылады және 37 °С температурада 18-24 сағатқа термостатқа орналастырылады.

Микробтық дақылдарды егу және қайта егу кезінде зертеушінің назарын қоректік орталардың ластануына жол бермеу және басқалардың инфекциясын және өзін-өзі жұқтыруын болдырмау үшін асептика ережелерін сақтауға аудару керек екенін мұқият есте ұстаған жөн!

Қатаң патогенді микроорганизмдерден туындаған инфекциялар жағдайында, патологиялық материалда болатын микроорганизмдердің саны маңызды, материалды сандық егу жүргізіледі, ол үшін материалды 100 есе сұйылту сериясы (әдетте 3 сұйылту) пробиркалардағы триа бойынша стерильді изотоникалық хлорид ерітіндісінде дайындалады. Осыдан кейін әрбір сұйылтудан 50 мкл Петри табақшаларындағы қоректік ортаға егіледі.

Екінші кезең:

1. Орталарда колония морфотиптерін зерттеу, олардың микроскопиясы. Ыдыстарды тексеріп, оңтайлы қоректік ортаны, микроорганизмдердің өсу қарқыны мен үлгісін белгілеу. Зерттеу үшін штрих бойымен, орталыққа жақын орналасқан оқшауланған колониялар таңдалады. Егер сіз колониялардың бірнеше түрін өсірсеңіз, әрқайсысы бөлек зерттеледі.

Колониялардың белгілерін бағалаңыз (1 кестені қараңыз). Қажет болған жағдайда дақылдары бар пластиналар үлкейткіш әйнек арқылы немесе төмен үлкейтетін линзасы және тарылған саңылауы бар микроскоптың көмегімен қаралады. Әртүрлі колония морфотиптерінің тинкториалды қасиеттері зерттеледі, ол үшін зерттелетін колония бөлігінен жұғынды дайындалып, Грам немесе басқа әдістермен микроскопиялық әдіспен боялады, дақылдың морфологиясы мен тазалығы анықталады.

2. Таза культураның жинақталуы. Таза дақылды жинақтау үшін барлық морфотиптердің оқшауланған колониялары көлбеу агар немесе басқа қоректік ортасы бар жеке түтіктерге субкультураланады және +37 °С термостатта инкубацияланады (бұл температура көптеген микроорганизмдер үшін оңтайлы, бірақ ол әр түрлі болуы да мүмкін, мысалы, *Campylobacterium* spp. үшін - +42 °С, *Candida* spp. және *Yersinia pestis* үшін - +25 °С).

Энтеробактериялар үшін жинақтаушы орта ретінде әдетте Клиглер ортасы пайдаланылады.

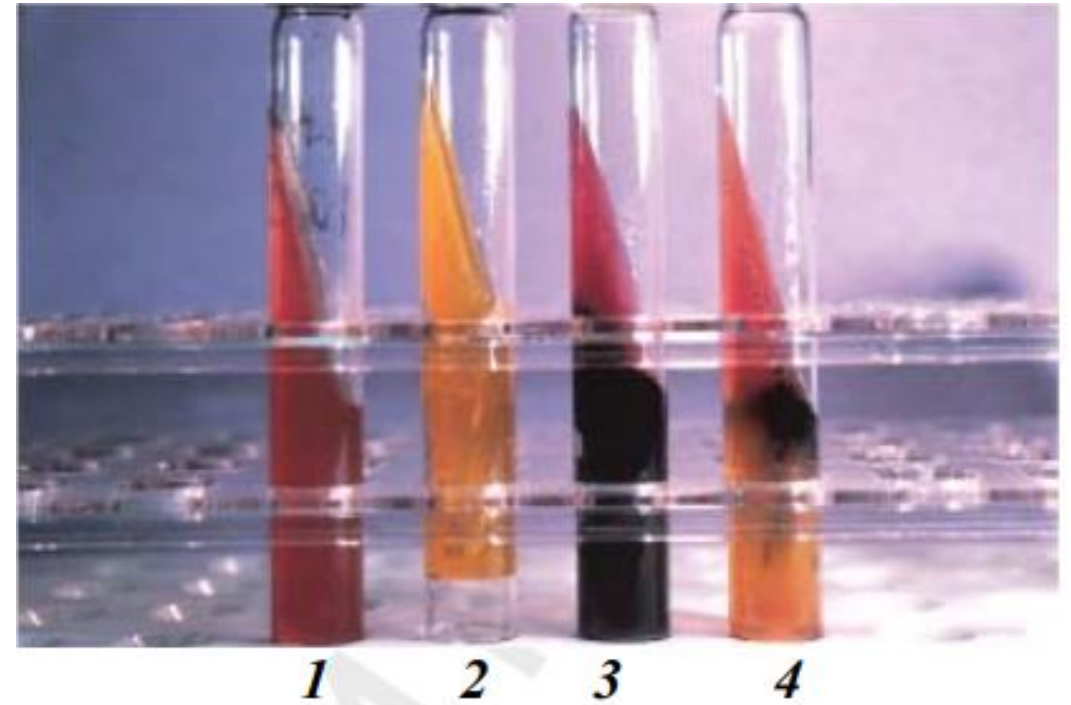
Клиглер ортасының құрамы: МПА, 0,1% глюкоза, 1% лактоза, күкіртті сутегіге арналған реагент (темір сульфаты + натрий тиосульфаты + натрий сульфиті), фенол қызыл индикаторы. Ортаның бастапқы түсі қызыл қызыл;

Клиглер қоректік ортасына егу беткі қабатқа штрихпен және инъекция бағаналы тәсілі арқылы жүзеге асырылады.

Үшінші кезең:

1. Жинақтаушы ортадағы өсуді есепке алу, Грамдық тәсіліне дайындаған жұғындыдағы дақылдың тазалығын бағалау. Оқшауланған таза дақылдың өсу сипаты атап өтіледі. Көзбен бақылағанда таза культура біркелкі өсумен сипатталады. Мұндай дақылдан дайындалған боялған жұғындыны микроскопиялық зерттеуде ондағы әртүрлі көру аймағында морфологиялық және тинкториалды біртекті жасушалар анықталады. Алайда, кейбір бактериялық түрлерге тән айқын плеоморфизм жағдайында таза дақылдан алынған жұғындыларда бір мезгілде әртүрлі морфологиясы бар жасушалар болуы мүмкін.

Егер жинақтаушы орта ретінде Клиглер индикаторлы ортасы пайдаланылса, онда оның колоннадағы және қиғаш бөлігінің түсінің өзгеруі бағаланады, соған сәйкес биохимиялық қасиеттері анықталады: глюкозаның, лактозаның ашытуы және күкіртті сутегінің алынуы. Лактоза ыдырағанда ортаның қиғаш бөлігі сарғаяды, глюкоза ыдырағанда баған сарыға айналады. Қанттардың ыдырауы кезінде CO₂ түзілуімен газ көпіршіктері немесе колонна үзілістері пайда болады. Күкіртсутекті өндіру жағдайында қара сульфаттың темір сульфидіне айналуына байланысты анаэробты жағдай кезінде қараю байқалады.



Сурет 1. Клиглер индикаторлы ортасы

1 – бастапқы; 2 - E. coli; өсірілген;
3- S. paratyphi өсірілген; 4- S. Typhi өсірілген

Аэробты жағдайда орташа бағанға қарағанда көлбеу беткейде қарқынды сілтінің түзілуі орын алады. Сондықтан ортада аз мөлшерде болатын глюкозаның ыдырауы кезінде еңіс бетінде пайда болған қышқыл тез бейтараптандырылады. Сонымен бірге ортада жоғары концентрацияда болатын лактозаның ыдырауы кезінде сілтілі өнімдер қышқылды бейтараптандыруға қабілетті емес.

Колоннадағы анаэробты жағдайда сілтілі өнімдер шамалы мөлшерде түзіледі, сондықтан мұнда глюкозаның ашуы анықталады. *E. coli* глюкоза мен лактозаны газ түзу арқылы ыдыратады және күкіртсутек түзбейді. Олар ортадағы ыдыраған бағананың және қиғаш бөлігінің сарғаюын тудырады.

S. paratyphi глюкозаны газ түзу арқылы ыдыратады және лактозаны ыдыратпайды. Олар бөліктің түсі өзгермейді және қызыл түс күйінде қалады. Бұл кезде *S. paratyphi* В күкіртсутегін түзеді (бағанада қара түс пайда болады), *S. paratyphi* А күкіртсутегін түзбейді.

S. typhi глюкозаны газ түзусіз ыдыратады, лактозаға теріс әсер етеді және күкіртсутек түзеді. Олар бағананың үзіліссіз сарғаюына әкеледі, қиғаш бөлігі түсі өзгермейді және қызыл болып қалады, бағана түрінде егу кезінде қара түс пайда болады.

Shigella spp. глюкоза-оң, лактоза-теріс, күкіртсутек түзбейді. Олар колоннаның сарғаюын тудырады (сероварға байланысты үзіліссіз немесе үзіліссіз), қиғаш агар бөлігінде түсі өзгермейді және қызыл болып қалады

2. Таза дақылды түпкілікті идентификациялау (оқшауланған микроорганизмнің түр немесе нұсқа деңгейіне жүйелі орналасуын анықтау) және оқшауланған дақылдың антибиотиктерге сезімталдық спектрін анықтау.

Бұл кезеңде таза дақылды анықтау үшін биохимиялық, генетикалық, серологиялық және биологиялық сипаттамалары зерттеледі (1-кесте).

1 кесте - Микроорганизмдерді идентификациялау кезінде ескерілетін белгілер (критерийлер)

Белгілер	Белгілердің сипаттамасы
морфологиялық	Көлемі, пішіні, орналасуы, Тинкториалды қасиеттері: Грам бояуы немесе басқа дифференциалды диагностикалық әдістер
культуральды	Тығыз (колония түрі) және сұйық ортада өседі
Биохимиялық	Ферменттерді анықтау: <ul style="list-style-type: none"> - протеазалар (ыдырайтын ақуыздар); - карбогидраза (ыдырататын көмірсулар); - липазалар (ыдырататын липидтер); – оксидоредуктазалар (оксидазалар, каталазалар, дегидразалар); – токсиндік ферменттер (гемолизиндер, плазмакоагулаза, лецитиназа, гиалуронидаза, DNase); - экзотоксиндер (дифтерия және т.б.); – ұшпа май қышқылдарының профилі (анаэробтар үшін)
Генетикалық	ДНҚ-дағы G+C мөлшері (%) ДНҚ мен РНҚ-дағы нуклеотидтер тізбегі
Серологиялық	Микробтың антигендік құрылымын зерттеу және оның сероварын бір валентті сарысуы бар шыныдағы РА немесе латекс агглютинация реакциясы кезінде анықтау.
Биологиялық	Жануарлар үшін вируленттілігі Токсигенділік Бактериофагтарға сезімталдық (фаговарды анықтау) Антибиотиктерге сезімталдық
Экологиялық	Табиғи мекен ету ортасы

Кәдімгі зертханалық тәжірибеде идентификациялау барлық қасиеттерді зерттеуді қажет етпейді. Оқшауланған микроорганизмге жататын түрді (вариантты) анықтау үшін жеткілікті ақпаратты, қолжетімді, қарапайым тестер қолданылады.

Төртінші кезең:

1. Нәтижелерді есепке алу және талдау. Биохимиялық, серологиялық, генетикалық және басқа да белгілерді зерттеу нәтижелері есепке алынады және әртүрлі типтегі микроорганизмдердің эталондық (типтік) штаммдарының қасиеттерімен салыстырылады. Анықталған микроорганизмді ең көп ұқсастықты көрсететін түрге тағайындаңыз. Микробқа қарсы препараттарға сезімталдық спектрін ескеріңіз.
2. Қорытынды беру. Пациент, зерттелген материал, микроорганизмдердің оқшауланған түрлері (қатаң патогенді микроорганизмдерді оқшауланған жағдайда санын көрсету қажет), олардың микробқа қарсы препараттарға сезімталдық спектрі туралы мәліметтері бар куәландырылған нысан болып табылатын қорытынды жасалады.

Облигатты анаэробтардың таза дақылын бөліп алудағы бактериологиялық зертханалық зерттеулер кезеңдері. Облигатты анаэробтар арасында спора түзетін анаэробтар клостридиялар (ботулизм, сіреспе, газды гангрена қоздырғыштары) және спора түзбейтін (клостридиальды емес) – пептококктар, пептострептококктар, вейллонеллалар, пропионобактериялар, бактериоидтар, флоробактериялар, преворобактериялар, флоробактериялар бөліп алынады.

Бірінші кезең.

1. Анаэробтарды тасымалдау жүйелерін пайдалана отырып материалды жинау және тасымалдау.
2. Материалды микроскопиялық зерттеу (материалда полиморфты микроорганизмдер немесе ұштары кесілген ерекше Грам-позитивті таяқшалар бар).
3. Спора түзетін анаэробтарды бөліп алу үшін материалды температуралық немесе спирттік соққы әдістерімен алдын ала өңдеу.

Алкогольді шок процедурасы: 1 сағат бойы бөлме температурасында (22–25 °C) тұрақты араластыра отырып, абсолютті (немесе 96%) этил спиртінің және зерттелетін материалдың (нәжіс суспензиясы, жара экссудаты) бірдей көлемдегі қоспасы сақталады.

Жылу соққысының процедурасы: туралған ет-глюкоза-крахмал ортасы бар пробиркада су моншасында 80°C 5 мин қыздырылған, 1 мл сәйкес үлгінің суспензиясын қосады. Үлгіні 10 минутқа қалдырыңыз, содан кейін түтікшені алып тастаңыз және салқын суға егу алдында суытыңыз.

4. Оқшауланған колонияларды алу үшін материалды анаэробты қанды агарға, элективті және дифференциалды диагностикалық қоректік ортаға егу (гентамицин қосылған анаэробты қан агары немесе неомицин мен налидикс қышқылы бар анаэробты қан агары). Инокуляциялар анаэробты жағдайда (анаэробты камерада немесе микроанаэробты баллонда немесе анаэробты қапшықта) 37°C температурада 24-48 сағат бойы инкубацияланады.

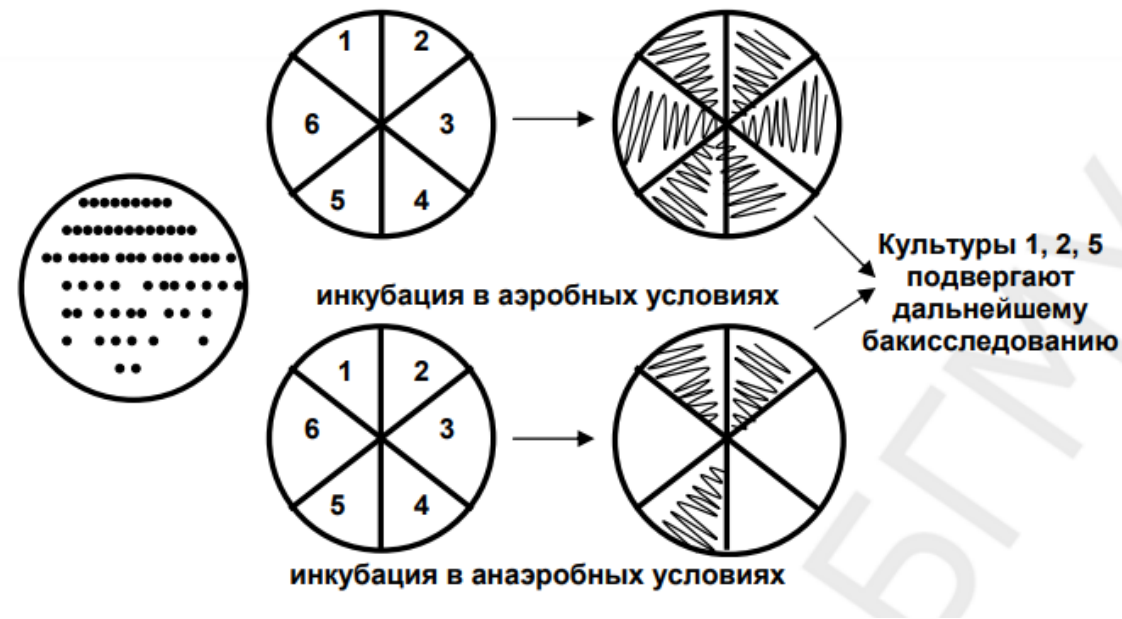
1. Анықтау үшін материалды сұйық тиогликольді ортаға егу

Екінші кезең:

Анаэробты қан агарында колония морфотиптерін зерттеу.

1. Анаэробтардың колониялары шырышты, дөңес, ұсақ, мөлдір, сұр-ақ, шеттері негізінен тегіс. Превотелла, порфиромонас, пептококк және пептострептококктардың пигментті түрлерінің колониялары қаны бар орталарда инкубацияның 7-14-ші күндері ашық-қоңыр немесе қара-қоңыр түске ие болады. Қанды агардағы бактериоидтардың колониялары α -гемолиз аймақтарын бере алады. *Clostridium per fringens* колониялары қос гемолизді тудыруы мүмкін: 1 аймақ (ішкі) - β -гемолиз, 2 аймақ (сыртқы) - α -гемолиз. Жаппай өсу *C. septicum*, *C. tetani* үшін тән. *C. difficile* сынған шыны колонияларды құрайды және пішіні сәл талшықты шеттері бар дөңгелек немесе дұрыс емес болуы мүмкін. *Fusobacterium spp* колониялары. сарғыш немесе сары-кілегей реңктері бар.
2. Тиогликольді ортаның хроматографиясы және ұшқыш май қышқылдарының болуы арқылы ортадағы анаэробтарды индикациялау.
3. Колониялардың микроскопиясы.
4. Вуд шамының көмегімен колониялардың флуоресценциясын зерттеу.
Өткізілетін (365 нм) толқынды ұзындықтағы УК сәулесінде *Prevotella* тұқымдасының өкілдері ашық қызыл флуоресценция, *Porphyromonas* және *C. difficile* тұқымдасы - сары-жасыл флуоресценция береді.

Оқшауланған колониялардың оттегіге сезімталдығын анықтау үшін егу. Селективті анаэробты орталар қатарлас факультативті анаэробты микрофлораның өсуін әрқашан тиімді тежей бермейді, сондықтан бактериологиялық зерттеудің екінші кезеңінде зерттелетін дақылдың оттегіге сезімталдығы расталады. Ол үшін әрі қарай бактериологиялық зерттеуге арналған колонияларды екі Петри табақшасына секторларға параллельді егеді, олардың бірі анаэробты жағдайда, екіншісі аэробты жағдайда инкубацияланады (2-сурет).



Зерттелетін дақылдың оттегіге сезімталдығын тексеру

Үшінші кезең.

Үшінші кезеңде оттегіге сезімталдығы расталған дақылдардың қасиеттері зерттеледі.

1. Грам тәсілімен дайындалған жұғындыдағы анаэробтар дақылының тазалығын анықтау.

2. Биохимиялық сипаттамалары мен ұшқыш май қышқылдарының спектрі негізінде анаэробтардың таза дақылын қорытынды идентификациялау. Түрге дейін болжамды идентификациялау кең ауқымды тестер арқылы жүзеге асырылады, ал түрге дейін егжей-тегжейлі идентификациялау арқылы жүзеге асырылады.

Биохимиялық белгілерді зерттеу анаэробтарды биохимиялық идентификациялау үшін олардың түрлерін салыстырмалы түрде дәл анықтауға мүмкіндік беретін коммерциялық тест жүйелерін қолдану арқылы жасаланынады. Көптеген тест-жүйелер микроорганизмдерді анықтауды жеңілдететін әртүрлі анаэробтардың биохимиялық профильдерінің компьютерлік деректер базасымен бірге қолданылады.

3. Антибиотиктерге сезімталдық спектрін анықтау.

Төртінші кезең аэробтар мен факультативті анаэробтарды оқшаулауға ұқсас.

1. Нәтижелерді есепке алу және талдау.

2. Қорытынды беру.

Бактериологиялық зерттеу әдісінің кезеңдері 2 - кестеде жинақталған.

Кесте 2 - Бактериологиялық зерттеу әдісінің схемасы

Кезеңдер	мазмұны	
	Аэробтар мен факультативті анаэробтарды бөліп алу	Облигатты анаэробтарды бөліп алу
Бірінші	<ol style="list-style-type: none"> 1. Материалды жинау, тасымалдау, сақтау, алдын ала өңдеу. 2. Байыту ортасына егу (қажет болса). 3. Микроскопия. 4. Оқшауланған колонияларды алу үшін қоректік ортаға себу (қатаң патогенді микроорганизмдерді оқшаулау кезіндегі сандық егу) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Анаэробты тасымалдау жүйелерінің көмегімен материалды жинау және тасымалдау. 2. Микроскопия. 3. Спора түзетін анаэробтарды бөліп алу үшін материалды температуралық немесе спирттік соққы әдістерімен алдын ала өңдеу. 4. Оқшауланған колонияларды алу үшін анаэробты қанды агарға және элективті, дифференциалды диагностикалық қоректік ортаға себу. 5. Ұшқыш май қышқылдарын анықтау үшін сұйық тиогликольді ортаға егу.
Екінші	<ol style="list-style-type: none"> 1. Колониялардың морфотиптерін зерттеу. 2. Колониялардың микроскопиясы. 3. Поливалентті сарысуы бар шыныдағы шамамен РА (қажет болса). 4. Таза мәдениеттің жинақталуы 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Анаэробты қанды агарда колониялардың морфотиптерін зерттеу. 2. Колониялардың микроскопиясы. 3. Тиогликоль ортасының хроматографиясы және ұшқыш май қышқылдарын анықтау. 4. Вуд шамының көмегімен колониялардың флуоресценциясын зерттеу. 5. Оқшауланған колониялардың оттегіге сезімталдығын анықтау үшін скрининг жүргізу

Үшінші	Жинақтаушы ортадағы өсуді есепке алу	Оттегіге сезімтал дақылдардың қасиеттерін зерттеу
	<ol style="list-style-type: none">1. Грамдық жағындыдағы дақылдың тазалығын бағалау.2. Таза культураға қорытынды идентификациялау.3. Антибиотиктерге сезімталдық спектрін анықтау	
Төртінші	<ol style="list-style-type: none">1. Нәтижелерді есепке алу және талдау.2. Пікір беру	