СПб ГБОУ СПО «Медицинский колледж № 3»

Бактериологический метод

Преподаватель Саенко Т.П.

Вопросы для самоконтроля

1. Цель 1-го тапа. Манипуляции.
2. Продолжительность бак. Метода.
3. Этапы.
4. Методы выделения аэробов (описание, при выделении какой культуры используется конкретный метод).
5. Особенности посева fecies, гноя.
6. Методы посева механическим разобщением.(рис!)
7. Метод Дригальского.

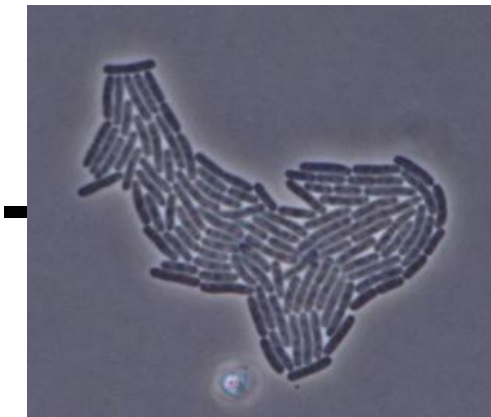
Бактериологический метод -

основной метод **бактериологического исследования**

Метод заключается в **выделении чистой культуры возбудителя и его идентификации, т.е. определение этиологии инфекционного заболевания**

Терминологический словарь

- Культура – это микроорганизмы, выросшие на питательной среде.
- Чистая культура – это микроорганизмы одного вида
- Гемокультура- культура выделенная из крови
- Копрокультура – культура выделенная из fecies
- Колония - это потомство одной микробной клетки. В изолированной колонии– чистая культура.



- **Штамм – это м.о. одного вида выделенные из разных источников (от разных больных)**
- **Культивирование – создание благоприятных условий роста и размножения возбудителя (температура, время, влажность наличие или отсутствие кислорода и др.)**
- **Культуральные свойства – характер роста возбудителя на питательных средах**

Продолжительность и этапы бак. метода

- Средняя продолжительность – 4 -5 дней. 3 этапа:

1 этап – выделение чистой культуры

2 этап – накопление чистой культуры

3 этап - идентификация чистой культуры

- **Идентификация** –это **изучение свойств** микроорганизмов с целью установления **рода, вида, варианта возбудителя**

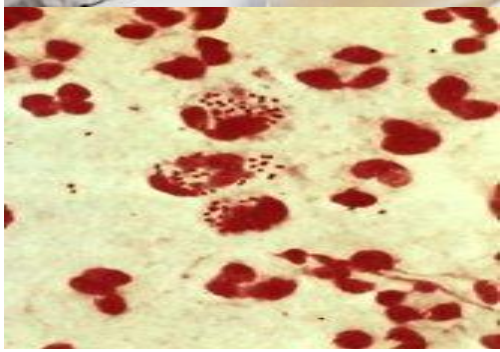
1 этап выделение чистой культуры

1-ый день исследования

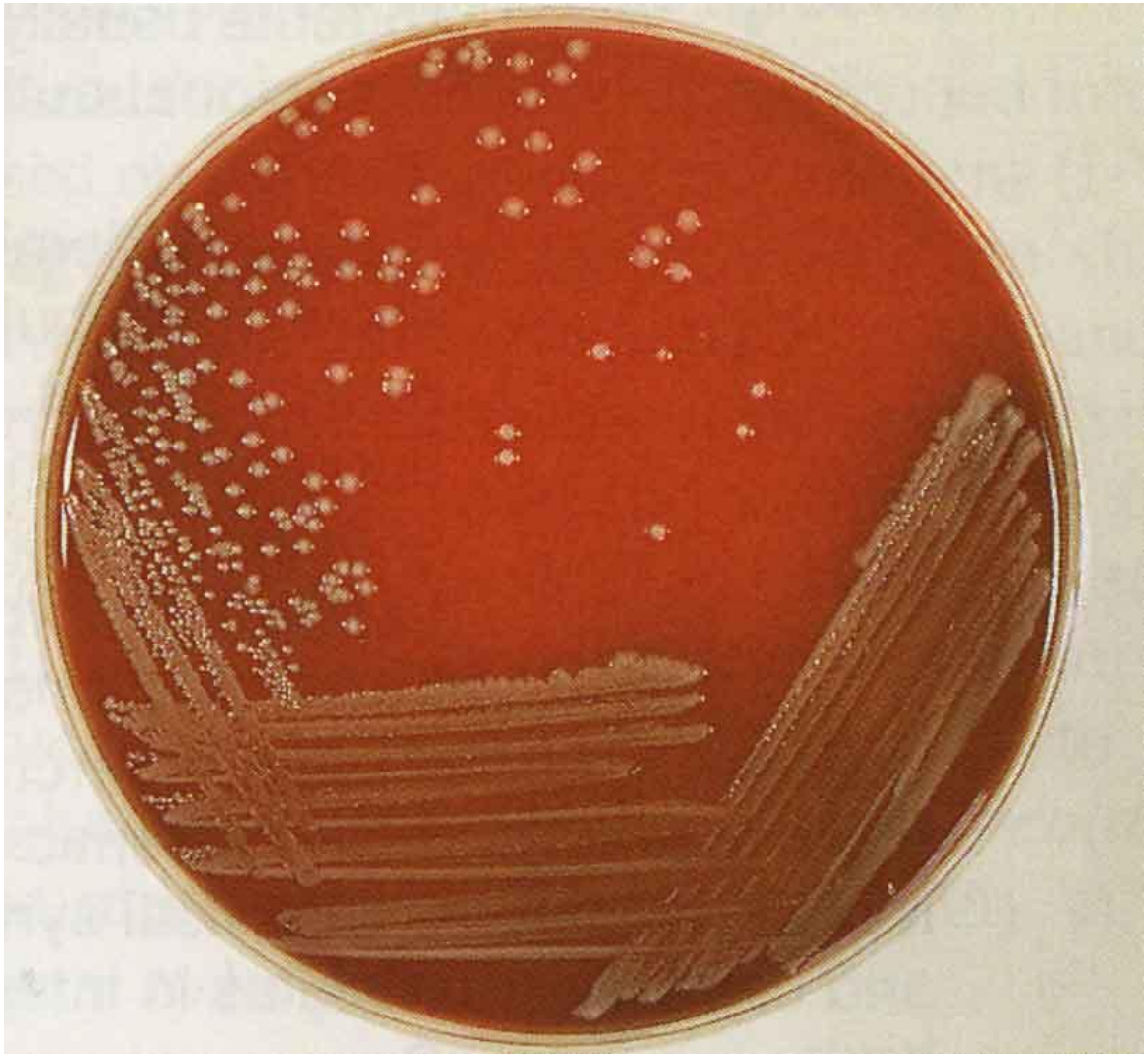
Цель: получение изолирован-ных колоний

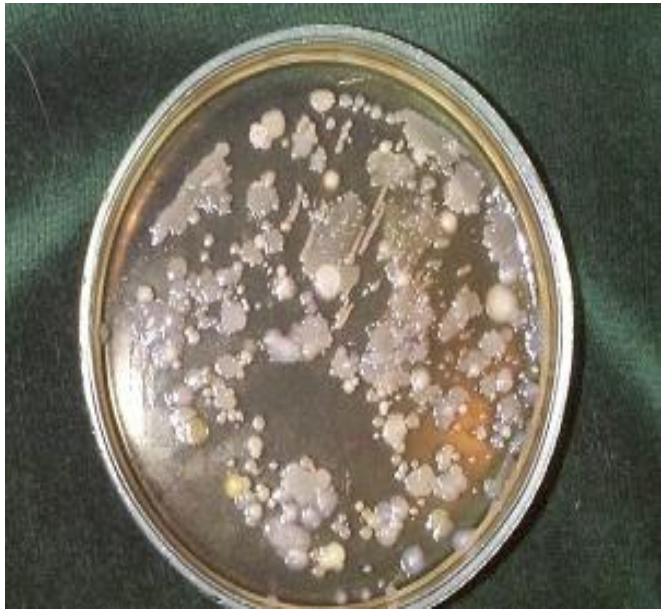
Манипуляции:

1. **Визуальное** изучение исследуемого материала для выявления **нехарактерных включений**
2. Микроскопия (при необходимости)
3. **Подготовка** материала **для посева**
4. **Посев** на среды **обогащения** и **специальные среды**
5. **культивирование**



2 этап(2-ой день исследования)





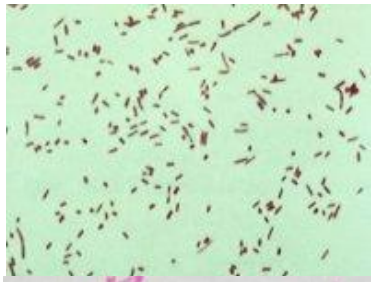
- **Цель этапа – накопление чистой культуры**
- **Манипуляции:**

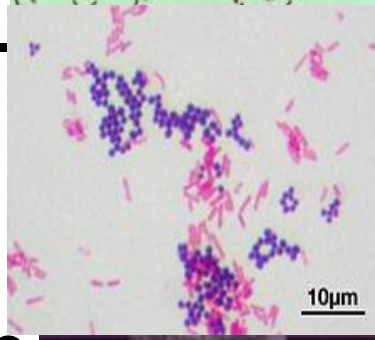
- Выбор характерной изолированной колонии

- Изучение морфологических, тинкториальных свойств и чистоты культуры в характерной колонии – окраска по Граму

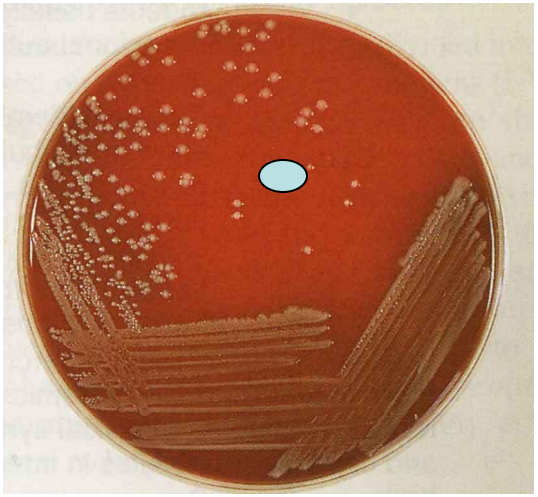
- Посев остатков культуры из характерной колонии на скошенный агар для накопления чистой культуры

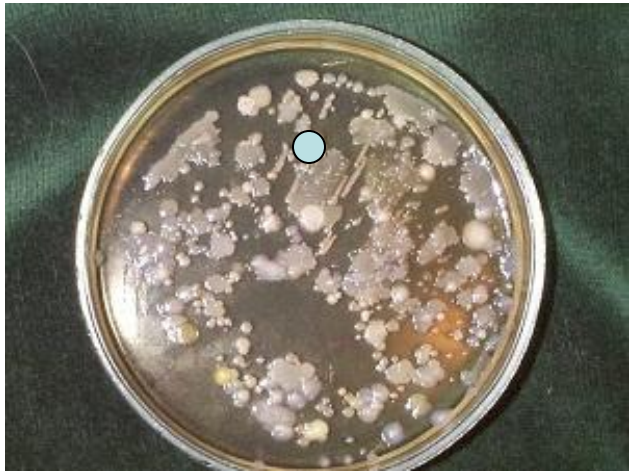
- Культивирование



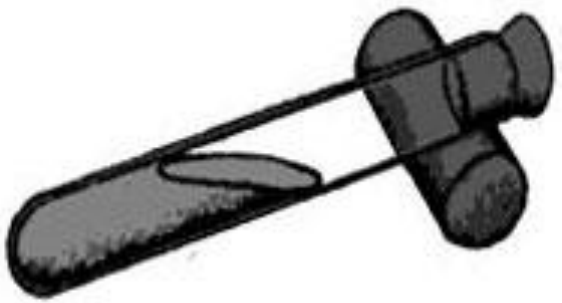


Определение свойств культуры в изолированной характерной колонии





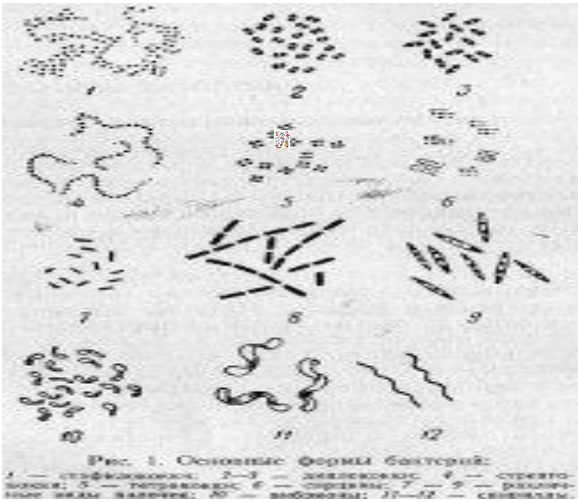
Посев на скошенный агар для накопления чистой культуры

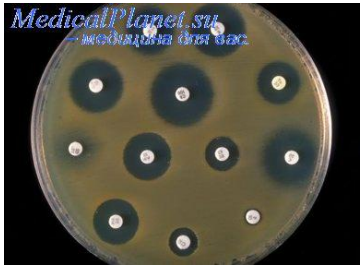


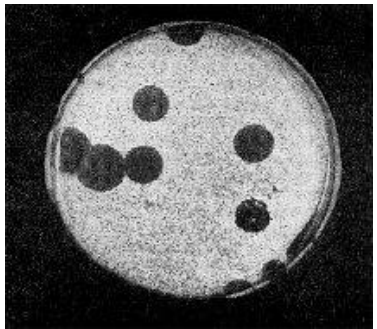
3 этап (3 и 4 день исследования)– идентификация накопленной чистой культуры

Идентификацию проводят по:

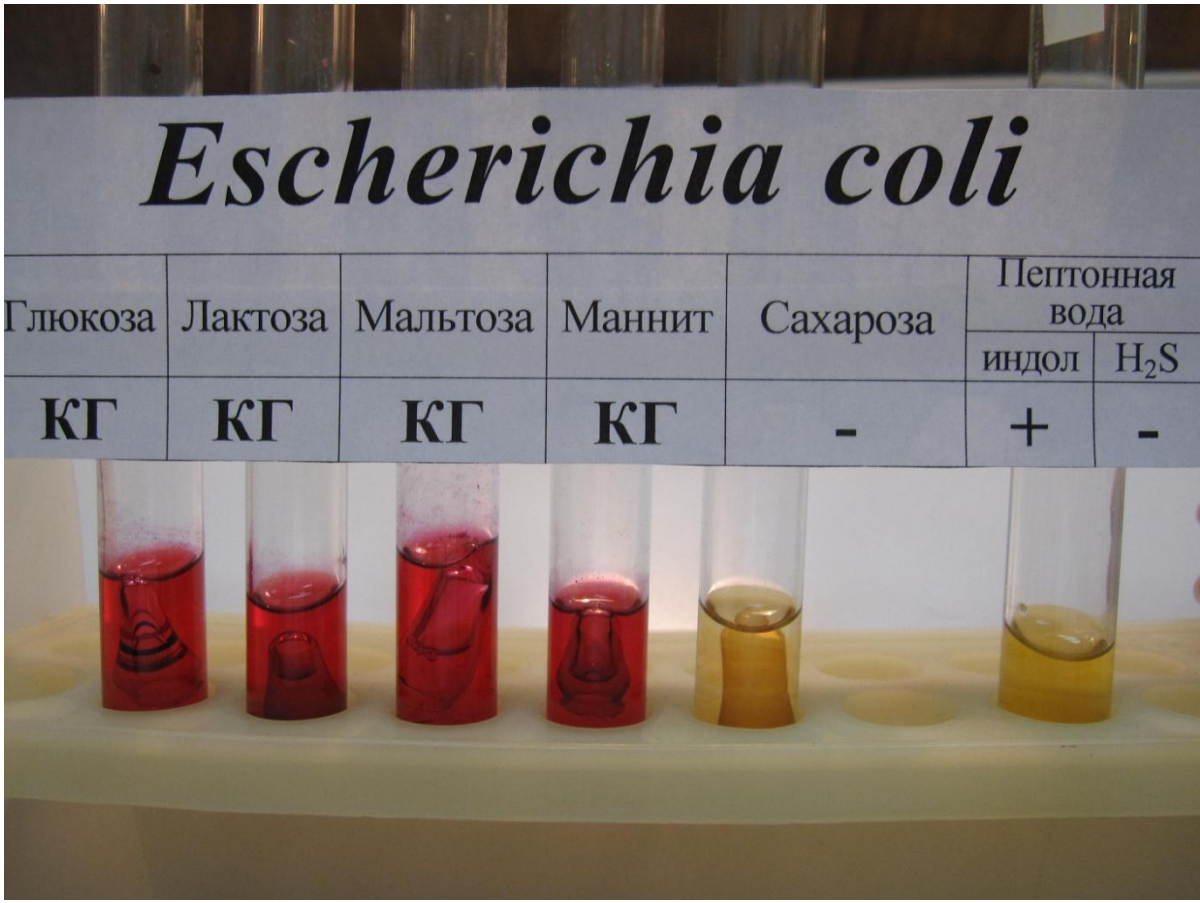
- **Морфологическим** свойствам
- **Тинкториальным** свойствам
- **Культуральным** свойствам
- **Биохимической** активности
- Чувствительности к **антибиотикам**
- Чувствительности к **бактериофагу**
- **Антигенной структуре**



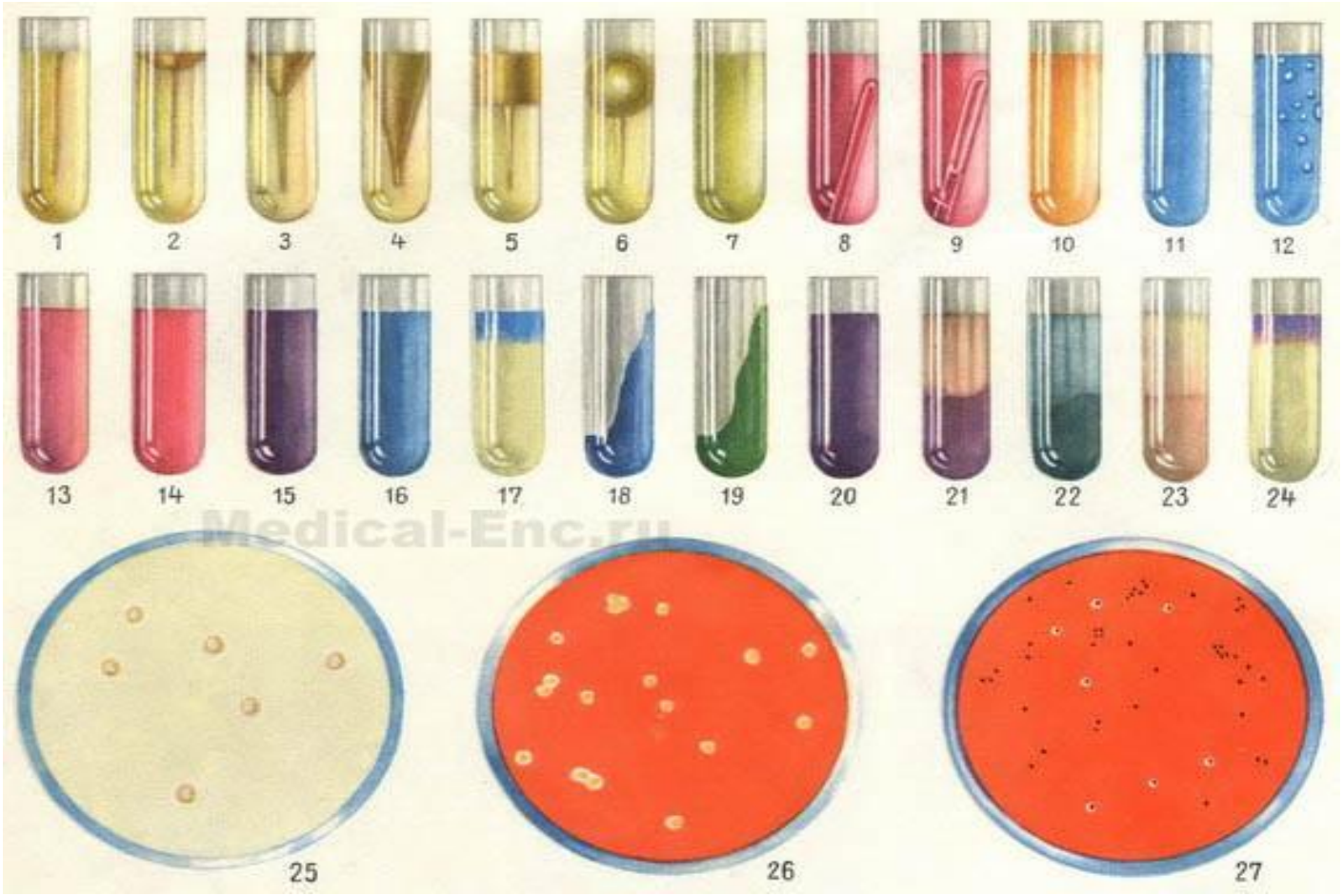




Изучение биохимической активности возбудителя: сахаролитической и протеолитической

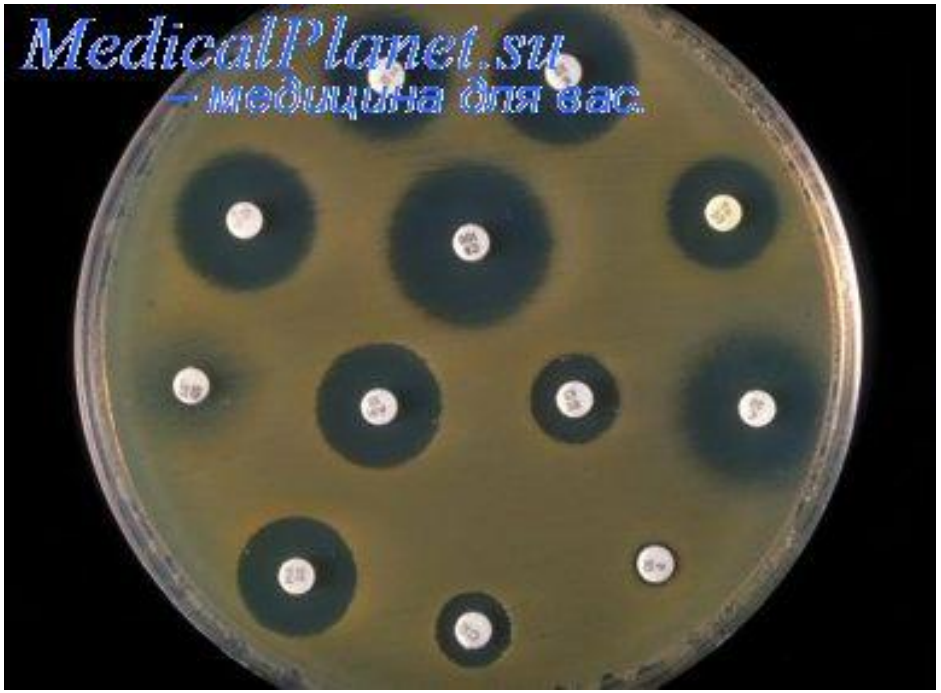


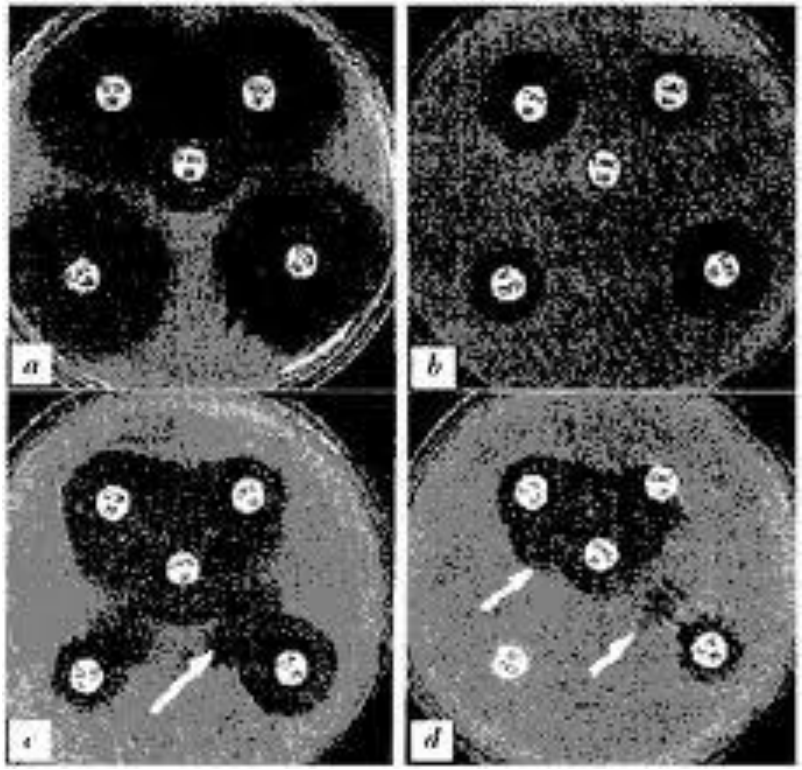
Изучение биохимических свойств чистой культуры



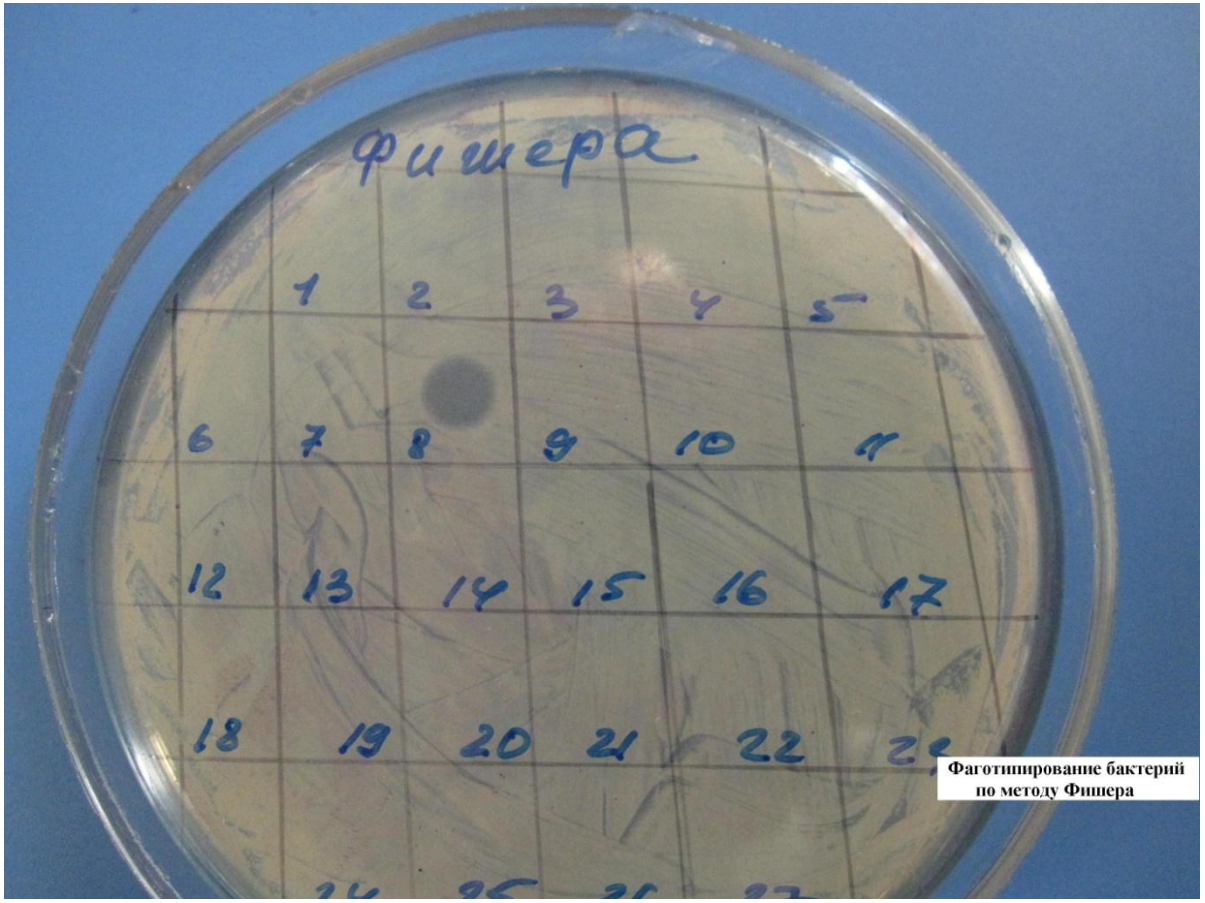
- **Рис. 1—6**. Различные формы расщепления **желатины.**
- **Рис. 7 — 9.** Жидкая среда **с углеводом** и индикатором **Андраде**: рис. 7 — отсутствие ферментации; рис. 8 — ферментация с образованием кислоты; рис. 9 — ферментация с образованием кислоты и газа.
- **Рис. 10 — 12.** Полужидкая среда **с углеводом и индикатором ВР** (из сухой питательной среды): рис. 10 — отсутствие ферментации; рис. 11 — ферментация с образованием кислоты; рис. 12 — ферментация с образованием кислоты и газа.
- **Рис. 13—15**. Искусственная **лакмусовая сыворотка по Зейтцу**: рис. 13 — отсутствие ферментации; рис. 14 — ферментация с образованием кислоты; рис. 15 — ферментация с образованием щелочи.
- **Рис. 16 и 17. Молоко с метиленовым синим**: рис. 16 — отсутствие **редукции**; рис. 17 —**редукция.**
- **Рис. 18 и 19. Среда Симонса**: рис. 18 —отсутствие ассимиляции **цитрата**; рис. 19 — ассимиляция **цитрата**.
- **Рис. 20 — 24. Лакмусовое молоко**: рис. 20 — отсутствие ферментации; рис. 21 — ферментация с образованием кислоты; рис. 22 — ферментация с образованием щелочи; рис. 23 — пептонизация; рис. 24 — редукция.
- **Рис. 25**. **Разжижение свернутой сыворотки** (в проходящем свете).
- **Рис. 26**. **Гемолиз** на кровяном агаре (в проходящем свете).
- **Рис. 27.** Кровяная среда с теллуритом калия.

Определение чувствительности к антибиоткам методом «стандартных дисков»





Фаготипирование



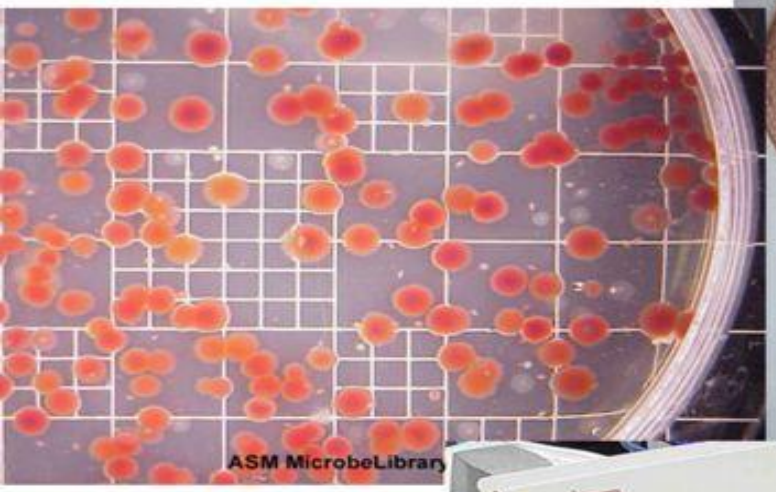
Фаготипирование бактерий по методу Фишера

Методы выделения чистой культуры возбудителя

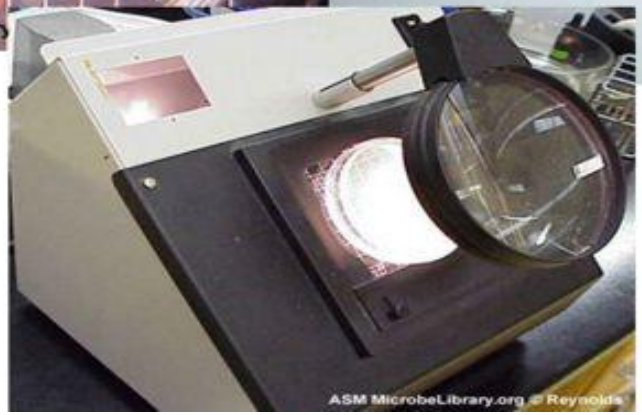
Механический принцип	**Биологический принцип**
1. Метод фракционных разведений Л.Пастера	Принимают во внимание : А) тип дыхания (метод Фортнера)
2. Метод пластинчатых разведений Р.Коха	Б) подвижность (метод Шукевича) В) кислотоустойчивость
3. Метод поверхностных посевов Дригальского	Г) спорообразование
4. Метод поверхностных штрихов	Д) температурный оптимум
	Е) избирательную чувствительность лаб.животных к бактериям

Чистая культура – это скопление м/о одного вида на плотной или в жидкой питательной среде

По результатам посева серийных разведений исследуемого материала выбирают чашку Петри, удобную для подсчета колоний.



Подсчет колоний



MyShared

Техника посевов

- Методы выделения чистых культур , основанные на принципе **механического разобщения.**

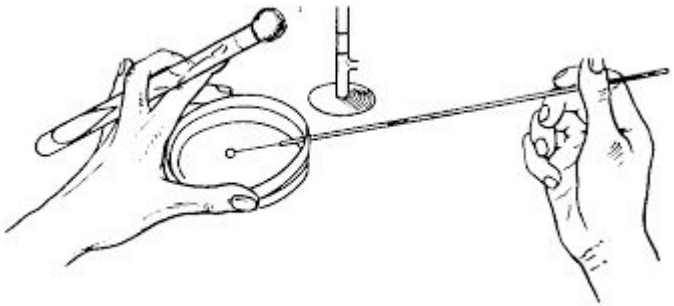
Методы механического разобщения:

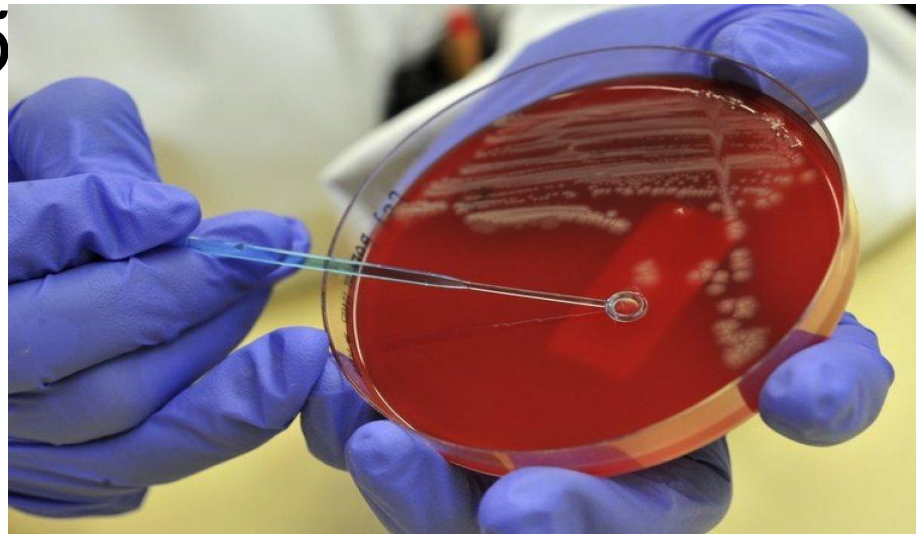
- Фильтрация
- Концентрация возбудителя – центрифугирование (применяется , если в исслед.м-ле мало возбудителя- ликвор)--- осадок на исследование
- Посевы методом механического разобщения с посевной площадкой

Цель:

- Получить изолированные колонии при помощи различных методов посева исследуемого м-ла на поверхность ПС.

Чаще всего используют метод разобщения с *посевной площадкой*, посев производят б





Техника посева

- Сначала стерилизуют петлю в верхней части пламени горелки. Пробирку(емкость с иссл.м-лом) открывают и проносят через пламя горелки. Петлю опускают в пробирку и, осторожно касаясь стенки, охлаждают. В последующем петлю опускают в пробирку и набирают материал. Если он находится в жидком состоянии, для посева достаточно капли жидкости, которая задерживается в бак.петле. Когда используют микроорганизмы, которые выросли на поверхности среды, осторожно плавным движением набирают небольшое количество их, следя, чтобы не повредить питательную среду.Петлю медленно вынимают из пробирки, не касаясь ее стенок, и переносят (втирают !) в ч. Петри на поверхность среды возле края чашки – это «посевная площадка»
  Следующий этап посева начинают с места, где закончился предыдущий. **Петлю кладут горизонтально на поверхность агара**, где была сделана «посевная площадка», делают рассев по поверхности остальной среды. Необходимо пытаться, чтобы штрихи посева длились **от края к краю чашки,** не повреждали поверхности агара и располагались близко друг к другу. Этим искусственно продлевается линия посева и создаются возможности для получения изолированных колоний.
  После этого петлю стерилизуют в пламени, чтобы уничтожить избыток материала.

Техника посева

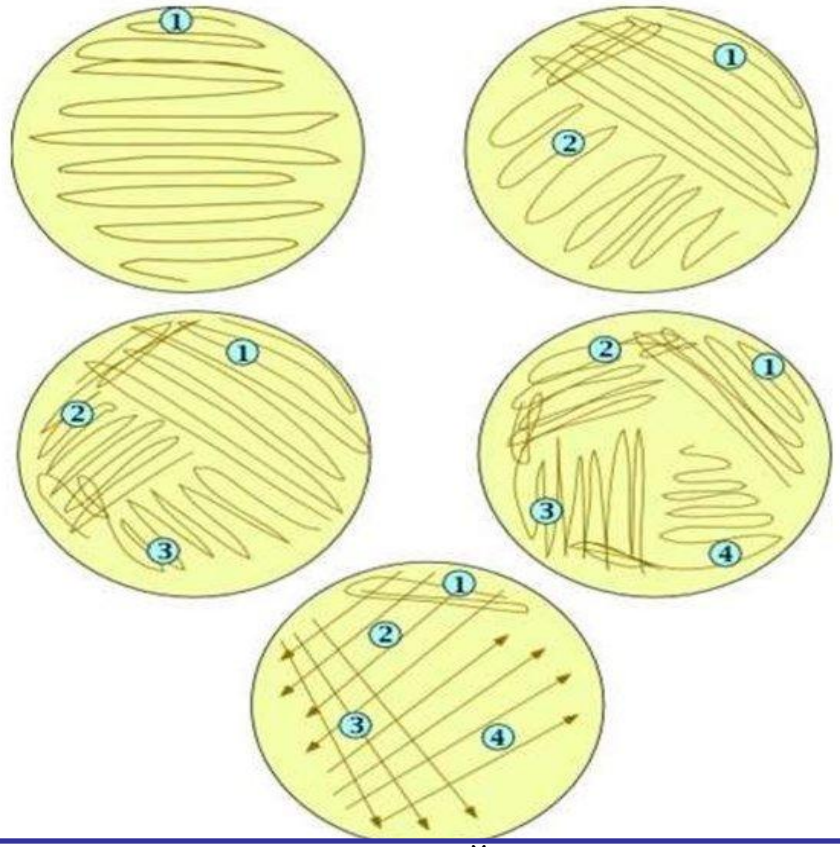
- Сначала стерилизуют петлю в верхней части пламени горелки. Пробирку(емкость с иссл.м-лом) открывают и проносят через пламя горелки. Петлю опускают в пробирку и, осторожно касаясь стенки, охлаждают. В последующем петлю опускают в пробирку и набирают материал. Если он находится в жидком состоянии, для посева достаточно капли жидкости, которая задерживается в бак.петле. Когда используют микроорганизмы, которые выросли на поверхности среды, осторожно плавным движением набирают небольшое количество их, следя, чтобы не повредить питательную среду.Петлю медленно вынимают из пробирки, не касаясь ее стенок, и переносят (втирают !) в ч. Петри на поверхность среды возле края чашки – это «посевная площадка»
  Следующий этап посева начинают с места, где закончился предыдущий. **Петлю кладут горизонтально на поверхность агара**, где была сделана «посевная площадка», делают рассев по поверхности остальной среды. Необходимо пытаться, чтобы штрихи посева длились **от края к краю чашки,** не повреждали поверхности агара и располагались близко друг к другу. Этим искусственно продлевается линия посева и создаются возможности для получения изолированных колоний.
  После этого петлю стерилизуют в пламени, чтобы уничтожить избыток материала.

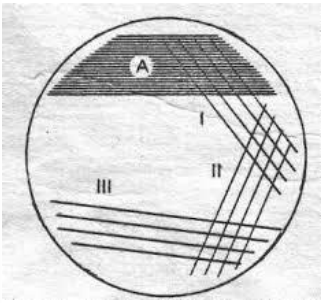
Посев истощающим штрихом

Область применения:

для выделения чистых культур из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору.

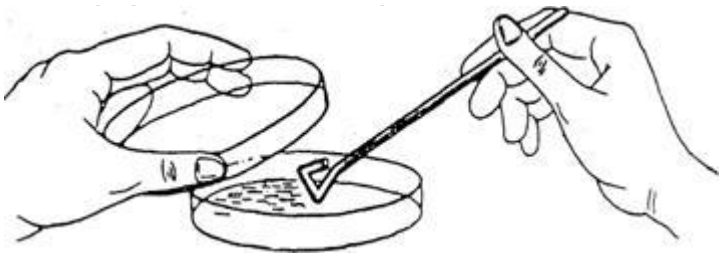
Материал отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рисунке. Перед каждым новым нанесением петлю стерилизуют в пламени горелки.





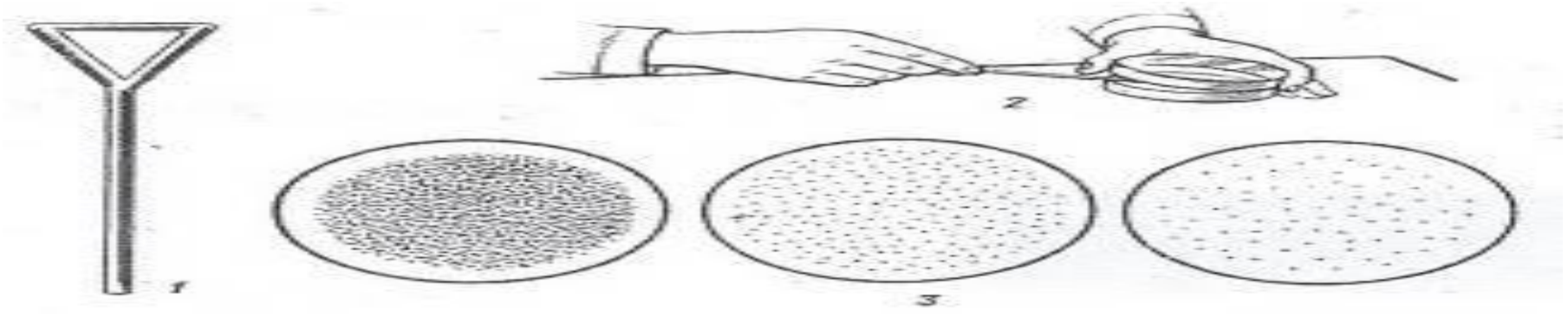
Спустя сутки инкубации посевов при оптимальной температуре на поверхности чашки вырастают изолированные колонии микробов.

- ***Посев шпателем и тампоном в чашки Петри***. Материал предварительно наносят на поверхность питательной среды возле края чашки петлей или пипеткой. Стерильный **шпатель** проносят через пламя, охлаждают, касаясь стенки чашки. Осторожными круговыми движениями, держа чашку полузакрытой, распределяют материал равномерно по поверхности среды.
- При посеве **тампоном** чашку открывают одной рукой, тампоном касаются поверхности агара возле края чашки и начинают проводить штрихами от края к краю чашки, втирая осторожно материал в поверхность среды, не повреждая его, постепенно вращая тампон. После проведения посева чашку вращают на 90° и повторяют перпенд



Метод Дригальского

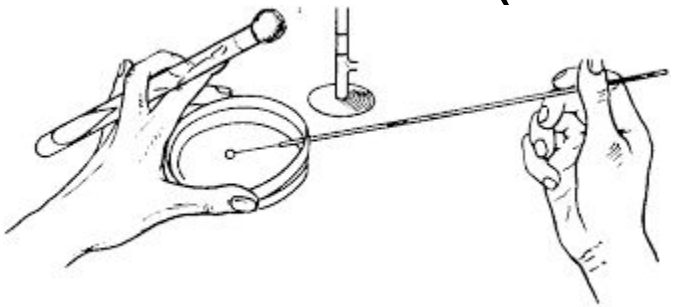
- Сначала на поверхность среды в чашке Петри пипеткой или петлей наносят исследуемый материал. С помощью металлического или стеклянного шпателя его тщательным образом втирают в среду. Чашку во время посева держат приоткрытой и осторожно вращают, чтобы равномерно распределить материал. Не стерилизуя шпателя, засевают материал в другой чашке Петри, при необходимости – в третьей. Только после этого шпатель окунают в дез. раствор или прожаривают в пламени горелки. На поверхности среды в первой чашке наблюдаем, как правило, сплошной рост бактерий, во второй – густой рост, а в третьей – рост в виде изолированных колоний.



Способы посева

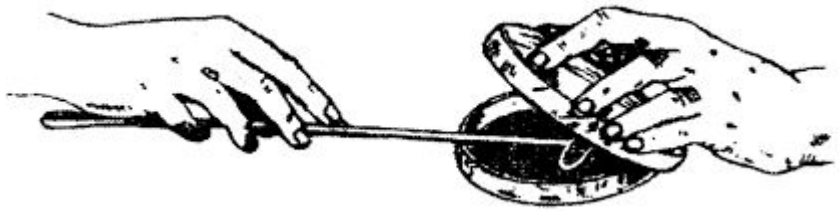
1. Открытый

Для выделения возбудителей кишечных инфекций. Фекалии засевают стеклянной палочкой(петлей) открытым способом



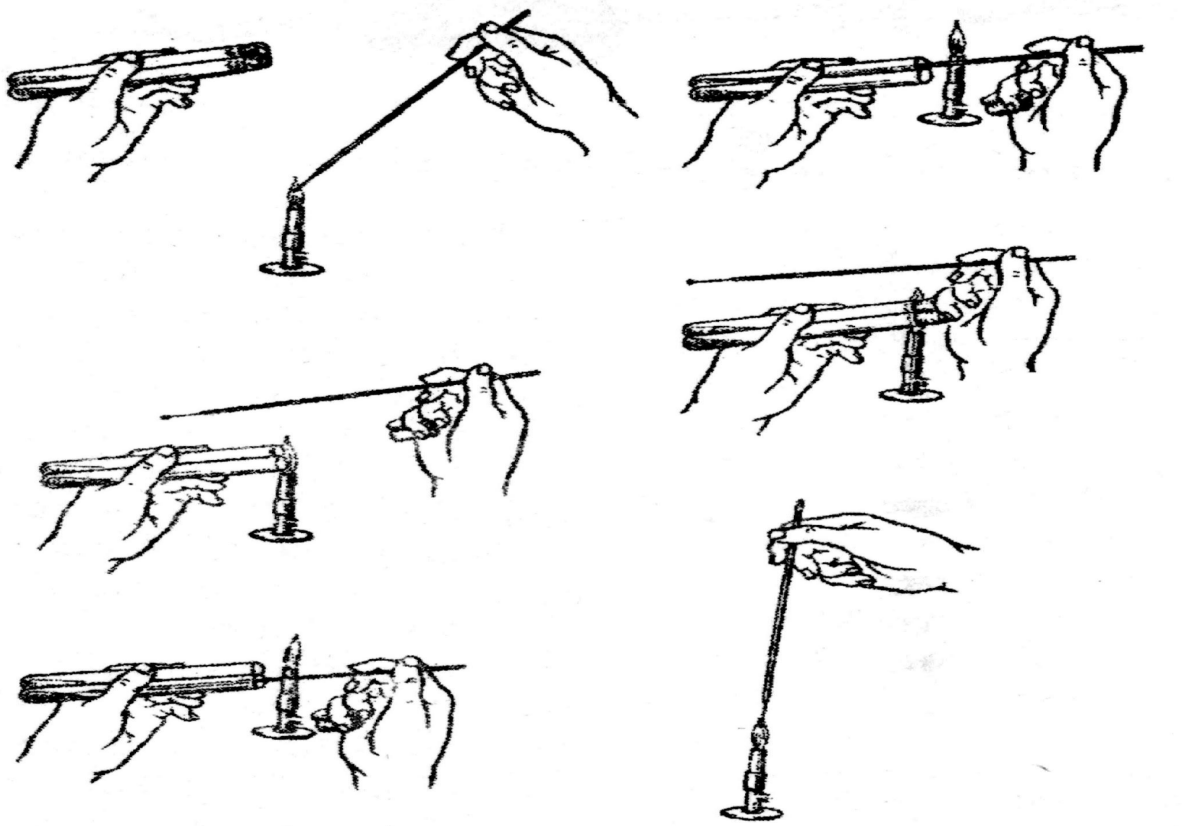
2. Закрытый

Для выделения возбудителей воздушно-капельных инфекций и изучения гноя. Гной засевают шпателем.



Техника посевов в жидкие среды имеет свои особенности.

- **В левую руку берут две пробирки**. В одной находится питательная среда (плотная или жидкая), в другой – исследуемый материал. Пробирки зажимают большим и указательным пальцами. Для того, чтобы можно было наблюдать за содержанием пробирок, **их держат свер**



Пробирки должны быть наклоненными. Нужно следить, чтобы при открытии их материал не был инфицирован.

Пробки из пробирок вынимают, держа их 4 и 5 пальцами правой руки. Тремя другими пальцами правой руки, как карандаш, держат бак.петлю или пипетку, которыми распределяют исследуемый материал. Сначала стерилизуют петлю в верхней части пламени газовой горелки. Пробирки открывают и край их проносят через пламя горелки. Петлю опускают в пробирку, где есть исследуемый материал, и, осторожно касаясь стенки, охлаждают. В последующем петлю опускают в пробирку и набирают материал. Если он находится в жидком состоянии, для посева достаточно капли жидкости, которая задерживается в бактериологической петле. Петлю медленно вынимают из пробирки, не касаясь ее стенок, и переносят в пробирку со средой.

Хим. и физ. методы подготовки материала

Физ. метод разобщения микробных клеток :

1. При выделении ***споровой культуры*** иссл. м-л. Нагревают до 80 20 мин.

Низкие t – выделение психофилов (это м/о, которые размножаются при низ t)

Хим. Факторы :

Применяются при выделении кислото- и щелочеустойчивых м/щ (туберкулез). Иссл. м-л обрабатывается 4-5% H_2SO_4

Выбор иссл.м-ла для БАК метода зависит от :

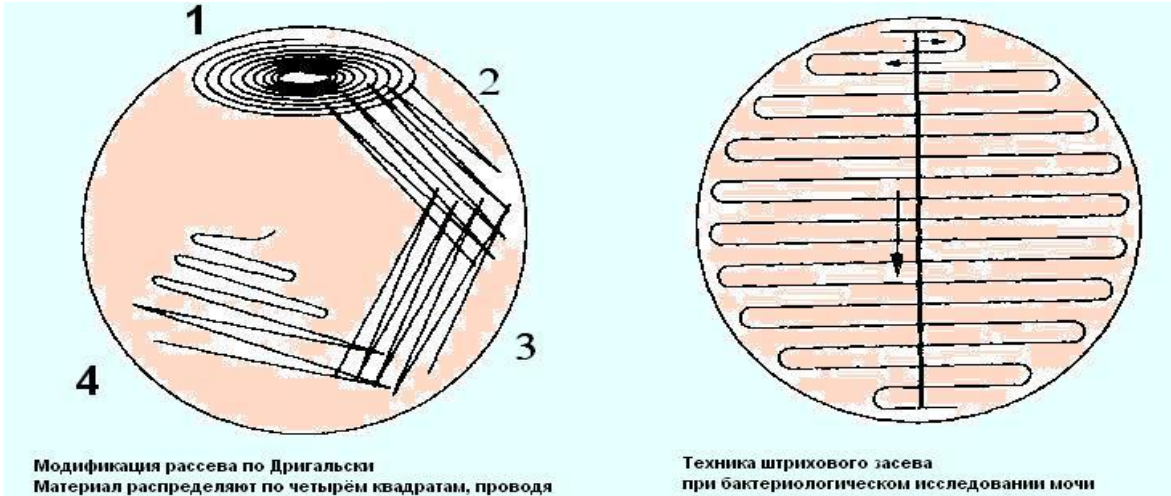
- 1. Вида возбудителя
- 2. Периода заболевания
- 3. Преимущественной локализации возбудителя

- Культура, выделенная из **крови – гемокультура**
- Культура, выделенная из **фекалий - копрокультура**

Посев fecies на среду Эндо механическим разобщением, открытым способом стеклянной палочкой

- Ход работы :

1. Промаркировать ч. Петри по дну
2. Инфицировать палочку, стряхнуть избыток материала, не вынимая из пробирки
3. Прожечь края пробирки и пробку. Закрыть пробирку
4. Посевную площадку сделать, вращая палочку
5. Засеять агар механическим разобщением открытым способом



Модификация рассева по Дригальски
Материал распределяют по четырём квадратам, проводя

Техника штрихового засева
при бактериологическом исследовании мочи