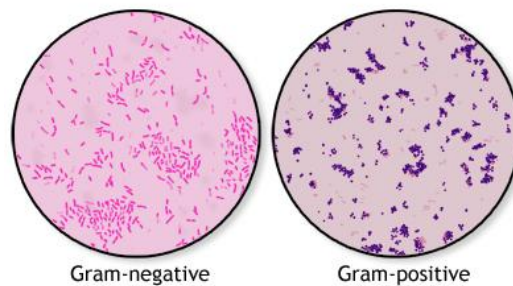


Учебная лаборатория соответствует уровню биобезопасности (ББД)-1. Поэтому правила поведения определяются соответствующими требованиями этого уровня, работа в учебной лаборатории идет с такими возбудителями, которые не вызывают заболевания у взрослого здорового человека. Соответственно, используются стандартные микробиологические методы. Без каких-либо специальных первичных или вторичных барьеров, кроме раковины.

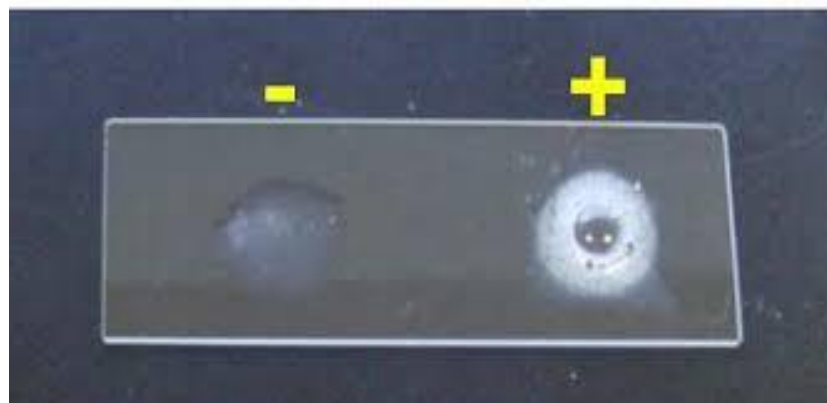
1. Метод по Граму. Окрашивание по Граму важно для дифференциации бактерий по химическим и физическим свойствам их клеточной стенки. Однако недостаточно идентифицировать бактерии.



2. Активность каталазы можно использовать для дифференциации грамположительных кокков; Все стафилококки каталазоположительны, а стрептококки каталазоотрицательны. Для сравнения возьмем музейные штаммы (ATCC) *Staphylococcus aureus* (каталаза положительная) и *Enterococcus faecalis* (каталаза отрицательная).

Порядок действий: 1. Возьмите предметное стекло. 2. Внесите бактерии петлей на сухое стекло и капните перекись водорода.

интерпретация: образование пузырьков указывает на положительную реакцию.



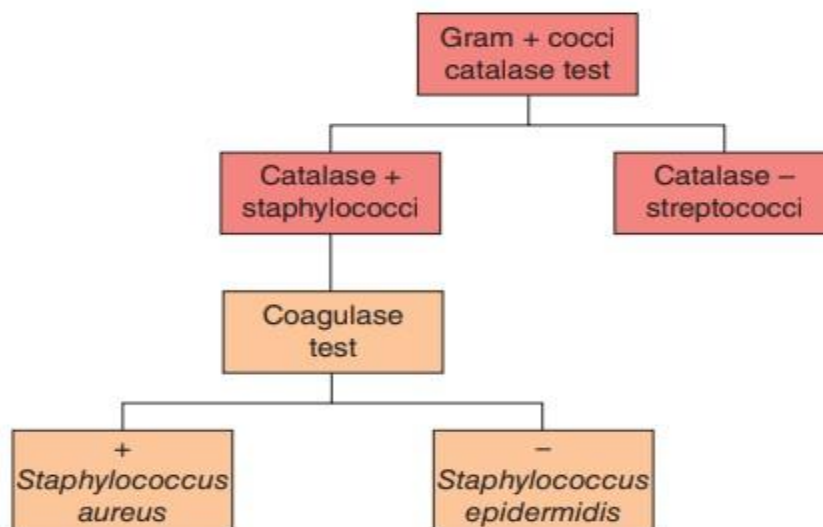


FIGURE 3-1 Algorithm for differentiating the Gram-positive cocci

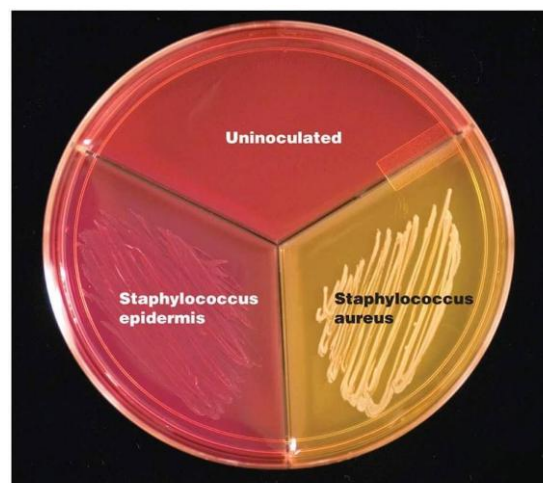
3. Маннитол-солевой агар (MSA) — это питательная среда, используемая для идентификации и дифференциации видов стафилококков. Поэтому она одновременно является селективной (избирательной) и дифференциальной средой.

Процедура:

Бактерию засевают на агар MSA и помещают в термостат (37°C) на 24 часа.

Интерпретация:

- **Положительный результат (жёлтый цвет):** бактерия расщепляет маннитол, образует кислоту, что изменяет цвет добавленного в среду индикатора (из красного в жёлтый). Например, *Staphylococcus aureus*.
- **Отрицательный результат (красный/розовый цвет):** бактерия растёт, но не расщепляет маннитол, поэтому цвет среды не меняется. Например, *Staphylococcus epidermidis*.



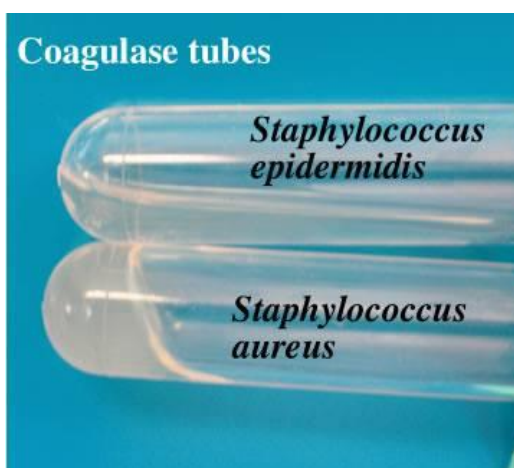
© 2013 Pearson Education, Inc.

4. Коагулазный тест.

Для идентификации стафилококков на уровне вида используют коагулазный тест. *Staphylococcus aureus* — коагулаза-положительный, а *Staphylococcus epidermidis* — коагулаза-отрицательный. Коагулаза ускоряет образование фибринового сгустка из его предшественника — фибриногена. Этот сгусток может защищать бактерию от фагоцитоза, изолируя инфицированный участок и покрывая микроорганизм слоем фибрина.

Процедура:

В стерильную пробирку вносят 0,5 мл цитратной плазмы кролика. В плазму добавляют несколько колоний чистой культуры исследуемой бактерии. Пробирку помещают в термостат при температуре 37 °С. Периодически (каждый 1 час, максимум в течение 4–24 часов) проверяют наличие свертывания.



Интерпретация:

- **Положительный результат (+):** плазма свертывается, при наклоне пробирки не выливается. Соответственно, идентифицирован *Staphylococcus aureus*.
- **Отрицательный результат (–):** плазма остаётся жидкой и однородной. Стафилококк коагулазо-отрицательный (*Staphylococcus epidermidis* или *Staphylococcus saprophyticus*).

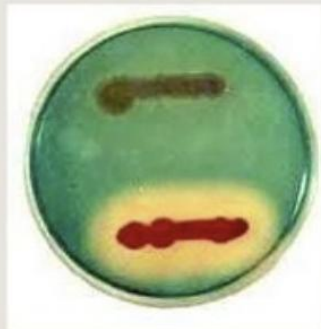
5. Тест ДНКаза

Тест на ДНКазу используется для идентификации и дифференциации микроорганизмов, которые продуцируют дезоксирибонуклеазу (ДНКазу), фермент, который гидролизует дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) на более мелкие фрагменты, такие как нуклеотиды. ДНКаза расщепляет внеклеточную ДНК, что может помочь бактериям уклоняться от иммунного ответа хозяина.

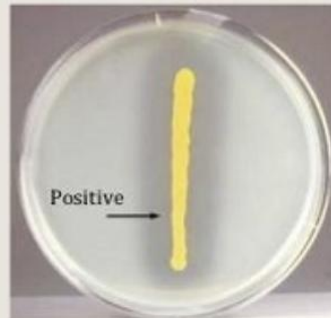
Активность ДНКаза может быть важным диагностическим маркером в клинической микробиологии, особенно для различия *Staphylococcus aureus* (ДНКаза-положительный, коагулазо-положительный) от других видов стафилококков, таких как *Staphylococcus lugdunensis* (ДНКаза-отрицательный, коагулазо-отрицательный).

Процедура:

Используя стерильную инокуляционную петлю, возьмите небольшое количество тестируемого микроорганизма и перенесите его на поверхность ДНКазного агар. Инкубировать при 35-37°C в течение 24 часов, в зависимости от скорости роста микроорганизма. После инкубации осторожно вылейте 1N HCl на поверхность агар. Через 5-10 минут прочитайте ответ. Яркая полоса вокруг роста бактерий указывает на положительный результат ДНКазы, показывая, что ДНК гидролизована. Причина в том, что добавляемая нами соляная кислота вызывает осаждение оставшейся в агаре ДНК. Результат отрицательный, если не наблюдается четкой зоны, что указывает на то, что микроорганизм не вырабатывает ДНКазу.



- *Escherichia coli* (top): negative-no clearing



- *Serratia marcescens* (bottom): positive-clearing

6. Гемолитическая активность.

Тест на гемолитическую активность (посев на кровяной агар) — один из важнейших диагностических тестов для идентификации бактерий. Он выявляет способность бактерий разрушать эритроциты с помощью синтезируемых ими гемолизин.

Существует три основных типа гемолиза:

α-гемолиз — неполный. Бактерия частично разрушает эритроциты. Гемоглобин окисляется до метгемоглобина. Визуально вокруг колонии появляется зелёная или зеленовато-коричневая зона. Агар не становится прозрачным. Например: *Streptococcus pneumoniae*, стрептококки группы *viridans*.

β-гемолиз — полный. Бактерия полностью разрушает (лизует) эритроциты и содержащийся в них гемоглобин.

- Визуально вокруг колонии образуется чёткая прозрачная (бесцветная) зона. При просмотре на свет агар в этой области прозрачный. Например: *Streptococcus pyogenes* (группа A), *Streptococcus agalactiae* (группа B), *Staphylococcus aureus*.

γ-гемолиз — отсутствие гемолиза. Бактерия не обладает гемолитической активностью и не повреждает эритроциты.

- Визуально цвет агара вокруг колонии не изменяется (остаётся красным). Например: *Enterococcus faecalis*, большинство стафилококков (кроме *S. aureus*).

