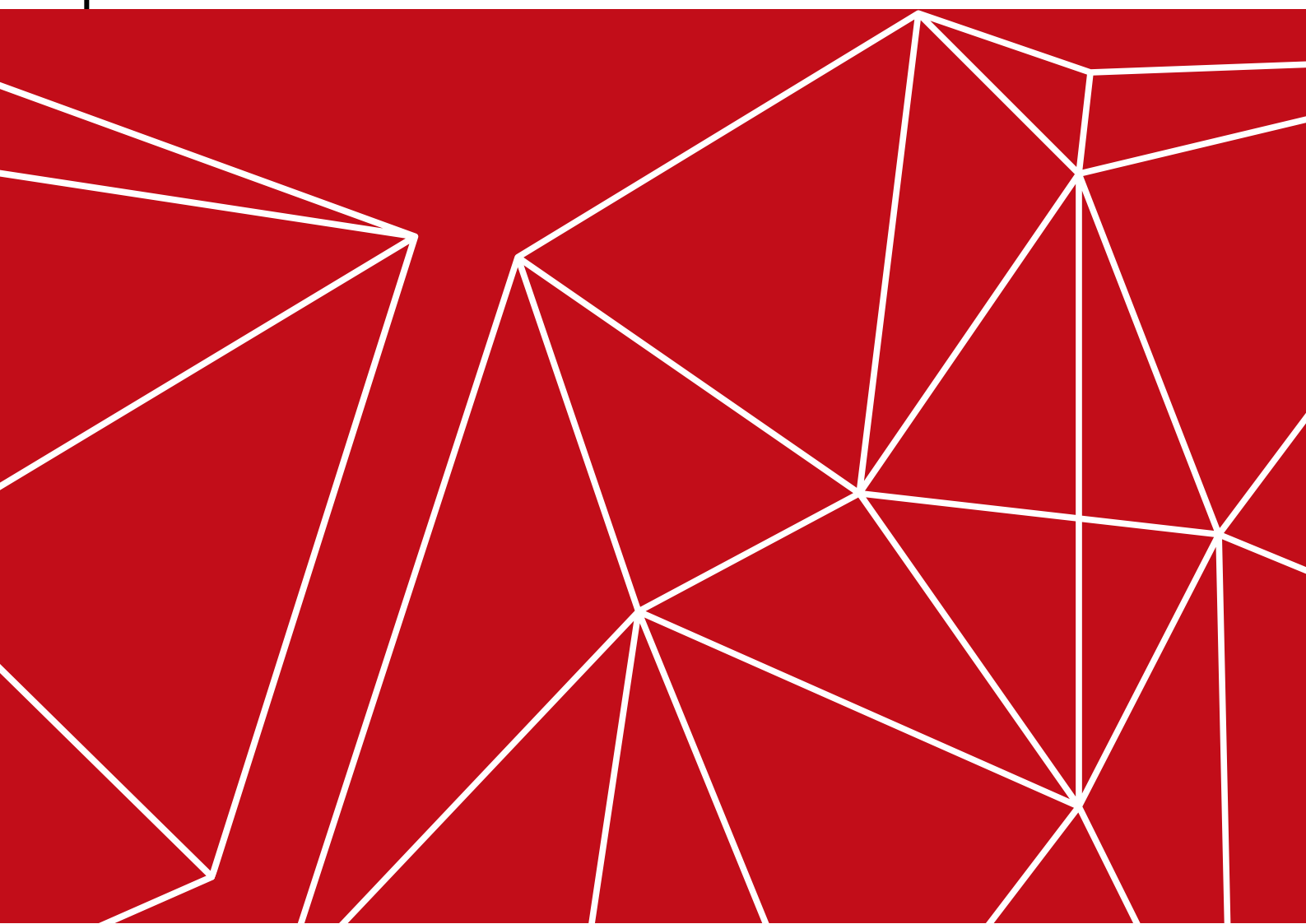




Словарь для микробиолога

(биохимическая идентификация бактерий)



Индольный тест

- Предназначен для выявления у бактерий оксидазы на основании способности этого фермента окислять парафенилендиамин дигидрохлорид, что проявляется изменением цвета красителя.
- Применяют 1%-ный водный раствор реагента или пропитанные им оксидазные полоски.
- Несколько капель раствора красителя или смоченную дистиллированной водой оксидазную полоску наносят на тестируемую колонию бактерии.
- Суспензию исследуемых бактерий можно нанести непосредственно на оксидазную полоску. В обоих случаях результат реакции учитывают через 10-30 с.
- Изменение цвета реактива или полоски до синего или фиолетового в течение указанного времени оценивают как положительную реакцию.

Нитрофенил- галактопиранозидный (ONPG) тест

- Бактерии ферментируют лактозу с помощью 2 ферментов – пермеазы и β -галактозидазы. Активность последней можно выявить с помощью О-нитрофенил- β -D-галактопиранозида. β -галактозидаза расщепляет этот бесцветный субстрат на галактозу и О-нитрофенил, окрашенный в желтый цвет.
- Тест проводят посредством ресуспендирования в смеси пептонной воды и реактива ONPG (3:1) нескольких колоний тестируемого изолята. В процессе 1-24-часовой инкубации при 35-37 °С регулярно учитывают результаты: при положительной реакции бесцветная суспензия бактерий желтеет.

Оксидазный тест

- Основан на способности бактерий ферментативно расщеплять триптофан до индола. Среда, на которой выращивают тестируемую культуру или в которой ее ресуспендируют, не должна содержать углеводы, поскольку они могут ингибировать действие фермента триптофаназы, нитриты, дающие ложноположительный результат, а также казеин, гидролиз которого ведет к разрушению триптофана.
- Предпочтительнее пользоваться триптиказо-соевым агаром или жидкими средами, содержащими триптофан. Тест проводят несколькими способами с применением
- реактива Ковача, в состав которого входят парадиметиламинобензальдегид, этанол (или другие спирты – изобутиловый, изоамиловый) и соляная кислота.

Тест проводят аналогично оксидазному либо с помощью индольных пробок.

Изменение цвета реактива, полоски или пробки до

- розово-красного оценивают как положительную реакцию. При отсутствии такой реакции проверяемую культуру дополнительно инкубируют 18-24 ч, после чего повторно проводят индольный тест.

Утилизация цитрата

- Ряд бактерий способны использовать цитрат в качестве единственного источника углерода. При культивировании изолятов, проявляющих такую активность, в цитратном агаре Симмонса в течение 1-4 дней наблюдают признаки размножения бактерий и посинение среды. При наличии роста бактерий, но при отсутствии изменения цвета среды тест проводят повторно, уменьшая посевную дозу.

Утилизация малоната

- Ряд бактерий способны утилизировать малонат в качестве основного источника углерода. Их идентифицируют культивированием в малонатном бульоне с небольшим содержанием глюкозы (присутствие этого углевода не оказывает существенного влияния на результаты теста, а образующаяся при его ферментации кислота нейтрализует спонтанное защелачивание среды).
- В качестве источника азота в среду добавляют только сульфат-аммония.
- В процессе утилизации бактериями и сульфата аммония, и малоната образуется гидроксид натрия, защелачивающий среду, о чем можно судить по изменению цвета индикатора (например, бромтимоловый синий становится зеленым или голубым).
- Ферментирующие глюкозу, но не ферментирующие малонат микроорганизмы изменяют цвет упомянутого индикатора до желтого.

Тест с метиловым красным

- Метаболизм глюкозы энтеробактериями сопровождается образованием пировиноградной кислоты, которую одни бактерии разлагают с образованием молочной, уксусной и формоловой кислот, а другие по бутиленгликолевому пути с образованием нейтральных продуктов (ацетоина и бутанодиола). В первом случае включенный в состав среды индикатор метиловый красный становится красным, а во втором – желтым.

Тест Фогеса-Проскауэра

- Тест основан на выявлении ацетоина (ацетилметилкарбинола) – промежуточного продукта разложения бактериями пировиноградной кислоты, которая образуется при ферментации глюкозы.
- В пробирку с 2,5 мл бульонной культуры тестируемого изолята добавляют 0,3 мл реактива Кларка (5%-ного спиртового раствора α -нафтола) и 0,1 мл 40%-ного раствора гидроксида калия.
- После встряхивания пробирку выдерживают при комнатной температуре 15 мин и учитывают результат теста.
- Положительная реакция проявляется розово-красным окрашиванием смеси. Возможна ложноположительная реакция при слишком длительной инкубации реакционной смеси.

Окислительно-восстановительный (ОФ) тест

- Бактерии утилизируют углеводы посредством ферментации или окисления. Дифференцировать эти способы можно в данном тесте.
- Пониженное соотношение содержания белков и углеводов в средах Хью-Лейфсона и Кинга способствует нейтрализации щелочными продуктами разложения последних кислот при их неинтенсивном образовании. Замена в этой среде аминокислот пептоном позволяет улавливать изменение рН даже при слабом окислении углеводов. В средах Хью-Лейфсона и Кинга индикаторами служат бромтимоловый синий и феноловый красный соответственно.
- В среды добавляют 10% раствора углевода. Делают посев тестируемой культуры в 2 пробирки любой из упомянутых сред уколом на глубину 1/2 высоты столбика агара. В одну из пробирок сверху наслаивают 1 мл стерильного жидкого парафина (или минерального масла). Инкубируют посева 3 суток, ежедневно учитывая результаты теста в обеих пробирках.
- Положительная реакция проявляется окрашиванием среды в желтый цвет, а отрицательная – отсутствием изменений исходного цвета среды (среда Хью-Лейфсона зеленая, а среда Кинга – красная).

Окислительно-восстановительный тест с маннитом

- Стафилококки (в отличие от микрококков) в анаэробных условиях ферментируют маннит, что сопровождается образованием уксусной кислоты, о чем можно судить по изменению цвета индикатора.
- Тест проводят в среде Хью-Лейфсона с 1% маннита.

Сероводородный тест

- Ряд бактерий способны высвобождать сероводород из серосодержащих аминокислот и неорганических соединений серы. В качестве индикаторов образования сероводорода применяют ацетаты свинца и цинка, сульфат аммонийного железа и другие вещества. При их взаимодействии с сероводородом образуются нерастворимые преципитаты сернистых железа или цинка черного цвета.

Для проведения теста пользуются полосками с 30%-ным раствором ацетата свинца, приготовленным на 1%-ном водном растворе гидрокарбоната натрия. Их помещают в пробирку с посевом так, чтобы один конец был снаружи, а другой не доходил до поверхности среды приблизительно на 2,5 см. После 18-24-часовой

- инкубации учитывают результат. При положительной реакции полоска окрашивается в черно-коричневый цвет, при отрицательной – остается белой.
- Тот же принцип лежит в основе применения ряда питательных сред для энтеробактерий, в том числе тройного сахарного агара с железом, агара Клиглера, агара SS, Гектоен-агара, лизиндекарбоксилатного агара и др.).

Гиппуратный тест

- Агалактийный стрептококк и некоторые энтерококки вызывают гидролиз гиппурата натрия, что ведет к образованию глицина и бензоата натрия. При взаимодействии с глицином нингидрин редуцируется, приобретая пурпурный цвет.
- Тест проводят в следующем порядке. Ресуспендируют несколько колоний бактерии в 0,5 мл 1%-ного водного раствора гиппурата натрия. Инкубируют смесь при 37 °С в течение 2 ч. Добавляют в нее 0,2 мл 3,5%-ного раствора нингидрина, приготовленного на смеси ацетона и бутанола (1:1). Выдерживают смесь при той же температуре 10 мин и учитывают результат теста.
- При положительной реакции смесь приобретает пурпурный цвет, при отрицательной – остается бесцветной или становится желтой.

Редукция нитратов

- Некоторые бактерии образуют нитратредуктазу, редуцирующую нитраты в нитриты. Нитриты выявляют специальными реагентами. При отрицательном результате теста в смесь вносят порошкообразный цинк, что позволяет определить причины такого результата: отсутствием у бактерии нитратредуктазы или полным разложением нитратов до азота.
- Тест проводят в следующем порядке. Растворяют в пептонной воде нитрат калия (2%). После автоклавирования засевают пробирки со средой и поплавками тестируемым изолятом бактерий. Посевы инкубируют 1-2 суток при 37 °С.
- Периодически тестируют по 1 мл культуры добавлением 1-2 капель двух реагентов:
 - реагента А (2,8 г сульфаниловой кислоты + 250 мл дистиллированной воды + 100 мл ледяной уксусной кислоты);
 - реагента Б (2,1 мл диметил- α -нафтиламина + 250 мл дистиллированной воды + 100 мл ледяной уксусной кислоты).
- Красное окрашивание культуры свидетельствует о появлении в ней нитритов. При отсутствии красного окрашивания в культуру добавляют щепотку порошкообразного цинка. Окрашивание культуры в красный цвет указывает на отсутствие редукции нитратов, отсутствие окраски - о редукции нитратов до азота. При этом должны быть видны пузырьки газа в поплавке.

Гидролиз эскулина

- Ряд бактерий способны гидролизовать эскулин до гликозида и эскулетина. При контакте с ионами железа последний образует соединения черного цвета. Неизменный эскулин флюоресцирует в ультрафиолетовом свете при длине волны 360 нм, а его гидролиз ведет к исчезновению такого свечения.
- По изменению цвета и флюоресценции посевов на эскулиновых агаре или бульоне судят о способности бактерий гидролизовать эскулин.

Уреазный тест

- Образующая рядом бактерий уреазы расщепляет мочевины до аммиака и углекислого газа, в результате чего реакционная среда с феноловым красным окрашивается в красный цвет. Этим тестом чаще пользуются для идентификации хеликобактерий в биоптатах, но он также применим для выявления уреазы у культур микроорганизмов, выращенных на питательных средах. Кроме того, уреазный тест лежит в основе идентификации уреазоположительных бактерий на агаре Кристенсена и ряде других сред с мочевиной.

Желатиназный тест

- Образующая рядом бактерий желатиназа способна гидролизовать желатину в плотных средах, в результате чего последние разжижаются.
- Тест проводят посевом тестируемой культуры уколом на всю глубину столбика плотной (12%) желатиновой среды. Посевы инкубируют при 35-37 °С, но учет результатов проводят после их остывания до комнатной температуры. При этом избегают перемешивания желатиновой среды, которая при указанной температуре инкубации имеет полужидкую консистенцию.

Каталазный тест

- Каталаза гидролизует перекись водорода с образованием воды и кислорода.
- Для проверки способности бактерии экспрессировать этот фермент делают мазок культуры на предметном стекле. Наносят на него 3%-ный раствор перекиси водорода и сразу же учитывают результаты. Положительная реакция проявляется появлением пузырьков.

Коагулазный тест

- Стафилококки образуют 2 типа коагулазы: связанную с клеточной стенкой («хлопьеобразующий фактор», индуцирующий в присутствии плазмы крови склеивание бактерий) и свободную.
- Хлопьеобразующий фактор определяют посредством смешивания на стекле, в микропробирках или лунках планшетов суспензии тестируемой бактерии и плазмы крови кролика. Учет результатов теста проводят через 10 с.
- Положительная реакция проявляется образованием хлопьев, при отрицательной реакции смесь остается гомогенной.
- Свободную коагулазу выявляют посредством посева изолята бактерий в пробирку с 0,5 мл плазмы крови кролика. Посев инкубируют при 37 °С, учитывая результаты через 4, 12 и 24 ч. Положительный результат проявляется образованием сгустка в любой период инкубации.

ДНК-азный тест

- *S. aureus*, *S. marcescens* и *M. catarrhalis* образуют фермент нуклеазу (ДНК-азу), индуцирующую деполимеризацию ДНК, включенной в состав питательной среды. Это проявляется появлением зоны просветления в среде вокруг растущих колоний упомянутых выше бактерий. Наличие в среде толуидинового синего облегчает выявление таких зон – они окрашиваются в розовый цвет. С той же целью поверхность среды при учете результатов теста заливают на 2-3 мин 0,1 N раствором соляной кислоты. Тест проводят в ДНК-азном агаре.

Лецитиназный тест

- Ряд стафилококков, клостридий, псевдомонад и других бактерий образуют лецитиназу.

Для ее выявления применяют питательные среды с яичным желтком (агар Байрда-Паркера и др.). Вокруг колоний лецитиназоположительных бактерий на таких средах формируется непрозрачная (беловатая или имеющая другой цвет, обусловленный дополнительными компонентами сред) зона.

Фосфатазный тест

- Бактериальная фосфатаза отщепляет фосфатную группу от молекул фосфорорганических соединений. Реакцию выявляют по изменению цвета среды (спонтанному, вызванному окраской образующихся компонентов, или возникающему после добавления специальных реагентов).

Тест проводят в 2 вариантах.

- **Вариант 1.** Растворяют 50 мг динатриевой соли паранитрофенилфосфата в 3 мл стерильной дистиллированной воды. Раствор добавляют в 100 мл расплавленной и охлажденной 1,8%-ной агаровой среды и разливают по чашкам Петри. На среду высевают тестируемые изоляты бактерий и инкубируют при 37 °С в течение 18-24 ч. Положительная реакция проявляется формированием желтой зоны в толще среды вокруг колоний.
- **Вариант 2.** Высевают тестируемые изоляты бактерий на агаровую среду с 0,01% фенолфталеина. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 18-24 ч. Наносят на крышку чашки Петри 5-6 капель 25%-ного раствора аммиака. Выдерживают чашку Петри в перевернутом виде 5-10 мин (для воздействия на колонии паров аммиака) и учитывают результаты теста. Положительная реакция проявляется окрашиванием колоний в розовый цвет.