



АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.

М.А.Абдувахопова

Преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, КуАф

З.Акбарова студентка

2-курса медицинского факультета педиатрического дело 24-06, КуАф.

Аннотация. В работе систематизированы современные методологические подходы к лабораторному анализу бактериальных клеток в рамках клинической диагностики и исследовательской микробиологии. Последовательно оценены все этапы аналитического процесса: от забора первичного биоматериала и визуальной микроскопии до окончательной верификации возбудителя.

Ключевые слова: Микробиологический анализ, бактериальная клетка, чистая культура, окраска по Граму, дифференциально-диагностические среды, идентификация патогенов.

Abstract. This paper synthesizes contemporary methodological approaches to the laboratory analysis of bacterial cells within both clinical diagnostics and research microbiology. The sequential stages of the analytical workflow are systematically evaluated, detailing the progression from standard sample collection and primary microscopy to advanced definitive identification.

Keywords: Microbiological analysis, bacterial cell, pure culture, Gram staining, differential-diagnostic media, pathogen identification.

Введение. Своевременный и точный анализ бактериальных клеток является краеугольным камнем как клинической медицины (педиатрии, инфектологии), так и промышленной биотехнологии [1,5]. Быстрая верификация возбудителя определяет успешность этиотропной терапии,



снижает показатели младенческой смертности и позволяет предотвратить генерализацию инфекционных процессов [4,9]. В то же время, за последние годы методология микробиологического анализа претерпела существенную эволюцию. Традиционные фенотипические подходы, основанные на культуральных методах и визуальной микроскопии, постепенно интегрируются с методами экспресс-идентификации — молекулярно-генетическим анализом (ПЦР) и масс-спектрометрией [6,]. В условиях глобальной селекции полирезистентных штаммов бактерий критическую значимость приобретает не просто определение видовой принадлежности микроорганизма, но и прецизионное (высокоточное) картирование его профиля чувствительности к антибактериальным препаратам (определение МПК) [3].

Ключевые требования, которые необходимо строго соблюдать:

Асептика и стерильность: Взятие любого материала (кровь, ликвор, мокрота, мазки из зева, пробы из биореактора) проводится исключительно с использованием стерильных инструментов (бактериологические петли, одноразовые скальпели, зонды-тампоны) в стерильную герметичную посуду (пробирки, флаконы). Кожные покровы в месте манипуляции предварительно обрабатываются антисептиком для удаления резидентной микрофлоры [1,4].

Сроки забора (до начала терапии): В клинической практике забор материала должен осуществляться строго до начала введения антибиотиков или в интервалах между курсами, когда концентрация препарата в тканях минимальна. Присутствие антибиотика в пробе вызовет бактериостатический эффект, и микроорганизм просто не вырастет на питательной среде, дав ложноотрицательный результат [2,5].

Соблюдение временного и температурного режима («золотой час»): Большинство патогенных и промышленных микроорганизмов крайне лабильны во внешней среде. Образцы должны быть доставлены в



лабораторию максимально быстро — оптимально в течение 1–2 часов с момента забора [4,5].

Достаточный объем пробы: Количество забираемого материала должно быть достаточным для проведения нескольких параллельных тестов: первичной микроскопии, посева на несколько дифференциальных сред и, при необходимости, молекулярно-генетического анализа (ПЦР) [4,10].

Дифференциальная окраска по Граму. Он делит весь бактериальный мир на две огромные группы — **грамположительные (Gram+)** и **грамотрицательные (Gram-)** микроорганизмы, что сразу определяет выбор стартовой антибиотикотерапии [4,5]. Пошаговый алгоритм и физико-химическая суть метода состоят в следующем:

Шаг 1: Мазок окрашивают основным красителем — генцианвиолетом (или кристаллическом фиолетовым) через полоску фильтровальной бумаги. Все бактериальные клетки (и Gram+, и Gram-) окрашиваются в сине-фиолетовый цвет [1].

Шаг 2: Краситель сливают и наносят раствор Люголя (йод). Йод проникает внутрь клетки и образует с генцианвиолетом крупный, прочный комплекс краситель-йод (CV-I) [4].

Шаг 3 (Критический): Мазок обрабатывают 96%-м этиловым спиртом в течение 15–30 секунд. У Грам(+) бактерий она остается сине-фиолетовой. У Грам(–) бактерий она становится бесцветной.

Шаг 4: Для визуализации обесцвеченных клеток мазок докрасивают контрастным красителем — водным фуксином (или сафранином) в течение 1–2 минут. Грам(–) бактерии принимают розово-красный цвет, в то время как Грам(+) бактерии сохраняют свой глубокий фиолетовый окрас [1,2].



Техника приготовления и фиксации мазка. Большинство бактерий бесцветны и прозрачны, поэтому для детального изучения их структуры мазок предварительно окрашивают. Процесс включает три обязательных шага:

Приготовление мазка: Каплю жидкого материала (или каплю физраствора, в которой эмульгирована колония с агара) тонким равномерным слоем распределяют по поверхности чистого предметного стекла [1].

Высушивание: Мазок сушат при комнатной температуре на воздухе.

Фиксация: Проводят предметное стекло через верхнюю треть пламени бактериологической горелки 2–3 раза. Фиксация решает сразу три задачи: убивает микроорганизмы (делая работу безопасной), прочно прикрепляет (фиксирует) клетки к стеклу, чтобы они не смылись краской, и изменяет проницаемость клеточных структур, подготавливая их к восприятию красителей [2,4].

Посев на питательные среды (Культивирование). Цели и задачи культивирования. После первичной микроскопии материала необходимо выделить живую культуру возбудителя. Культивирование преследует три основные цели: накопление биомассы микроорганизма, получение изолированных колоний для выделения чистой культуры и изучение биологических (ферментативных) свойств бактерий [1,4].

Классификация питательных сред. Для выращивания бактерий используют стерильные питательные среды, которые должны быть изотоничными, иметь стабильный pH и содержать все необходимые факторы роста. По назначению среды делятся на несколько групп:

Техника посева («Золотой стандарт»). Для получения изолированных колоний наиболее часто применяется метод механического разобщения (метод секторных посевов или метод Дригальского). Стерильной бактериологической петлей берут небольшое количество материала и наносят



его на поверхность плотного агара в чашке Петри. Штриховыми движениями материал распределяют по поверхности так, чтобы в конце пути петли бактериальные клетки располагались одиночно [1]. Это гарантирует, что каждая выросшая колония будет являться **клоном** одной исходной клетки [2,4].

Макроскопическое изучение колоний (оценка культурных свойств): Микробиолог внимательно изучает выросшие на чашке Петри (после Этапа 3) изолированные колонии, оценивая их фенотипические признаки: форму (круглая, розетковидная), размер (крупные, точечные), характер края (ровный, волнистый), рельеф и поверхность (гладкая S-форма, шероховатая R-форма), цвет (наличие пигмента), прозрачность и консистенцию [1]. Пересев на скошенный агар (накопление чистой культуры): Если микроскопия подтверждает однородность, оставшуюся часть этой же колонии аккуратно забирают стерильной бактериологической петлей вблизи пламени горелки и пересевают штриховыми движениями в пробирку со скошенным питательным агаром [2].

Определение антибиотикограммы (Чувствительности). Клиническое и биотехнологическое значение. Определение чувствительности выделенной чистой культуры бактерий к антибиотикам является критически важным шагом. В клинической медицине этот этап позволяет преодолеть проблему полирезистентности и подобрать для пациента индивидуальную, прицельную схему лечения [4, 5]. В промышленной биотехнологии этот тест необходим для контроля стабильности штаммов-продуцентов и выявления генетических маркеров устойчивости [3]. В лабораторной практике используют два базовых метода оценки: качественный (диско-диффузионный) и количественный (метод серийных разведений) [1,5].



1. Диффузионный метод (Качественный анализ). Самый распространенный и визуально наглядный метод в рутинной лабораторной диагностике.

Технология постановки: На поверхность специального плотного агара (обычно используется стандартизированный агар Мюллера — Хинтон) наносят суспензию чистой культуры бактерий и равномерно распределяют её шпателем, создавая сплошной «газон» [1].

Апликация дисков: На засеянную поверхность на определенном расстоянии друг от друга раскладывают стандартные бумажные диски, пропитанные известной дозой различных антибиотиков. Чашки инкубируют в термостате при 37°C в течение 18–24 часов [4,5].

Интерпретация результатов: Если бактерия чувствительна к препарату, вокруг диска образуется прозрачная зона угнетения (задержки) роста микроорганизма [1,4]. Микробиолог измеряет диаметр этой зоны в миллиметрах (mm) с помощью линейки.

Заключение. Классический культуральный метод (посев на питательные среды) сохраняет свою фундаментальную роль, оставаясь единственным способом выделения живого возбудителя для последующего определения его фенотипической чувствительности к антибиотикам [2]. Будущее лабораторной микробиологии лежит в плоскости дальнейшего развития методов секвенирования нового поколения (NGS) и автоматизации скрининга, что позволит осуществлять полный генетический и фенотипический паспортный контроль бактериальных клеток непосредственно в первичных биологических пробах.

Список литературы.

1. Лабинская А. С., Волина Е. Г. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 1: Общая и санитарная микробиология. — М.: БИНОМ, 2008. — 1080 с. (Фундаментальное руководство по лабораторной технике).



2. Покровский В. И., Поздеев О. К. Медицинская микробиология: учебник для вузов. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — 864 с.
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учебник. — 6-е изд. — М.: Изд-во МГУ, 2004. — 528 с. (В контексте методов определения антибиотикорезистентности).
4. Воробьев А. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник. — М.: МИА, 2012. — 704 с.
5. Блинов Н. П. Основы микробиологии: учебное пособие. — СПб.: СпецЛит, 2011.
6. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., et al. Comparison of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of bacterial medical pathogens // BMC Microbiology. — 2010. — Vol. 10. — P. 378–385.