



Medii de cultură

Medii de cultură: complexe de substanțe care permit creșterea și multiplicarea bacteriilor (conțin substanțe nutritive, au pH corespunzător, umiditate corespunzătoare, sunt sterile, atmosferă corespunzătoare - aero/anaerobioza)

Clasificare

După consistență:

- lichide (repartizate în eprubete)
- solide (geloza dreaptă, înclinată, în placă)
- semisolide (în eprubete)

După conținutul de substanțe nutritive:

1. **Medii naturale**: conțin substanțe nutritive în forma lor naturală, fără a fi prelucrate în prealabil: mediul cu bilă, mediul cu lapte, mediul cu ouă, ser de bou coagulat
2. **Medii artificiale**:
 - A) *Medii de bază* – pentru germeni nepretențioși
 - 1) bulion simplu
 - 2) geloză simplă – bulion + agar-agar (un extract de alge care asigură consistența solidă, nu are proprietăți nutritive)
 - B) *Medii compuse*
 - 1) Medii complexe: mediu de bază + substanțe organice (sânge, ser, glucoză), sunt folosite pentru cultivarea germenilor pretențioși (geloza sânge)
 - 2) Medii de îmbogățire: conțin agenți selectivi, care inhibă dezvoltarea unor bacterii și permit creșterea altora
 - 3) Medii speciale
 - mediul Löwenstein-Jensen – pt. cultivarea micobacteriilor
 - mediul Sabouraud – pt. cultivarea levurilor (Candida)
 - mediul chocolată – neisserii, hemofili
 - 4) Medii diferențiale și selectiv-diferențiale: indicator de culoare, +/- substanțe selective (inhibă creșterea unor bacterii) + zaharuri/polialcoolii ; sunt folosite pentru izolare și identificare (geloza lactozată, TSI, SIM, Leifson, Chapman)



Caractere de cultură

- se studiază aspectul macroscopic al coloniilor bacteriene izolate
- 1. **Coloniile de tip S** (smooth)
 - colonii rotunde
 - margini regulate, bombate
 - suprafața netedă, translucidă
 - ușor detașabile de pe mediu
 - suspensionate în sol. saline produc suspensii omogene (ser fiziol.)
 - reprezintă forma normală pentru majoritatea bacteriilor patogene, fiind dotată cu calități optime de structură antigenică și de patogenitate.
- 2. **Coloniile de tip R** (rough)
 - colonii neregulate
 - plate, uscate
 - suprafața zbârcită
 - aderente la mediu
 - în soluții saline produc suspensii neomogene (fenomenul de aglutinare spontană)
 - este caracteristică, în general, bacteriilor nepatogene, cu 3 excepții: *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*
- 3. **Forme intermediare: S-R , R-S**
- 4. **Coloniile de tip M**
 - aspect mucos
 - foarte mari
 - foarte bombate
 - foarte lucioase
 - cu tendință de curgere și de confluaire
 - caracteristice bacteriilor care posedă capsulă (de ex. *Klebsiella*)
- 5. **Coloniile pufoase**
 - mucegaiuri
- 6. **Fenomen de cățărare**
 - *Proteus*: pe medii simple crește sub forma unui vâl care acoperă toată suprafața mediului (nu apar colonii)



Caracterele biochimice și de metabolism ale germenilor

- studiază metabolismul bacterian și prezența diferitelor enzime specifice
- studierea acestor caractere permit încadrarea bacteriilor în specie

1. Metabolismul glucidic

- se studiază pe medii de cultură diferențiale sau selectiv-diferențiale
- urmărește descompunerea diferitelor zaharuri de către bacterii (glucoză, lactoză, zaharoză, manitol)
- prin descompunerea zaharului de către bacterii mediul se acidifică, iar indicatorul de culoare schimbă culoarea mediului de cultură

2. Metabolismul proteic

- se studiază pe medii de cultură diferențiale
- prin descompunerea proteinelor de către bacterii se eliberează metaboliți precum indol, H₂S sau amoniac
- indolul și H₂S se evidențiază cu ajutorul unor hârtii de filtru îmbibate în reactiv specific (reactiv Kovacs pentru indol și săruri de Pb pentru H₂S)
- prezența amoniacului se evidențiază cu ajutorul unui indicator de culoare

3. Enzimele bacteriene

- **hemolizinele**
 - enzime care lizează hematiile (alterează hemoglobina)
 - prezența acestei enzime se evidențiază pe mediu geloză-sânge
 - principalele tipuri de hemoliză:
 - alfa (α) - apare ca o zonă verzuie în jurul coloniei
 - beta (β) - sângele este descompus total, în jurul coloniei este o zonă clară, transparentă
- **catalaza**
 - descompune apa oxigenată în apă și oxigen
 - oxigenul eliberat se evidențiază prin formarea bulelor de gaz
- **coagulaza**
 - determină coagularea plasmei recoltate pe anticoagulant
- **oxidaza**
 - enzime oxidative
 - acționează asupra unor substanțe producând compuși colorați



4. Alte teste

- Mobilitatea
 - bacteriile flagelate sunt mobile și migrează într-un mediu de cultură semisolid, deviază de la locul de inoculare (traiectul de înțepătură)
- Mirosul
 - la multe specii, coloniile au miros caracteristic
- Producerea de pigment
 - Pigmenți nedifuzibili – nu difuzează în mediu, vor colora doar colonia (ex. *Staphylococcus aureus* – pigment auriu)
 - Pigmenți difuzibili – difuzează în mediu, colorează și mediul (ex. *Pseudomonas* – pigment verde).

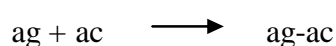


Identificarea microorganismelor pe baza structurii antigenice

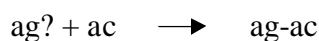
Identificarea antigenică se bazează pe specificitatea reacției antigen-anticorp.

Antigen se consideră orice substanță care, pătrunsă în organism, provoacă răspuns imun din partea acestuia, ceea ce rezultă în producerea de **anticorpi**.

Reacția antigen – anticorp este specifică, antigenul poate fi legat numai de anticorpul ce s-a produs ca răspuns la stimulul antigenic respectiv.



Aceste reacții pot fi folosite pentru detectarea unui antigen necunoscut cu ajutorul unui anticorp cunoscut (metode de diagnostic directe):



Elementele reacției sunt antigenul necunoscut și anticorpul cunoscut reprezentat de seruri imune de referință.

În cazul în care antigenul corespunde anticorpului, se formează complexul imun antigen-anticorp. În funcție de cum se vizualizează/detectează formarea complexului imun există mai multe metode bazate pe reacții antigen-anticorp:

- reacții de precipitare: complexe imune formează precipitat,
- reacții de aglutinare: complexe imune formează aglutinat,
- RFC – se detectează consumarea complementului (acesta se leagă de complexe imune distrugând antigenul),
- reacții în care elementul cunoscut este marcat – se detectează elementul marcat din complexul imun format.



Reacția de aglutinare

Antigenele: corpusculare, aglutinogene

Anticorpții: aglutinine

Complexul imun: aglutinat

Are loc între antigenele de pe suprafața celulei microorganismelor și anticorpții corespunzători.

Frecvent se realizează pe lamă de microscop.

Pe o lamă de microscop curată și degresată se depune la un capăt 1 picătură de ser aglutinant polivalent iar în celălalt capăt 1 picătură de soluție salină izotonă (martor).

În fiecare picătură se suspensionează cu ansa un fragment din colonie.

Dacă microorganismul are antigene specifice serului aglutinant, în 1-2 minute apare aglutinarea (grunji vizibili cu ochiul liber sau cu lupa).

În picătura martor și în cazul reacției negative, amestecul rămâne opalescent, uniform.

Reacția de precipitare

Antigenele: de natură coloidală (solubile), precipitinogene

Anticorpții: precipitine

Complexul imun: precipitat.

Pot avea loc în medii lichide (metode folosite în bacteriologie) sau în medii solide.

Reacții de precipitare în mediu solid

Precipitinele, precipitogenele au capacitatea de a difuza în gel de agaroză. Unde se întâlnesc în cantități echivalente se formează precipitat vizibil cu ochiul liber.

Metoda Mancini – imunodifuzia simplă (radială).

- Elementul cunoscut (ag) se înglobează în gel de agaroză.
- Gelul topit se toarnă în plăci, după solidificare se decupează godeuri.
- În godeuri se introduce elementul necunoscut al reacției (serul de cercetat: ac?).
- Se incubează în cameră umedă peste noapte la temperatura camerei. Anticorpții din serul cercetat difuzează în gel, dacă corespund antigenului înglobat, are loc reacția antigen-anticorp.
- În zona echivalenței se formează precipitat circular.
- Se măsoară diametrul precipitatului, se raportează la curbe etalon, astfel precizându-se cantitatea de anticorpi din ser (metodă cantitativă).



Metode moderne – metode care folosesc un reactant imunologic marcat

Reacția de imunofluorescență (RIF)

Principiu:

- identificarea antigenelor necunoscute montate pe lamă cu ajutorul anticorpilor cunoscuți marcați fluorocrom
- fluorocromii:
 - emit fluorescență dacă se expun la raze UV,
 - izotiocianatul de fluoresceină (galben-verzui), rodamina (portocalie)
 - preparatul se examinează la microscopul cu fluorescență
 - puncte fluorescente pe fond întunecat: în preparatul examinat au fost prezente antigenele căutate (rezultat pozitiv)
 - absența punctelor fluorescente: în preparat nu au fost prezente antigenele căutate (rezultat negativ).
- dezavantaje:
 - preparatele sunt instabile
 - nu pot fi păstrate în timp
 - este necesar microscop special.

Metoda imunoperoxidazică (IPO)

- marcarea enzimatică – peroxidază (descompune peroxidul); vizualizarea se realizează prin adăugarea substratului cromogen – rezultă un precipitat maroniu, insolubil, vizibil la microscopul optic,
- se realizează la fel ca și RIF,
- avantaje:
 - preparatele pot fi păstrate în timp
 - nu este necesar microscop special.



Metode imunoenzimatic (RIE, ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay)

Permit detectarea antigenelor libere și a anticorpilor. Este posibilă determinare cantitativă.

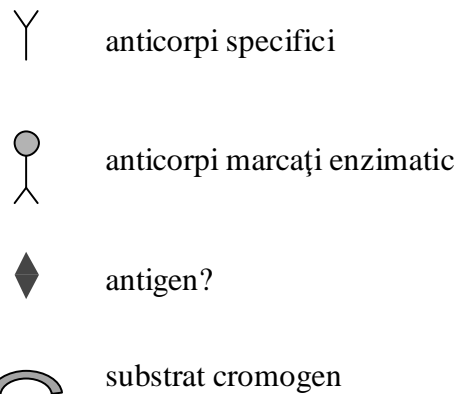
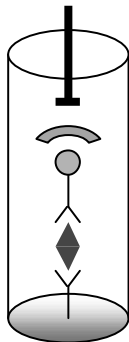
La reacții participă:

- un reactant imunologic cunoscut atașat de un suport solid (plăci cu godeuri, lame, baghete)
- un reactant imunologic marcat enzimatic – peroxidaza,
- substrat specific (cromogenic). Se produce o modificare de culoare detectabilă spectrofotometric (determinare cantitativă),
- substanțe pentru stoparea reacției (baze sau acizi puternici).

Reacțiile au loc în aparate automate, semiautomate.

Între reacții – spălare cu soluții tampon.

Detectarea antigenelor





Identificarea microorganismelor prin detectarea acizilor nucleici

Genomul microorganismului conține secvențe specifice, detectarea prezenței acestora într-un produs patologic sau în culturi celulare are valoare diagnostică.

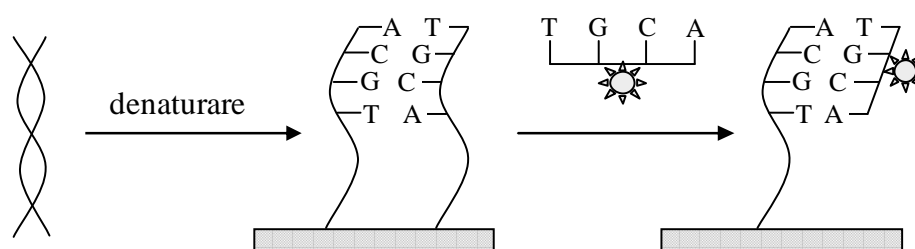
Metode de hibridizare

Principiu: fragmente monocatenare de oligonucleotide marcate (sonde), având secvență cunoscută (caracteristică unui microorganism) se vor atașa pe baza complementarității de secvențe complementare situate pe acizii nucleici ale virusului de identificat.

Etape de lucru:

- extragerea acizilor nucleici,
- denaturarea acizilor nucleici și fixarea acestora pe un suport,
- hibridizare: adăugarea sondelor (marcate enzimatic, cu fluorocrom sau cu substanțe radioactive) și atașarea acestora de secvențele omoloage,
- eliminarea sondelor nefixate,
- vizualizarea hibridizării.

Vizualizarea se face în funcție de tipul marcajului folosit.



Reacția în lanț a polimerazei (PCR – polimerase chain reaction)

Se detectează secvențe specifice de acid nucleic după o prealabilă amplificare.

Etapele de lucru

- detectarea ADN-ului,
- extragerea ADN-ului,
- amplificarea:
 - se realizează în aparatul PCR și constă din mai multe cicluri identice:
 - denaturare (90°C),



- alinierea primerilor (50°C) – 2 secvențe de oligonucleotide care se leagă prin complementaritate pe cele două catene la o anumită distanță între ele.
- sinteza lanțurilor complementare (70°C) – elongație; este necesară prezența enzimei polimerază (Taq) și a nucleotidelor – se formează lanțurile complementare astfel se dublează cantitatea de ADN,
- reluarea ciclului de n ori – se obțin 2ⁿ copii ale secvenței de identificat,
- vizualizarea produșilor de amplificare:
 - produșii de amplificare obținuți se separă electroforetic,
 - colorare cu bromură de etidiu
 - vizualizare cu raze UV – prelucrare computerizată.

Multiplex PCR – se amplifică mai multe gene odată.

Real time PCR.

RT-PCR - este necesară revers-transcriptaza.

Boala experimentală

Studiul pe animale se face doar în cazurile în care celelalte metode de identificare sunt nestisfăcătoare.

Este necesară cunoașterea metodelor de contenție a animalelor.

Înainte de inoculare animalele sunt marcate, dacă este necesar sunt anesteziate (intervenții dureroase), iar locul inoculării se epilează și se antiseptizează.

Inocularea se face prin diferite căi:

- intradermic,
- subcutanat,
- intramuscular,
- intravenos,
- intraperitoneal,
- intranasal,
- intracerebral.

Suspensiile microorganismelor sunt inoculate prin injecție, inhalare, ingestie, badijonare, etc...

Se urmărește patogenitatea bacteriilor, virusurilor, paraziților, prin studiul modificărilor care apar la animalul inoculat.