

5

METODA BACTERIOLOGICĂ DE DIAGNOSTIC

Izolarea bacteriilor în cultură pură necesită:

- un mediu de cultură repartizat în recipiente adecvate cultivării;
- instrumentar pentru însămânțarea bacteriilor și manipularea culturii;
- incubatoare care asigură temperaturile și atmosfera optime cultivării.

5.1. MEDIILE DE CULTURĂ ȘI CLASIFICAREA LOR

Mediile de cultură sunt soluții care asigură nutrienții și condiții fizico-chimice necesare creșterii și multiplicării bacteriilor. Totalitatea bacteriilor acumulate prin multiplicare într-un asemenea mediu e numită *cultură bacteriană*.

Mediului de cultură ideal i se cer următoarele calități:

- să asigure bacteriilor condiții de dezvoltare cât mai apropiate celor din mediul lor natural (organismul uman, animal, sol etc.);
- să nu conțină substanțe inhibitoare pentru bacteriile urmărite;
- să faciliteze observarea apariției și dezvoltării culturii (omogenitate, transparență, luciu al suprafeței etc.);
- să faciliteze izolarea bacteriilor în culturi pure (pH, osmolaritate etc.);
- să fie sterile.

5.1.1. Clasificarea după proveniența nutrienților

Se disting: medii empirice și medii sintetice.

Mediile empirice au la bază *extracte apoase* obținute fie la cald, fie prin infuzare, fie prin digestia cărnii, cordului, creierului sau ficatului de vită ai căror nutrienți (hidrocarbonate, baze azotate, săruri minerale, factori de creștere etc.) sunt completați cu aminoacizi și peptide de diferite sorturi de *peptonă* (produși de hidroliză enzimatică ai proteinelor animale sau vegetale). Dacă osmolaritatea și pH-ul lor pot fi riguros controlate, calitățile nutritive pot varia de la un lot la altul de mediu. Mediile empirice sunt cel mai larg folosite pentru izolarea și studiul bacteriilor.

Mediile sintetice includ ingrediente chimic pure. Au compoziție minimă, riguros controlată și se folosesc pentru studiul necesităților nutritive și al metabolismului bacterian.

5.1.2. Clasificarea după consistență

Distingem: medii lichide, solide și semisolide.

În *mediile lichide* descendenții bacteriilor se amestecă unii cu alții, ceea ce nu permite obținerea de culturi pure decât din produse monobacteriene. Prin gelificarea mediilor lichide cu 2% agar-agar¹ se obțin *medii solide*, care, grație vâscozității lor, fixează bacteriile în punctul de însămânțare. De aceea pe medii solide bacteriile formează colonii. O *colonie* este o aglomerare de bacterii care se dezvoltă dintr-o singură celulă sau grup de celule de același fel (unitate formatoare de colonie, abreviat U.F.C.) și este vizibilă cu ochiul liber pe suprafața mediului solid. O colonie este o clonă bacteriană, deci o cultură pură.

În vederea utilizării, mediile de cultură lichide sunt repartizate în eprubete sau în baloane, iar cele solide, în plăci Petri și în eprubete cu solidificare în pantă.

Mediile semisolide se obțin prin gelificare cu numai 0,4–1% agar. Repartizate în coloană se folosesc pentru depistarea mobilității bacteriilor și pentru conservarea unor tulpini bacteriene în laborator.

5.1.3. Clasificarea după compoziție

Se disting: medii simple și îmbogățite de uz general și medii speciale.

Mediile simple sau de bază sunt bulionul nutritiv, apa peptonată și agarul nutritiv. Conțin numai ingredientele de bază: extract de carne sau numai peptonă, clorură de sodiu, și permit creșterea numai a bacteriilor nepretențioase nutritiv, în majoritate saprofite ale mediului extern sau ale florei microbiene normale a corpului uman.

Mediile îmbogățite permit cultivarea celor mai multe bacterii patogene pretențioase nutritiv. Se obțin prin adăugarea de sânge, ser sangvin, glucoză, extract de levură etc. la mediile de bază. Geloza-sânge este mediul uzual de izolare a bacteriilor patogene.

Mediile speciale.

■ *Mediile speciale de izolare* permit izolarea anumitor microbi patogeni din prelevate hipercontaminate (materii fecale, exsudat faringian etc.); se utilizează medii de diferențiere și medii selective. *Medii de diferențiere* conțin substratul pentru o enzimă bacteriană caracteristică și un indicator, care evidențiază atacarea acestui substrat, deci un caracter metabolic diferențiază între ele bacteriile cu aspect al culturii identic pe mediile simple. De pildă geloza nutritivă cu albastru de bromtimol lactozat diferențiază enterobacteriaceele lactozopozitive de cele lactozonegative. *Mediile selective* conțin substanțe inhibitorii asupra altor bacterii decât acelea a căror izolare se urmărește. Pentru a facilita reperarea coloniilor unei anumite bacterii, mediile selective au și caracter diferențial. Exemple de medii selective: medii cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric din exsudatul faringian; mediul SS (geloză nutritivă cu săruri biliare, verde brillant, citrat de fier și hiposulfid de sodiu, adăugată cu lactoză și roșu neutru ca indicator de pH) pentru izolarea shigelelor și salmonelilor din materii fecale.

■ *Mediile de îmbogățire* sunt medii lichide care favorizează înmulțirea anumitor bacterii patogene și inhibă dezvoltarea florei de asociație dintr-un produs patologic. Însămânțarea și incubarea în aceste medii este utilă ca etapă premergătoare epuizării pe medii

1

Coloid extras dintr-o algă marină, care se lichiefiază la 80° și se gelifică la cca 40–45°C.

selective pentru izolarea unei bacterii patogene care se află în număr redus în produse cu floră de asociație abundentă.

■ Mediile de identificare conțin substratul activității unei enzime bacteriene și un indicator adecvat, care evidențiază modificarea substratului în cursul cultivării bacteriei cercetate. Bacteriile cu asemenea medii sunt folosite pentru identificarea bacteriilor. *Mediile multitest* permit investigarea mai multor caractere biochimice printr-o însămânțare unică.

5.2. TEHNICA ÎNSĂMÂNȚĂRILOR

Însămânțarea este depunerea în sau pe suprafața mediului de cultură a materialului bacterian, inoculum, în vederea cultivării bacteriilor.

Repicarea este însămânțarea într-un mediu de cultură proaspăt a unei bacterii dintr-o altă cultură fie în scopul purificării ei, fie pentru studiul activității biochimice.

Izolarea este operația prin care o bacterie este obținută în cultură pură.

Aceste operații se fac uzual cu ajutorul acului de însămânțare, mai rar, numai în cazurile speciale precizate mai jos, cu ajutorul unui etalor sau al pipetei.

5.2.1. Epuizarea semicantitativă a inoculului pe suprafața plăcilor Petri

Se utilizează ca metodă de selecție pentru izolarea în culturi pure a bacteriilor din produse plurimicrobiene.

Placa — «uscată» prin menținere cca 30 minute la 37°C cu capacul întredeschis pentru evaporarea condensului — se ține pe masa de lucru. Cu mâna stângă se întredeschide capacul. Ansa se ține în mâna dreaptă, ca un creion, oblic față de suprafața mediului și se plimbă ușor, pentru a evita zgărirea acestuia.

Inoculumul este dispersat pe un sector limitat al plăcii cu ansa sterilă sau tamponul cu care a fost prelevat produsul microbial. Se reesterilizează ansa; se verifică temperatura prin atingerea mediului în zonă neînsămânțată și se epuizează inoculumul în patru cadrane, descriind cu ansa striuri conform schemei din figura 5.1. Astfel în ultimele cadrane de epuizare se obțin colonii izolate, bine individualizate, la distanță de cca 1 cm unele de altele, iar creșterea poate fi apreciată semicantitativ (tabelul 5.1). Fiecare colonie bine individualizată pe un mediu neselectiv reprezintă practic o clonă. De aceea izolarea prin epuizarea inoculumului bacterian pe un mediu neselectiv mai poate fi numită și clonare.

Tabelul 5.1. Aprecierea semicantitativă a creșterii bacteriene după epuizarea inoculumului în patru cadrane pe suprafața mediului repartizat în placă Petri

Scorul de creștere	Colonii în arla de epuizare		
	I	II	III
+1	<10	—	—
+2	>10	<5	—
+3	>10	>5	<5
+4	>10	>5	>5

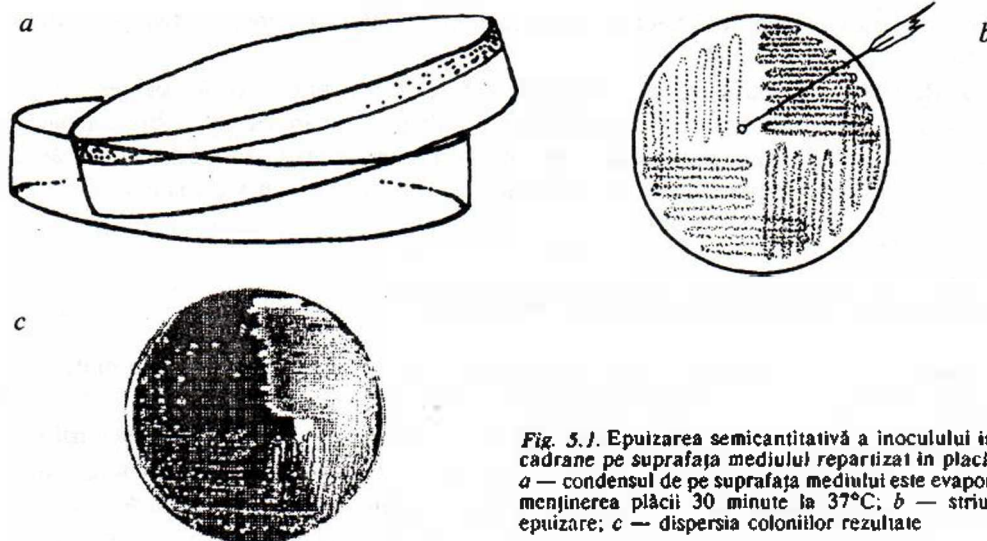


Fig. 5.1. Epuizarea semicantitativă a inoculului în patru cadrane pe suprafața mediului repartizat în placă Petri: a — condensul de pe suprafața mediului este evaporat prin menținerea plăcii 30 minute la 37°C; b — striurile de epuizare; c — dispersia coloniilor rezultate

La izolarea pe medii selective, inoculul trebuie să fie mai bogat decât pe mediile neselective (ansă cu buclă mai mare fără sterilizare după descărcarea pe primul cadran), iar primocultura de cele mai multe ori nu este pură: coloniile patogenului izolat conțin bacterii de contaminare a căror creștere a fost inhibată. De aceea purificarea culturii necesită cel puțin 1—2 repicări pe un mediu diferențial adecvat cu inoculul prelevat numai prin atingerea superficială cu ansa a coloniilor sugestive din primocultură.

5.2.2. Etalarea uniformă a inoculului pe plăci Petri

Este indicată fie pentru cantificarea aproximativă a bacteriilor dintr-o suspensie, fie pentru antibiograma difuzimetrică (vezi 7.4). Se face cu ajutorul etalorului din sticlă sterilizat prin aer cald.

Un mic volum determinat din diluțiile decimale ale suspensiei bacteriene este depus cu pipeta pe placa cu suprafața mediului bine «uscată» și este etalat uniform în direcții succesive până la absorbția completă a inoculului în mediu. După incubarea corespunzătoare (vezi mai jos), se aleg plăcile cu creștere între 30 și 300 colonii (minimizează eroarea) și se calculează numărul unităților formatoare de colonii după formula:

$$X = N \cdot D \cdot \frac{1}{\text{volumul însămânțat}}$$

unde:

X = concentrația U.F.C. din suspensie;

N = numărul coloniilor pe placă;

D = inversul diluției.

Etalarea pe placă, uzual cu tamponul, a unei suspensii bacteriene mai concentrate dă creșterea «în pânză» sau semiconfluentă necesară antibiogramei (vezi 7.4).

5.2.3. Însămânțarea pantei de agar nutritiv

Este indicată pentru păstrarea culturilor pure pe durate limitate, e.g. până la identificarea finală a tulpinilor martor pentru antibiografe sau pentru testele biochimice. Manipulând aseptice, se încarcă o ansă cu inoculum din cultura purificată, se introduce ansa până deasupra apei de condens a tubului și se retrage descriind pe suprafața pantei striuri strânse în zig-zag, fără a zgâria mediul.

5.2.4. Însămânțarea coloanei de agar nutritiv moale

Uzual se face pentru diferențierea bacteriilor mobile de cele imobile și pentru testarea unor activități biochimice. Manipulând aseptice se încarcă acul de inoculare cu inocul din cultura pură și se face o înțepătură unică de la suprafață până în profunzimea coloanei de agar. După incubarea corespunzătoare se apreciază creșterea și se interpretează mobilitatea (figura 5.2).

5.2.5. Însămânțarea recipientelor cu mediu de cultură lichid

Aceste însămânțări se fac exclusiv din prelevate patologice monobacteriene (e. g. lichid cefalorahidian, exsudate din cavitățile seroase, sânge) și sunt indicate când bacteriile se află în număr prea mic pentru a fi depistate microscopic sau izolate pe medii solide. Se însămânțează, cu pipeta Pasteur sau cu seringă de recoltare, câteva picături până la câțiva ml de produs.

Tuburile cu medii lichide de identificare sunt însămânțate cu ansa.

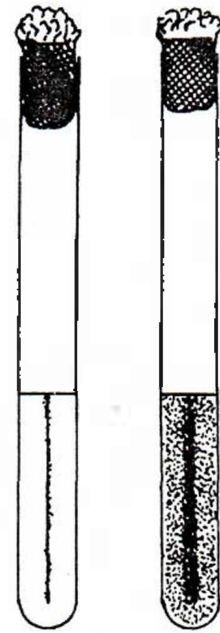
5.2.6. Izolarea bacteriilor sporulate de cele nesporulate

Se bazează pe termorezistența sporilor. Produsul microbial suspensionat în soluție salină izotonă este încălzit 10 minute în baia de apă la 80°C, după care este epuizat pe suprafața mediului solid.

5.3. INCUBAREA CULTURILOR

Incubarea constă în menținerea mediilor însămânțate în condițiile necesare dezvoltării culturilor. Majoritatea bacteriilor patogene sunt mezofile, cultivă optim la 37°C și au *creștere rapidă*: cultura apare peste noapte. La bacteriile cu *creștere lentă* cultura poate fi observată abia după câteva zile sau săptămâni de incubare. Temperatura constantă de incubare este asigurată de termostate, incinte termoizolate prevăzute cu sursă de încălzire (electrică) și sistem termoreglator.

Potențialul de oxidoreducere (rH) al mediului de cultură este esențial pentru unele bacterii. Această influență poate fi intuită dacă însămânțăm bacteriile prin omogenizare



Bacterie imobilă

Bacterie mobilă

Fig. 5.2. Aprecierea mobilității unei bacterii prin înțeparea coloanei de geloză moale

intr-o coloană înaltă de agar nutritiv în care rH-ul scade semnificativ de la suprafață spre profunzime.

Bacteriile strict aerobe se dezvoltă numai pe suprafața mediului unde au asigurat contactul cu oxigenul.

Bacteriile facultative sunt indiferente la rH, ele se dezvoltă de la suprafață până la fundul coloanei de mediu.

Bacteriile strict anaerobe se dezvoltă numai în profunzimea coloanei de mediu.

Bacteriile microaerofile se dezvoltă numai într-o bandă relativ îngustă sub suprafața mediului.

Cultivarea bacteriilor aerobe și facultative se face în atmosferă normală.

Cultivarea bacteriilor strict anaerobe impune o reducere corespunzătoare a potențialului de oxidoreducere al mediilor și prezervarea culturii de contactul cu oxigenul. Acestea se obțin prin mai multe metode accesibile, în funcție de dotarea laboratorului. Unele permit cultivarea anaerobilor pe plăci cu mediu agarizat, altele numai în tuburi cu bulion sau agar moale.

1. *Procedeele fizice:*

■ *Camera anaerobă (glove box)* în care operațiunile de la însămânțare la observarea culturilor și repicări se fac în absența oxigenului. O descriere cu amănunte a acestei dotări rezervată laboratoarelor specializate depășește obiectivele manualului.

■ *Sistemul Mac Intosh și Fildes* folosește un borcan etanș din care aerul, îndepărtat cu o pompă de vid, este înlocuit cu hidrogen sau cu un amestec gazos (azot 85%, CO₂ 5%, hidrogen 10%), iar clorura de paladiu inclusă în azbest catalizează la cald (rezistență electrică) fixarea hidrogenului pe urmele de oxigen.

■ *Sistemul Gaspak* folosește un borcan transparent și etanș, în care apa adăugată într-un pachet din foiță de aluminiu, care conține tablete de borohidrat de sodiu, clorură de cobalt, acid citric și bicarbonat de sodiu, degajă H₂, CO₂ și H₂O. Granulele din aluminat de paladiu, fixate la capac, catalizează la rece fixarea completă a O₂ pe H₂ cu formare de H₂O.

2. *Procedee chimice:*

■ *Medii de cultură cu ingrediente reducătoare* (acid tioglicolic sau tioglicolat de sodiu), ușor agarizate, pentru creșterea vâscozității, și cu un indicator de rH (vezi mai jos) sunt repartizate în tuburi în coloană înaltă (e. g. mediul VF). Când indicatorul de rH apare oxidat pe o înălțime mai mare de 1/4 de la suprafață, mediul trebuie «regenerat» prin fierbere în baie de apă timp de 15 minute, pentru îndepărtarea aerului solvit. După regenerare tuburile sunt răcite brusc în apă, apoi însămânțate.

■ Într-o cutie Petri poate fi creată o incintă etanșă din care oxigenul este îndepărtat prin reacția cu pirogalolul în mediu alcalin (figura 6.3). Un pachetel cu:

Pirogalol	0,4 g
Carbonat de potasiu	0,4 g
Talc	4,0 g

este suficient pentru a crea anaerobioză într-o cutie Petri cu diametrul de 11 cm.

3. *Procedee biologice:*

■ *Procedeele Tarozzi* utilizează tuburi cu un bulion nutritiv în care rol de agent reducător îl au fragmente din organele proaspete de animal prelevate aseptice (ficat, rinichi). Tuburile sunt însămânțate după verificarea sterilității timp de 24—48 ore la 37°C.

■ Pe o jumătate a unei plăci Petri cu un mediu adecvat se însămânțază dens o bacterie aerobă foarte avidă pentru oxigen, iar pe cealaltă jumătate se epuizează bacteria

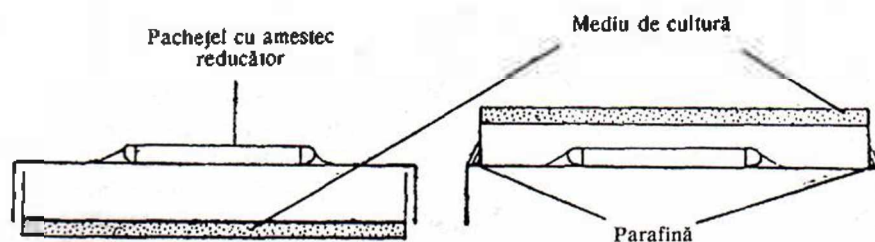


Fig. 5.3. Incinta anaerobă creată cu ajutorul pirogalolului alcalin

anaerobă. Imediat cutia se etanșează prin parafinare. Bacteria aerobă consumă oxigenul și creează condiții pentru creșterea bacteriei anaerobe.

Prezervarea de contactul cu aerul a culturilor în tuburi este realizată prin acoperirea mediului cu un strat de ulei de parafină steril sau prin cultivare în tuburi Weinberg (tuburi de 240/10 mm) cu coloană înaltă de mediu regenerat.

Indicatori pentru anaerobioză. Mai utilizat este indicatorul lui Fildes și Mac Intosh cu albastru de metilen:

- a) soluție apoasă de glucoză 6% (prezervată cu un mic cristal de timol);
- b) soluție NaOH 1/10 N; 6 ml în 94 ml apă distilată;
- c) soluție apoasă de albastru de metilen 0,5% 3 ml în 100 ml apă distilată.

Câte 1 ml din fiecare soluție se amestecă într-o eprubetă și se fierbe până la decolorare, după care se plasează în incinta anaerobă înainte de a o închide etanș. La sfârșitul incubării:

- culoarea albastră indică un rH nesatisfăcător,
- culoarea albă denotă un rH satisfăcător pentru cultivarea anaerobilor.

Cultivarea bacteriilor microaerofile (e. g. specii de *Campylobacter*) se face în termostate speciale sau în pungi etanșe din masă plastică într-un amestec gazos cu O₂ de 5—7%, CO₂ de 8—10% și N₂ de 85%.

Bacteriile carboxifile se cultivă uzual într-un borcan închis ermetic în care este lăsată să ardă o lumânare; când concentrația lui CO₂ atinge 5—10%, lumânarea se stinge.

O concentrație de cca 5% CO₂ poate furniza reacția dintre carbonatul de calciu (bucățele de marmură) și acidul clorhidric, în cantități în funcție de volumul V în litri al excicatorului. Astfel într-un mic vas introdus în excicator se adaugă:

- Bucățele de marmură 0,25×V, g
- Acid clorhidric 25% 2,50×V, ml.

Pentru concentrații mai mari de CO₂ se mărește corespunzător cantitatea reactivilor.

5.4. STUDIUL CARACTERELOR DE CULTURĂ

Exigențele nutritive, condițiile și intervalul de incubație, ca și aspectul culturilor, orientează identificarea bacteriilor.

Bacteriile cu încărcătură electronegativă puternică și suprafața hidrofilă, proprietăți asigurate de structuri de inveliș, tulbură omogen mediile de cultură lichide, formează suspensii stabile și colonii rotunde, netede, umede, lucioase. Este forma de cultură S (de la engl. *smooth* = neted). Dimpotrivă, cele cu încărcătură electronegativă și hidrofilic mai reduse autoaglutinează, cultivă sub formă de bulgări, lăsând mediul supernatant clar și

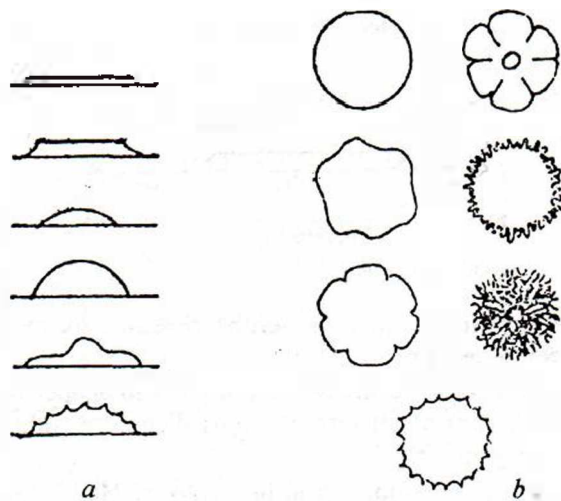


Fig.5.4. Aspectul coloniilor bacteriene: a — relieful; b — conturul

formează colonii cu margini neregulate, cu suprafața uscată, rugoasă. Este *forma de cultură R* (de la engl. *rough* = rugos).

Condițiile de cultivare și aspectul culturii sunt caractere cheie folosite pentru identificarea bacteriilor. Aspectul coloniilor variază între bacterii fără a permite însă diferențieri de specie categorice. Se urmăresc (figura 5.4):

- *dimensiunea*: colonii mari (2—3 mm diametru), mici (0,1—1 mm diametru) sau mijlocii (1—2 mm diametru);

- *conturul*: circular cu margini întregi, lobat, zimțat, dendritic, în «hartă geografică»;

- *relieful*: plat, bombat, acuminat, papilat;

- *suprafața*: lucioasă sau granulară, umedă sau uscată, rugoasă;

- *culoarea*: nepigmentate sau pigmentate cu sau fără irizații;

- *opacitatea*: opace sau transparente;

- *consistența*: untoasă, mucoasă, friabilă, pielosă;

- *aderența la mediu*: neaderente sau puternic aderente de suprafața mediului, încastate;

- *hemoliza*: prezența și tipul (pe medii cu sânge).