



AZƏRBAYCAN TİBB UNIVERSİTETİ
TİBBİ MİKROBİOLOGİYA və İMMUNOLOGİYA KAFEDRASI

Məşğələ 11.

Bakterioloji üsul. Aerob və anaerob bakteriyaların təmiz kulturasının alınması (II gün və III gün). Bakteriyaların kultural xassələri. Bakteriyaların fermentativ aktivliyə görə identifikasiyası. Müasir identifikasiya üsulları

FAKÜLTƏ: *Müalicə-profilaktika*
FƏNN: *Tibbi-mikrobiologiya - 1*

Müzakirə olunan suallar

- “Mikroorqanizmlərin kultivasiyası”, “kultura”, “klon”, “koloniya” və “ştam” anlayışları.
- Mikroorqanizmlərin həyat fəaliyyəti məhsulları: fermentlər və pıqmentlər, aromatik maddələr və onların əhəmiyyəti.
- Bakteriyaların kultural xassələri - koloniyaların makroskopik və mikroskopik müayinəsi (ölçüsü, forması, rəngi, şəffaflığı, konsistensiyası, yerləşməsi, səthi, kənarları və strukturu).
- Koloniyaların sayılması, KƏV-in müxtəlif patoloji materiallarda mahiyyəti.
- Bakterial fermentlərin təsnifatı.
- Bakteriyaların biokimyəvi xüsusiyyətləri və identifikasiyasında fermentlərin rolu.
- Karbohidratları parçalayan fermentlər və onların təyini (Hiss və Kliqlər mühitləri).
- Proteolitik fermentlər və onların təyini (jelatin, zərdab və süddə inkişaf, indol, ammoniak və hidrogen-sulfidin təyini) və oksidləşmə-reduksiya fermentləri (oksidaza, katalaza, dekarboksilaza).
- Aqressiya fermentləri və onların təyini (hialuronidaza, lesitinaza, fibrinolizin, plazmakoaqulaza).
- Müasir identifikasiya üsulları (mikrotest sistemlər, Vitek analizatoru və s.).

Məşğələnin məqsədi:

- Tələbələrə bakteriyaların təmiz kulturalarının alınmasının məqsədi, mərhələləri və kultural xüsusiyyətləri ilə tanış etmək. Onlara bakteriyaların həyat fəaliyyəti məhsulları - fermentlər və pigmentlər, onların bakteriyaların differensiasiyasında rolu haqqında məlumat vermək. Tələbələrə bakteriyaların müasir identifikasiya üsulları ilə tanış etmək.

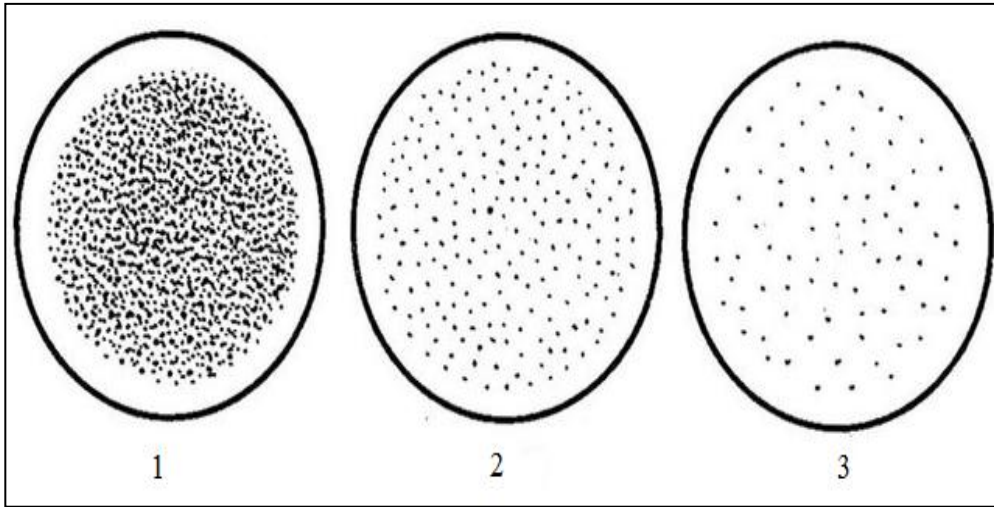
Təmiz kulturanın alınmasının II mərhələsi

- II gün inokulyasiya edilmiş Petri kasaları termostatdan çıxarılır. Bakteriyaların **kultural xüsusiyyətləri öyrənilir**.
- Driqalski üsulu ilə inokulyasiya edilmiş kasalardakı qidalı mühitin səthində mikroorqanizmlərin ardıcıl seyrəlməsi müşahidə edilir. Adətən ikinci, yaxud daha çox hallarda üçüncü kasadakı qidalı mühitin səthində mikroorqanizmlər **təcrid olunmuş koloniyalar** halında inkişaf edir.
- 4 sektorlu inokulyasiya edilmiş kasalarda inkubasiyadan sonra ilkin materialdakı mikroorqanizmlərin sayından asılı olaraq qidalı mühitin səthində mikroorqanizmlərin ardıcıl seyrəlməsi müşahidə edilir və adətən sonuncu sektorlarda mikroorqanizmlər təcrid olunmuş koloniyalar halında inkişaf edir.

Təmiz kulturanın alınmasının II mərhələsi

- Hesab edilir ki, bir koloniya bir bakteriya hüceyrəsindən əmələ gəlir.
- Ona görə də praktikada təmiz mikrob kulturası almaq üçün bərk qidalı mühitlərin səthində və ya dərinliyində onların təcrid olunmuş koloniyalar halında inkişafı təmin edilir.
- Təmiz kulturanın alınmasının II mərhələsində təcrid olunmuş koloniyalardan digər qidalı mühitlərə köçürülür və daha 1-2 gün inkubasiya edilir.

B rk qidalı m hithl rin s thind  t cr d olunmu  koloniyaların alınması



Mikroorqanizmlərin kultural xassələri

➤ **Kultura** - optimal şəraitdə bakteriyaların formalaşdırdığı özünəməxsus populyasiyaya deyilir

➤ **Koloniya** - bərk qidalı mühitlərdə bakteriyaların əmələ gətirdiyi yığıntıya (populyasiyaya) deyilir.

➤ **Təmiz mikrob kulturalı** dedikdə tək bir növə mənsub olan mikroorqanizmin bərk qidalı mühitdə əmələ gətirdiyi populyasiya nəzərdə tutulur.

➤ **Ştamm** - müxtəlif (yaxud eyni) mənbələrdən müəyyən vaxtlarda alınmış eyni növdən olan mikroorqanizmlərin təmiz kulturalıdır.



Mikroorqanizmlərin kultural xassələri

- Kultural xüsusiyyətlər hər bir mikroorqanizm cinsi, yaxud növü üçün xarakter əlamət olduğundan **mikroorqanizmlərin identifikasiyasında** istifadə edilir.
- Bunun üçün bakteriyaların bərk və maye qidalı mühitlərdə inkişaf xarakteri öyrənilir.

Bərk qidalı mühitlərdə bakteriyaların kultural əlamətləri

- Bərk qidalı mühitlərdə bakteriyalar ***koloniya*** əmələ gətirir.
- Bərk qidalı mühit səthində, yaxud dərinliyində bir bakteriya hüceyrəsinin əmələ gətirdiyi populyasiya *koloniya* adlanır.



Koloniyaların morfologiyası

- Koloniyanın morfologiyasını öyrənmək üçün aşağıdakı xüsusiyyətlər nəzərə alınır:
 - Ölçüsü
 - Forması
 - Rəngi
 - Strukturu
 - Hündürlüyü
 - Kənarları

Bərk qidalı mühitin səthində müxtəlif formalı koloniyalar

Koloniya formaları



dairəvi



irrequlyar

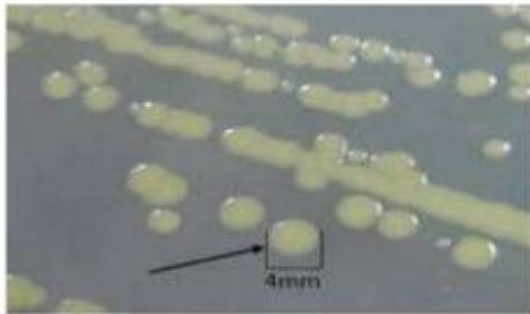


punktiform(nöqtəşəkilli)



rizoid (kökşəkilli)

Koloniyanın formaları:



dairəvi



nöqtəşəkilli



rizoid

Koloniyaların k n rl r :



hamar



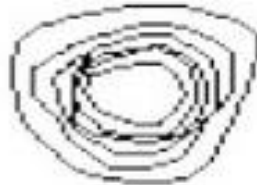
dalğavari



girintili- ıxıntılı



sap  killi

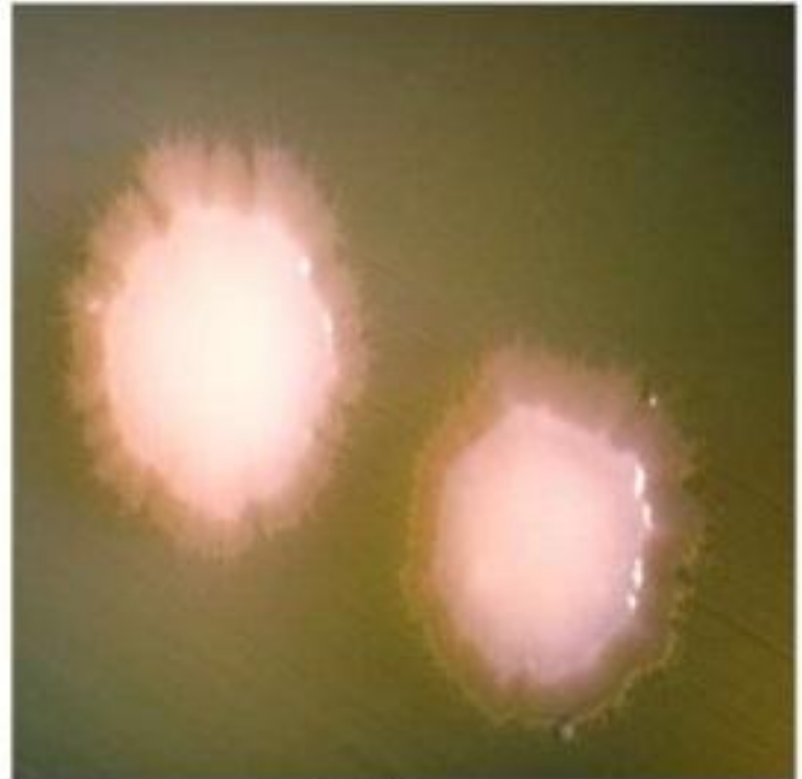


qıvrılmış(konsentrik)

Koloniyanın kənarları:



dalğavari



sapşəkilli

Koloniyların qidalı mühit səthindən qalxması:



yastı



qabarıq



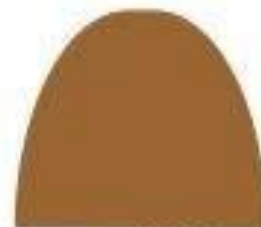
göbələk şəkilli



kraterəbənzər



konveks



yastıgəbənzər

Koloniyanın ölçüləri:

- Nöqtə şəkilli (1 mm-dən az)
- Kiçik (1-2 mm)
- Orta (2-4 mm)
- Böyük (4-5 mm-dən çox)



punctiform



small



medium



large

Koloniyların konsistensiyası

- Bərk
- Yumşaq
- Yapışqan
- Mukoid



bərk



yapışqan



mukoid

Koloniyların rəngi

- Bəzi bakteriyalar qidalı mühitdə inkişaf etdikdə pigment əmələ gətirir



Koloniyların şəffaflığı

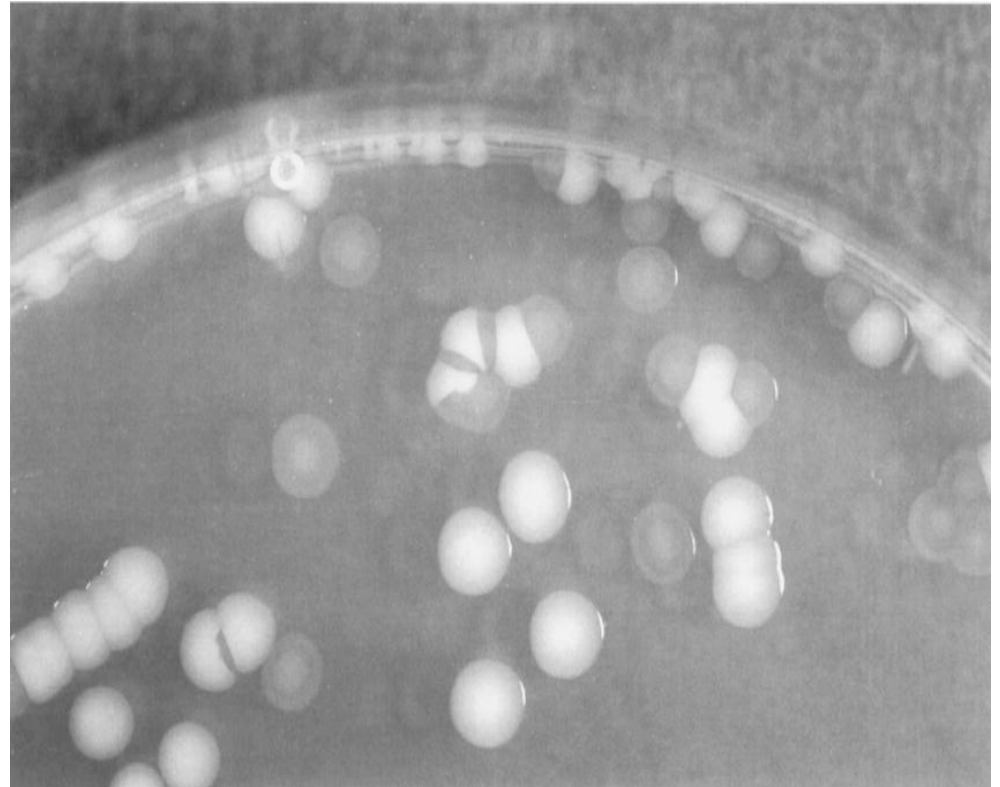
- Şəffaflıq dərəcəsinə görə:

- **şəffaf**

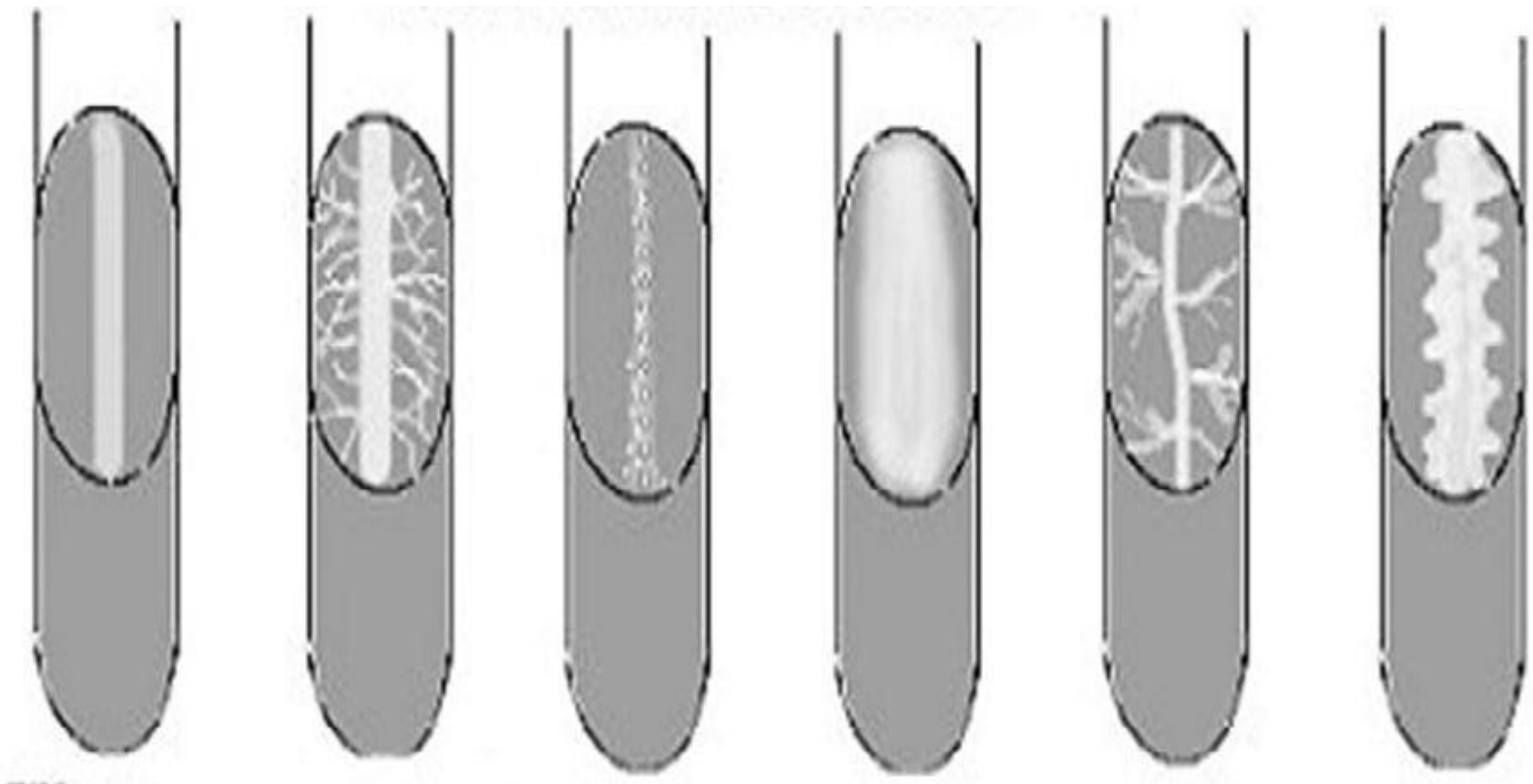
- **yarımşəffaf**

- **bulanıq**

koloniyalar
ayır-
dırılır.



Kulturanın çəp aqarda inkişafı



1. Sapşəkilli 2. Ağacşəkilli 3. Muncuq formalı 4. Yayılmış 5. Rizoid 6. Tikanlı

Maye qidalı mühitlərdə bakteriyaların kultural əlamətləri:



Koloniyların sayılması

Az olduqda gözlə, çox olduqda Volf-Hügel kamerası vasitəsilə sayılır. Bu kamera dayaq üzərində yerləşən, kvadratlara bölünmüş lövhədir. Petri kasası lövhənin altına(dayağın üstünə)qoyulur və sahəsi 1sm² olan 10 böyük kvadrata düşən koloniyalar sayılır. 1 kvadrata düşən koloniyaların ümumi miqdarı aşağıdakı düsturla hesablanır:

$$X=\pi r^2 \times 1\text{sm}^2 \quad \pi=3,14$$

(r-kasanın radiusu= 5sm)

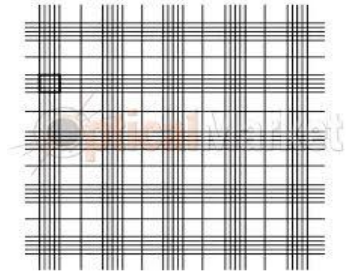
1 kvadratda olan koloniyalar 10 olarsa:

$$X=3,14 \times 5^2 \times 10 = 785$$

Hüceyrələrin ümumi sayının təyin edilməsi – maye materialın 1 ml-də sayı

1. “Say kamerası” - (Neybauer, Tom, Qoryayev)

ilə mikroskopda hüceyrələrin sayılması



2. Sayğaclar

Elektron h.m. - Kaylter sayğacı

Nefelometriya (spektrofotometriya)

3. Membran süzgəc üsulu



Qoryayevin say kamerası

Hüceyrələrin ümumi sayının təyin edilməsi

Hüceyrələrin ümumi sayının təyin edilməsiində dolayı üsullardan hüceyrə suspenziyasının bulanıqlığının qiymətləndirilməsinə əsaslanan ən əlverişli üsul bulanıqlıq standartları üsuludur.

Bu zaman sayılacaq nümunənin bulanıqlığı standartlarla müqayisə edilir. Hazırda **McFarland** bulanıqlıq standartlarından daha çox istifadə edilir.

McFarland bulanıqlıq standartı:

- 1%-li sulfat turşusu (kimyəvi təmiz)
- 1.175%-li barium-xlorid



© Biorapid GmbH • www.biorapid.de

McFarland bulanıqlıq standartı

Təmiz kulturanın alınmasının III mərhələsi

- Təmiz kulturanın alınmasının III mərhələsi əldə edilmiş kulturanın təmizliyi yoxlanılır.
- Bunun üçün çəp aqarın səthində inkişaf etmiş kulturadan hazırlanmış yaxma Qram üsulu ilə boyadıldıqdan sonra mikroskopiya edilir. Yaxmada eyni morfolojiyaya malik bakteriyaların olması kulturanın təmizliyini təsdiq edilir.
- Təmiz kultura əldə edildikdən sonra həmin kulturanın **biokimyəvi (fermentativ) xüsusiyyətləri** öyrənilir.
- Bakterioloji müayinə üsulunun yekun mərhələsi əldə edilmiş təmiz kulturanın identifikasiyasından, yəni mikroorqanizmlərin cins və növünün təyin edilməsindən ibarətdir.
- Mikroorqanizmlərin *identifikasiyası* kultural, tinktorial, morfoloji, fermentativ, antigen və s. xüsusiyyətlər əsasında aparılır.

Kultural üsulun mərhələləri:

4 mərhələ:

Mərhələ 1 : Nümunə alınması



Mərhələ 2 : Kultivasiya



Mərhələ 3 : İdentifikasiya



Mərhələ 4 : Nəticə

(mikroorqanizmin cins və növünün təyini, antibiotiklərə həssaslığın təyini)

Bakteriyaların biokimyəvi (fermentativ) xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi:

- Bakteriyaların biokimyəvi (fermentativ) xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi **fermentlərinin** və **metabolitlərin** öyrənilməsinə əsaslanır
- Fermentativ xüsusiyyətlər mikroorqanizmlərin identifikasiyası üçün tətbiq olunan əsas taksonomik əlamətdir.
- Bu səbəbdən bakteriyaların identifikasiyası üçün **saxarolitik, proteolitik və digər fermentlər** təyin edilir.

Mikrob fermentləri:

- Mikroorqanizmlər genom səviyyəsində determinasiya olunan müxtəlif fermentlər sintez edirlər. Mikrob hüceyrəsində gedən bütün metabolik reaksiyaların əsasını təşkil edən fermentlər 6 sinifə aiddir:
 1. oksireduktazalar (oksidləşmə-reduksiya reaksiyaları kataliz edirlər),
 2. transferazalar (ayrı-ayrı atomları molekuldan molekula keçirir),
 3. hidrolazalar (suyun molekullarını birləşdirməklə proteinlərin, karbohidratların, lipidlərin parçalanmasına səbəb olur),
 4. liqazalar (iki molekulu yeni kimyəvi rabitə əmələ gətirməklə birləşdirir),
 5. liazalar (qeyri-hidrolitik yolla kimyəvi qrupları ayırır),
 6. izomerazalar (karbohidrat metabolizmində iştirak edir).
- Fermentlər bakteriya daxilində yerləşən – **endofermentlər** və ətraf mühitə ifraz olunan – ekzofermentlərə ayrılır.

Mikrob fermentləri:

- *Endofermentlər* hüceyrə hüduunda fəaliyyət göstərir, *ekzofermentlər* isə mikrob hüceyrəsindən xaricə ifraz edilməklə buradakı makromolekulları parçalayır və onların hüceyrə daxilinə keçməsinə asanlaşdırır.
- *Konstitutiv və induktiv fermentlər*
- *Metabolitik fermentlər* – oksireduktazalar, transferazalar, liazalar, liqazalar, hidrolazalar və izomerazalar
- *Aqressiya, yaxud patogenlik fermentləri* – hialuronidaza, neyraminidaza, lesitinaza və s.

Mikroorqanizmlərin fermentativ fəallığının öyrənilməsi:

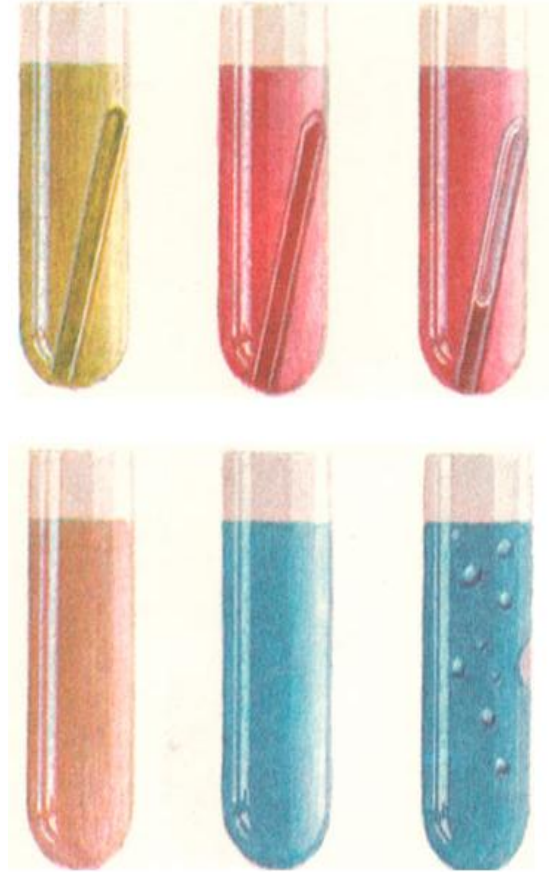
- Fermentativ xüsusiyyətlər mikroorqanizmlərin identifikasiyası üçün tətbiq olunan əsas taksonomik əlamətdir.
- Bakteriyaların identifikasiyası üçün **saxarolitik, proteolitik və digər fermentlər** təyin edilir.

Mikroorqanizmlərin karbohidratları fermentasiya etmək qabiliyyətinin (*saxarolitik xüsusiyyətlərin*) öyrənilməsi

- Bunun üçün **Hissin “əlvən” sıra mühitlərindən** istifadə etmək olar. Bu mühitlər içərisində maye, yaxud yarımmaye qidalı mühitlər olan sınaq şüşələri sırasından ibarətdir. Hər bir sınaq şüşəsindəki qidalı mühitin tərkibində bir karbohidrat olur. Bütün sınaq şüşələrinə **karbohidratların parçalanması** nəticəsində əmələ gəlmiş turş mühitin təsirindən rəngini dəyişən indikator əlavə edilir.
- Müayinə edilən kultura hansı karbohidratı parçalayırsa, ona müvafiq sınaq şüşəsində rəng dəyişikliyi müşahidə edilir, karbohidrat parçalanmayan sınaq şüşələri isə əvvəlki rəngini saxlayır (əlvən sıra).

Hissin “əlvan” sıra mühitləri:

- Bəzi bakteriyalar karbohidratları **ancaq turşu** əmələ gətirməklə, bəziləri isə **həm turşu, həm də qaz** əmələ gətirməklə parçalayırlar ki, bunu da identifikasiyada nəzərə almaq lazım gəlir.
- Qaz əmələ gəlməsini müəyyən etmək üçün əlvan sıra mühitlərinin olduğu maye qidalı mühitin daxilində bir ucu qapalı ağzı aşağı çevrilmiş şüşə boru olur. Əmələ gəlmiş qaz borunun dibində toplanır.
- Yarımmaye Hiss mühitlərində qaz əmələ gəlmə mühitdə qaz qabarcıqlarının olmasına əsasən müəyyən edilir.



Hissin “əlvan” sıra mühitləri:



Hissin “əlvan” sıra mühitləri:



E.coli - karbohidratları turşu və qaz əmələ gətirməklə parçalayır.

S.sonnei - qlükozanı qaz əmələ gətirmədən turşuya qədər parçalayır.

P.aeruginosa - karbohidratları fermentləşdirmir.

Hissin “əlvən” sıra mühitləri

- *Saxarolitik xüsusiyyətləri* müəyyən etmək üçün bakterioloji müayinənin 3-cü günü bakteriyaların əldə edilmiş təmiz kulturası ilgəklə “əlvən” sıra mühitlərinə inokulyasiya edilir, 37°C temperaturda 18-24 saat və ya daha uzun müddət ərzində inkubasiya edilir.
- Bakteriyalar karbohidratları turş məhsulların əmələ gəlməsinə qədər fermentasiya etdiyi halda, mühitin rənginin dəyişməsi müşahidə edilir: karbohidratın turşu və qaza qədər parşalanması zamanı, rəngin dəyişməsi ilə yanaşı üzgəclərdə qaz qabarcığı əmələ gəlir. Yarımmayə mühitlərdən istifadə edildiyi təqdirdə mühitin dərinliyində qaz qabarcıqlarının əmələ gəlməsi müşahidə edilir. Fermentasiya baş vermədikdə mühitin rəngi dəyişmir. Bakteriyalar yalnız Hiss mühitinə daxil olan hər növ üçün müəyyən karbohidratları fermentasiya etdiyindən əlvən rənglər müşahidə edilir, ona görə də karbohidratlı və indikatorlu mühitlər “əlvən” sıra adlanır.

Hissin “əlvən” sıra mühitləri

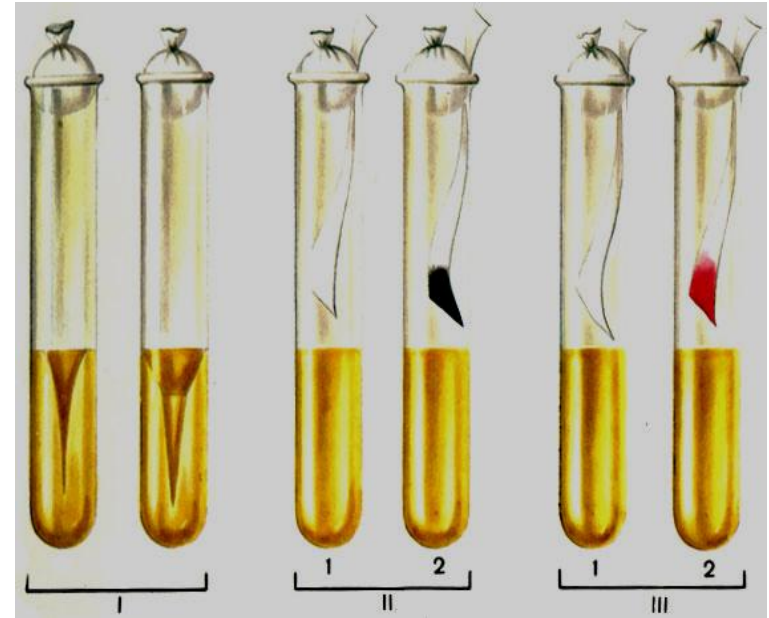
- Hissin qısa və uzun “əlvən” sıra mühitlərindən istifadə olunur.
- **Qısa “əlvən” sıraya** mono- və disaxaridlər olan qlükozal, laktozal, saxarozal, maltoza və altıatomlu spirtli – mannitli maye Hiss mühitləri aiddir.
- **Uzun “əlvən” sıraya**, yuxarıda qeyd olunan karbohidratlarla yanaşı, müxtəlif monosaxaridlər (arabinoza, ksiloza, ramnoza, qalaktoza və s.), polisaxaridlər (inulin, nişasta, qlikogen və s.) və spirtlər (qliserin, dulsit, inozit və s.) əlavə edilir.
- Bütün mühitlərə indikator kimi Andrede reaktivi əlavə edilir.

Mikroorqanizmlərin zülalları parçalama qabiliyyətinin (*proteolitik xüsusiyyətlərin*) öyrənilməsi:

Proteolitik fəallığı müəyyən etmək üçün bakteriya kulturasının jelatini parçalama və zülalların son parçalanma məhsulları olan ammonyak, indol, hidrogen sulfid və s. əmələ gətirməsi öyrənilir.

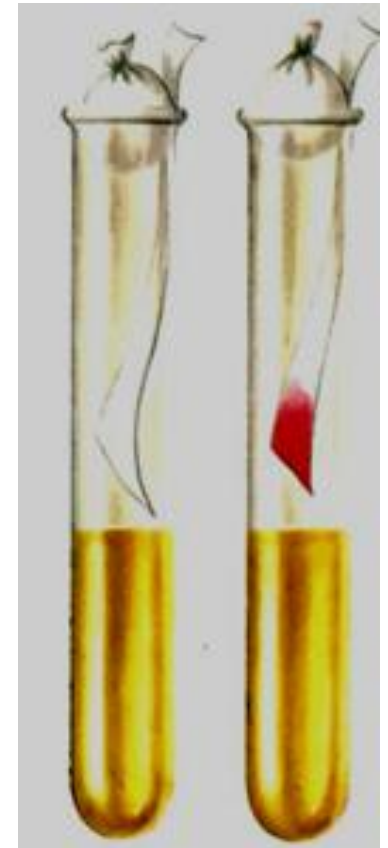
Proteolitik fermentlərin müəyyən edilməsi

- **Proteolitik fermentləri** müəyyən etmək üçün bakteriya kulturasını 10-20%-li jelatin sütununa iynə ilə və pepton suyuna inokulyasiya edirlər. İnokulyatları 20-22°C temperaturda bir neçə gün ərzində inkubasiya edirlər. Proteolitik fermentlər olduqda bakteriyalar jelatini mismar və ya tərsinə çevrilmiş şam ağacını xatırladan formalar şəklində əridir.
- Pepton suyu inokulyatlarında peptonun parçalanma məhsullarını 37°C temperaturda 2-3 gün ərzində inkubasiya etdikdən sonra ammoniyak, indol, hidrogen-sulfid və s. reaksiyalarının qoyulması ilə müəyyən edirlər.



İndolun müəyyən edilməsi:

- **Erlix üsulu:** bakteriya kulturası olan sınaq şüşəsinə 2-3 ml efir əlavə edilir, qarışdırılır və bir neçə damcı Erlix reaktivi (para-dimetil-amid-benzaldehydin xlorid turşusu ilə spirt məhlulu) əlavə edilir. İndol əmələ gələrsə qarışıq çəhrayı boyanır.
- **Morel üsulu:** oksalat turşusu hopdurulmuş süzgəc kağızının nazik zolağını (parçasını) tıxac altında elə bərkidirlər ki, qidalı mühitlə təmas etməsin. İnkubasiyadan sonra kağızın aşağı hissəsinin çəhrayı rəng alması indolun əmələ gəlməsini göstərir.



İndol testi

Kovac reaktivi ilə indolun müəyyən edilməsi:

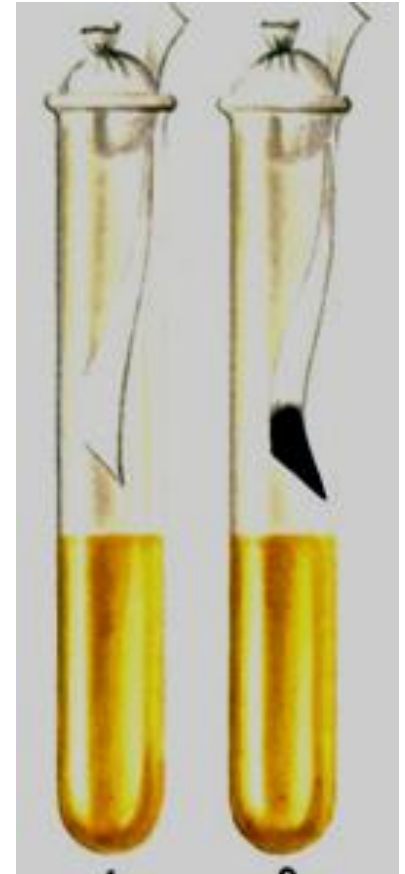
- İndol əmələ gətirməni təyin etmək üçün bakteriya maye triptofanlı qidalı mühitə kultivasiya olunub 18-24 saat 37°C-də inkubasiya edilir.
- 1-2 damla Kovac reaktivi (para dimetil amino benzaldehyd) əlavə edilir.
- Qidalı mühitin səthində qırmızı həlqənin əmələ gəlməsi pozitiv reaksiyanı göstərir.



1. *Kontrol*
2. *Escherichia coli* (ATCC25922)
3. *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048)

Hidrogen-sulfidin təyini

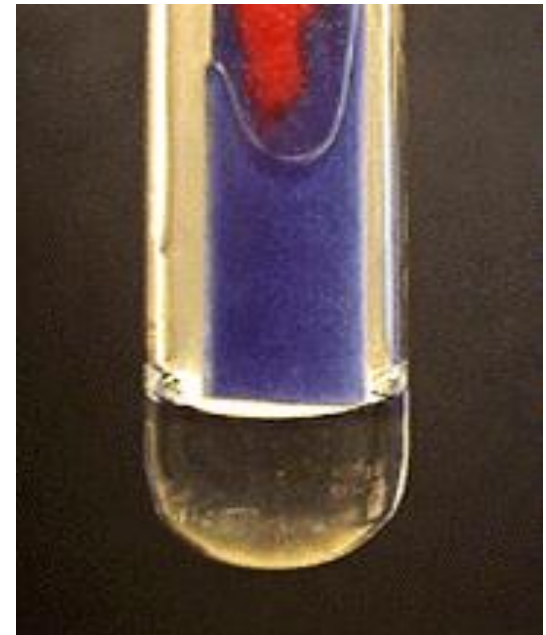
- Qurğuşun asetat hopdurulmuş süzgəc kağızının nazik zolağını (parçasını) tıxac altında elə bərkidirlər ki, qidalı mühitlə təmas etməsin.
- İnkubasiyadan sonra kağızın aşağı hissəsinin qaralması (quğuşun sulfidin əmələ gəlməsi hesabına) H_2S əmələ gəlməsini göstərir.
- Digər bir üsulda bakteriya kulturasını tərkibində dəmir sulfat, natrium tiosulfat, natrium sulfit olan qidalı mühit sütununa iynə ilə inokulyasiya edirlər. H_2S əmələ gəldikdə aqarın qaralması baş verir.



H_2S -in təyini

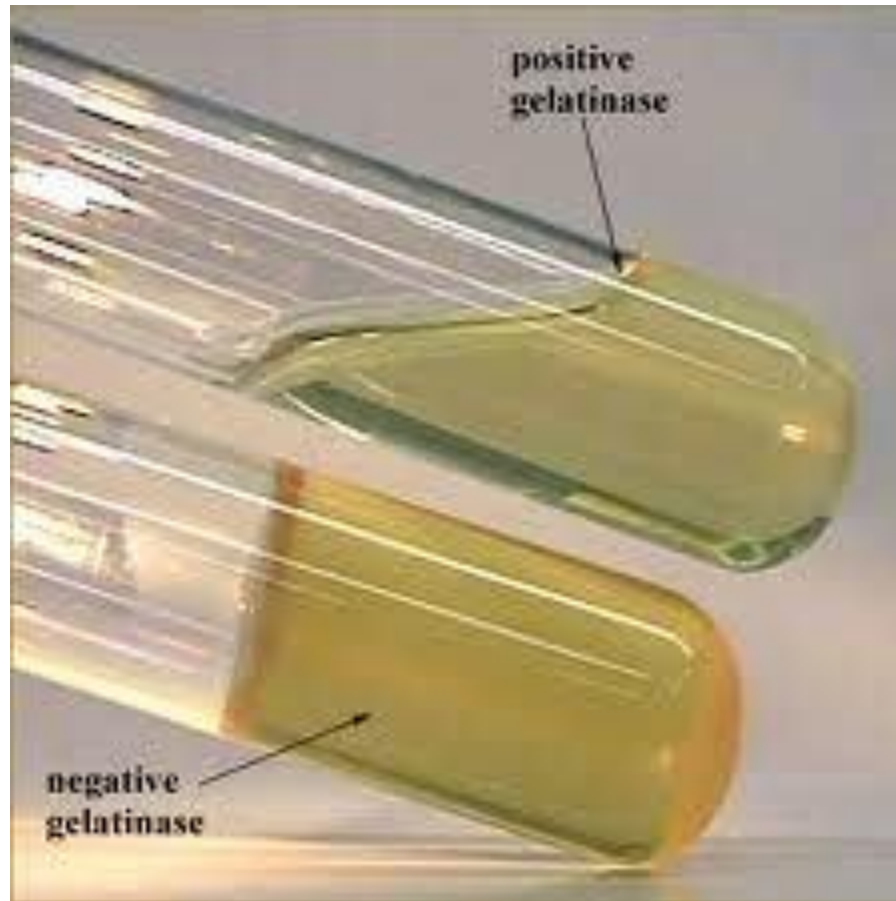
Ammonyakın təyini

- Lakmus kağızının nazik zolağını (parçasını) tıxac altında elə bərkidirlər ki, qidalı mühitlə təmas etməsin.
- İnkubasiyadan sonra kağızın göyərməsi ammonyakın əmələ gəlməsini göstərir.



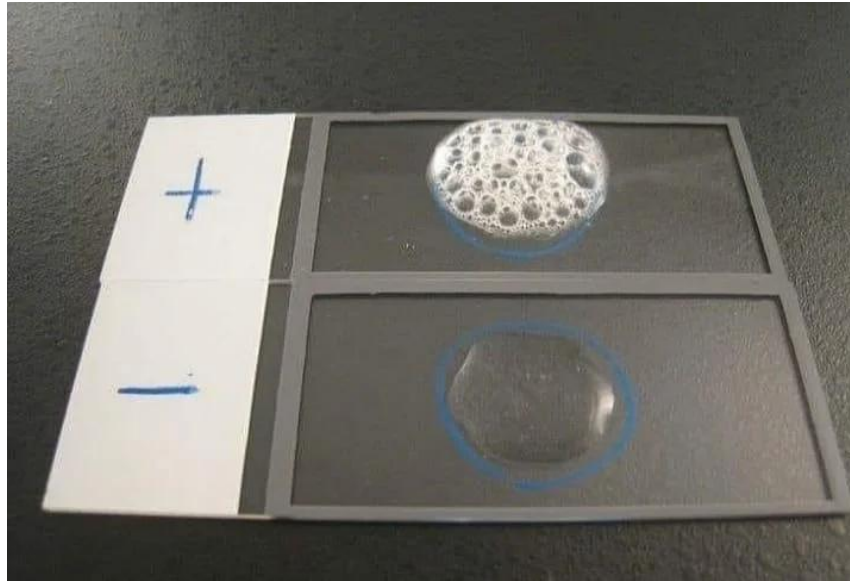
Müsbət ammonium sınağı

Jelatin testi



Katalazanın müəyyən edilməsi

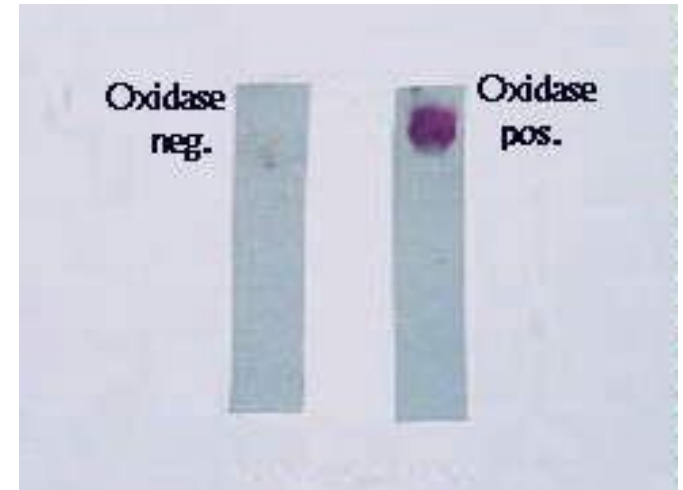
- Əşya şüşəsi səthinə bir damla 1-3% hidrogen peroksid məhlulu qoyulur və bakteriya kulturası əlavə edilir. Katalaza hidrogen peroksidi oksigen və suya parçalayır.
- Qaz qabarcıqlarının ayrılması katalaza fermentinin olmasını göstərir.



Müsbət və mənfi katalaza sınağı

Oksidaza sınağı

- **Testin prinsipi.** Bəzi bakteriyalar sitoxromoksidaza, ya da indofenoloksidaza əmələ gətirir. Bu fermentlər elektronların hidrogen donorlarından oksigenə verilməsini təmin edir.
- Oksidaza testi rəngsiz boya olan fenildiamin dihidroxlordin (oksigenin süni akseptoru) oksidaza təsirindən göy rəngli indofenola çevrilməsinə əsaslanır.
- **Testin aparılması.** Steril applikator, yaxud ilgəklə kulturadan götürüb indikatorlu kağız zolağın, yaxud diskin üzərinə sürülür.
- Müsbət nəticə olduqda 10-30 san. ərzində göy, yaxud bənövşəyi rəng əmələ gəlir.



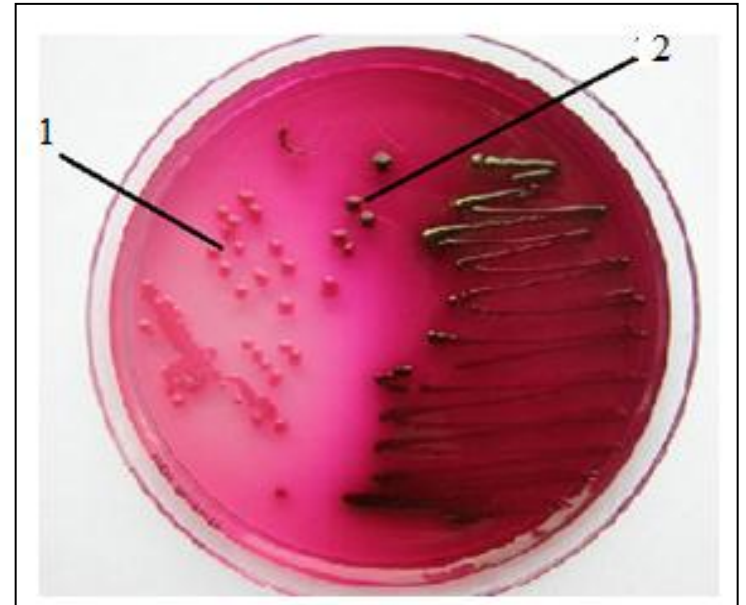
Test *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Neisseria* cinsli Qram mənfi bakteriyaların ilkin identifikasiyasında istifadə edilir.

Differensial qidalı mühitlərin tətbiqi

- Məlum olduğu kimi differensial qidalı mühitlər mikroorqanizmləri bir-birindən differensiasiya etməyə (fərqləndirməyə), bəzən hətta onu identifikasiya etməyə imkan verir.
- Belə mühitlərdə mikroorqanizmlərin fərqləndirilməsi başlıca olaraq onların fermentativ xüsusiyyətlərinə əsaslanır.
- Laboratoriya şəraitində Hiss mühitlərindən əlavə **Endo mühiti, MacConkey, eozin və metilen abısı (EMB)** mühitləri və s. də tətbiq edilir.

Endo mühiti

- Tərkibində 1% laktoza və indikator (natrium tiosulfitlə rəngsizləşdirilmiş əsasi fuksin) vardır.
- İstifadə üçün hazırlanmış Endo aqarı cəhrayı rəngdə olur.
- Laktozanı parçalayan bakteriyalar bu mühitdə metal parlaqlığına malik qırmızı koloniyalar əmələ gətirir (laktozanın turşuya parçalanması hesabına),
- laktozanı parçalamayanlar isə rəngsiz koloniyalar halında inkişaf edir.



koloniyalar

1- laktoza neqativ; 2- laktoza pozitiv

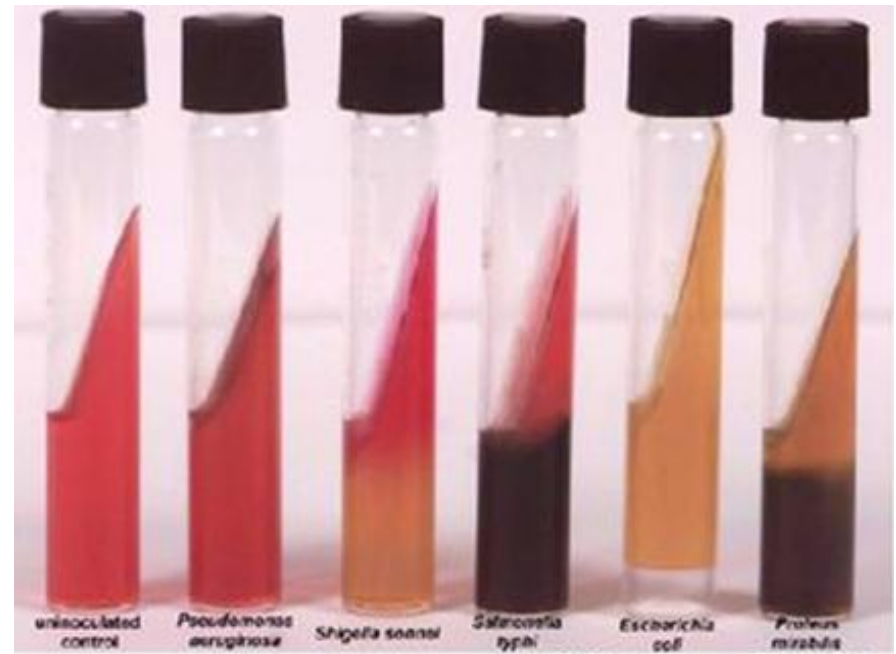
Kliqler mühiti

Tərkibi: 1% laktoza, 0,1% qlükoza, Na-tiosulfat, Fe-sulfat, indikator

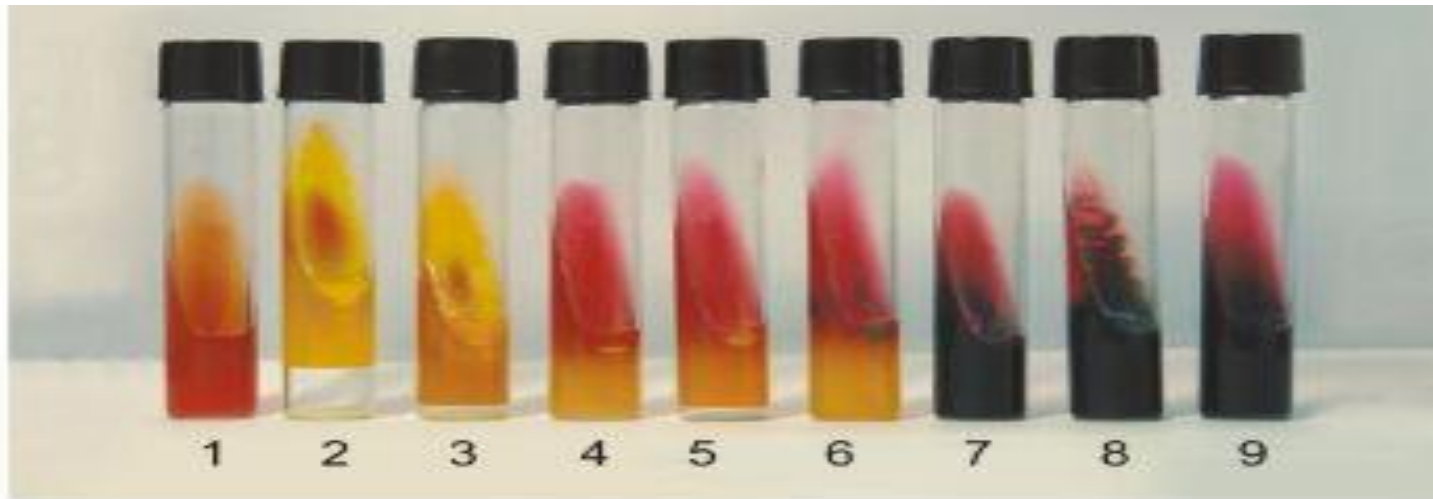
Hazır mühit sınaq şüşələrində çəp aqar şəklində cəhrayı rəngdə olur,

İnokulyasiya – çəp səthə ilgəklə, aqar sütununa iynə vasitəsilə

- Ancaq qlükoza parçalandığı təqdirdə aqar sütunu saralır, çəp hissə rəngini dəyişmir
- Həm qlükoza, həm də laktoza parçalandığı təqdirdə (*E.coli*) bütün aqar saralır,
- H₂S əmələ gəldikdə (*salmonella*, *protey*) aqar qaralır.



Müxtəlif bakteriyalarda Kligler aqarda inkişafının nəticələri



Kligler Iron Agar (M078)

1. Control
2. *Escherichia coli* ATCC 25922
3. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
4. *Shigella flexneri* ATCC 12022
5. *Salmonella Paratyphi A* ATCC 9150
6. *Salmonella Typhi* ATCC 6539
7. *Proteus vulgaris* ATCC 6380
8. *Citrobacter freundii* ATCC 8090
9. *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076

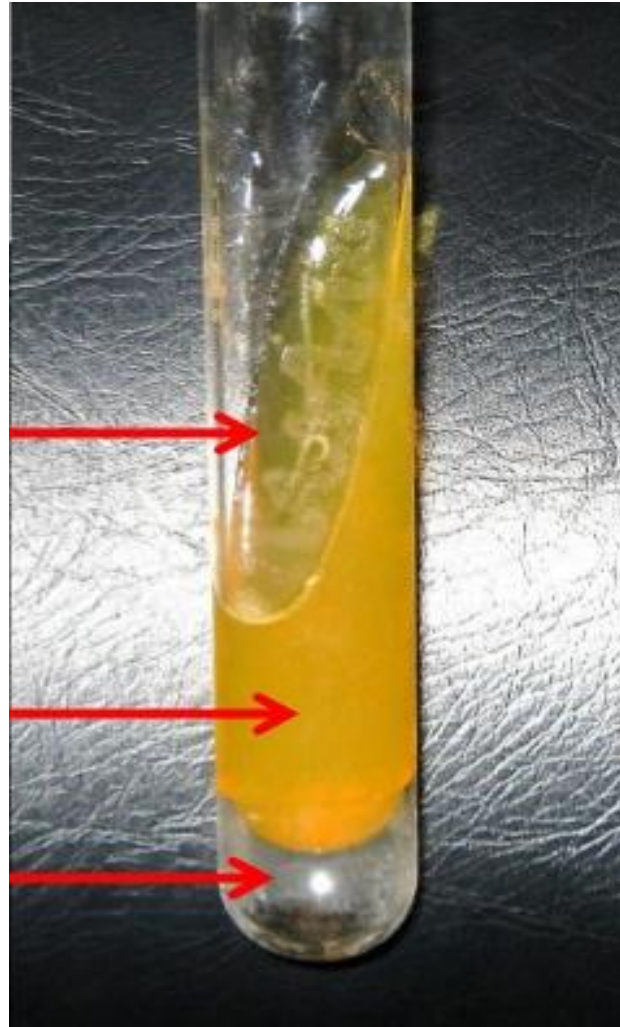
Kliqler aqar

Escherichiae coli

ÇƏP HİSSƏ: TURŞU (+)

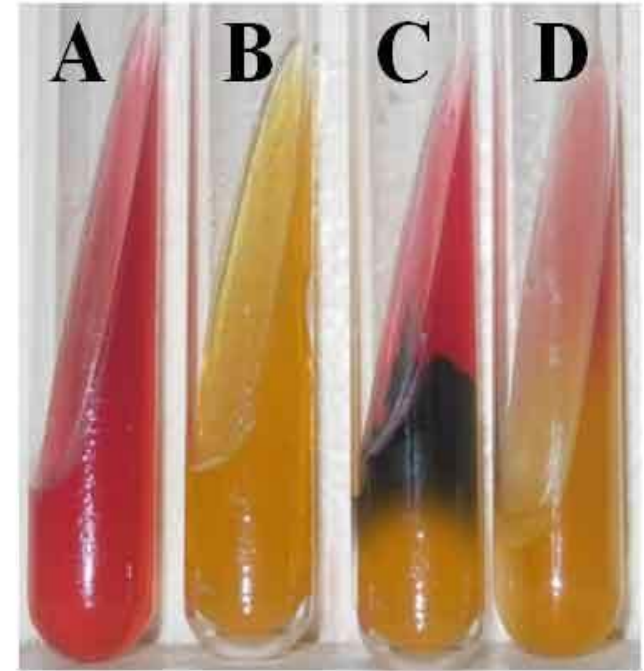
SÜTÜN HİSSƏ: TURŞU (+)

QAZ (+)



TSİ (triple sugar iron) aqar

- Tərkibi:
- 1% laktoza
- 1% saxaroza
- 0,1% qlükoza (parçalayırsa aqar sütunu sarı rəngə çevrilir)
- Fe-sulfat - H_2S əmələ gəlməni yoxlamaq üçün (əmələ gətirirsə qaralır)
- pH-indikator-fenol qırmızı



A) *Psuedomonas aeruginosa*: Gluc (-), Lac/Suc (-), H_2S (-)

B) *Escherichia coli*: Gluc (+), Lac/Suc (+), H_2S (-)

C) *Salmonella typhimurium*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H_2S (+)

D) *Shigella boydii*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H_2S (-)

***TSİ – Triple Sugar Iron agar –
üçlü şəkərli (qlükoza, laktoza, saxaroza) dəmirli aqar***



TSİ aqar – inokulyasiyadan əvvəl



ÇƏP HİSSƏ:

Laktoza/Saxaroza parçalanmır (-)



Hidrogen-sulfid

(-)

Qaz (-)

SÜTÜN HİSSƏ:

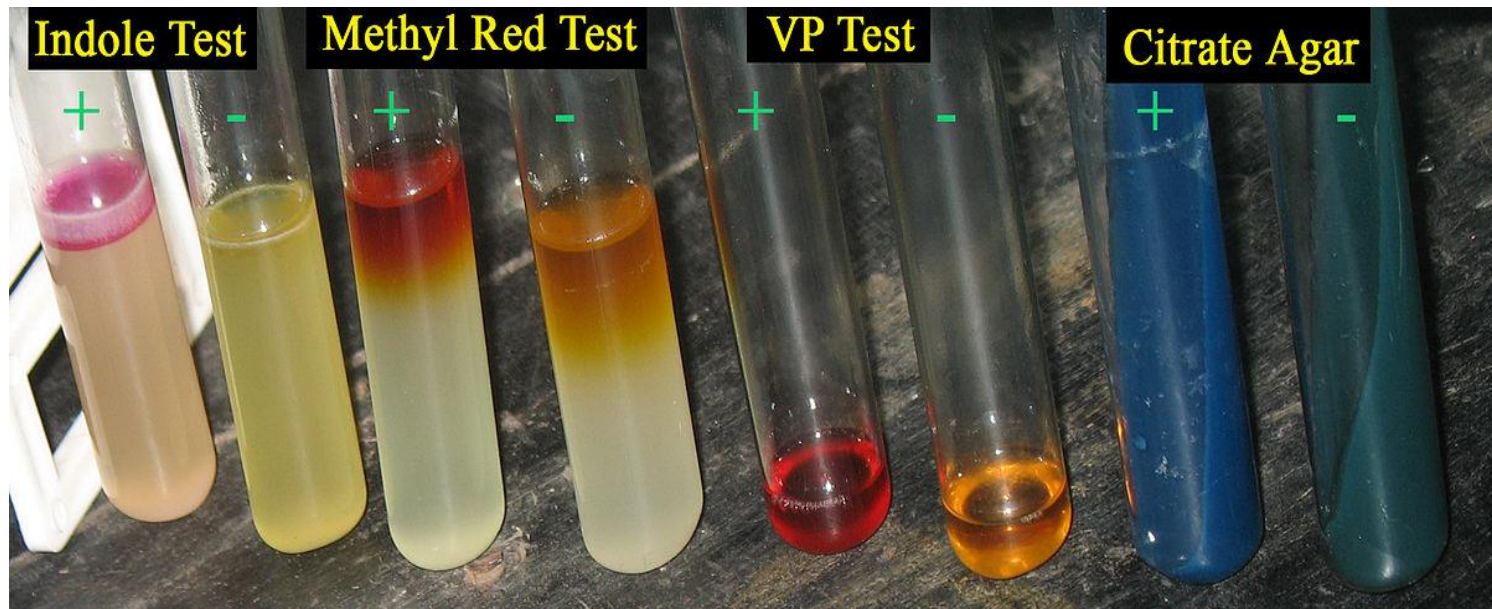
Qlükoza turşuya qədər parçalanır (+)



TSİ aqar – inokulyasiyadan sonra

iMViC testi (4 testdən ibarətdir)

- İndol testi
- Metil qırmızısı testi
- Voges-Proskauer testi
- Sitrat testi



Müxtəlif bakteriyalarda İMViC testinin nəticələri

IMViC Reactions

	I	M	Vi	C
<i>Escherichia coli</i>	+	+	–	–
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	–	–
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	–	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	–	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	–	+	+
<i>Enterobacter</i> spp.	–	–	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	–	–	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	–	+	–	+
<i>Citrobacter koseri</i>	+	+	–	+

***E.coli*-nin İMViC test vasitəsilə identifikasiyası**



API sistem

(Application programming interface)

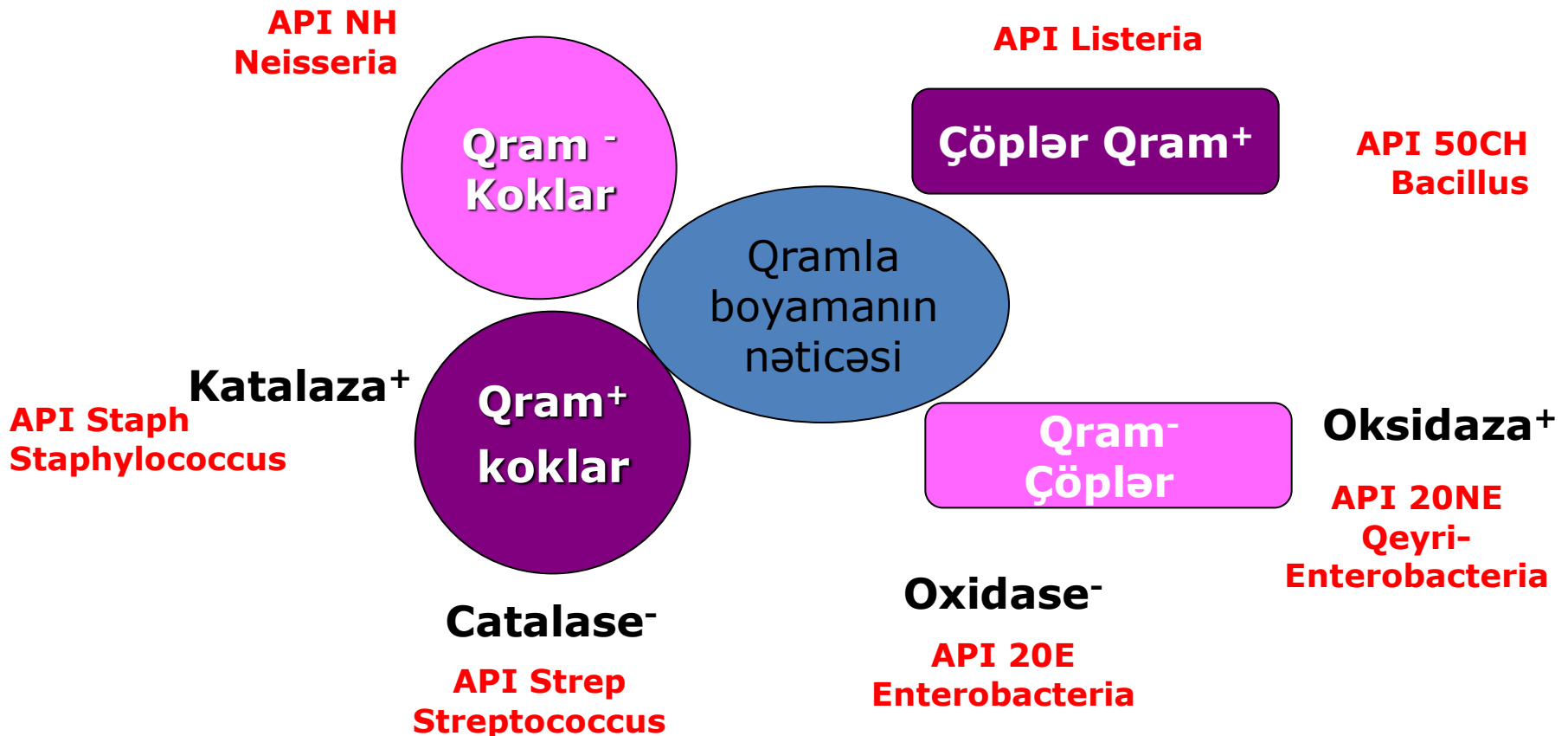
... API testinin aparılmasından əvvəl təmiz kultura əldə edilməli və bəzi ilkin identifikasiya testləri aparılmalıdır

test 1 : Qram üsulu ilə boyamadılmış yaxmanın mikroskopiyasının nəticəsi (Qram-, Qram+, çöp, kokşəkilli və s.)

test 2 : Respirator enzim testləri → oksidaza, katalaza

API sistem

Qramla boyamanın nəticəsinə, oksidaza və katalaza testlərinin nəticəsindən asılı olaraq müxtəlif API-panellərindən istifadə edilir



API sistem



API Strep

→ *Streptococcus* növlərinin identifikasiyası



API Staph

→ *Staphylococcus* növlərinin identifikasiyası



API 20NE

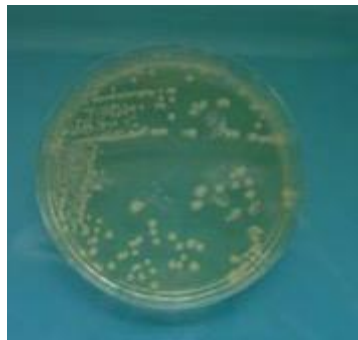
→ qeyri-Enterobacterales növlərinin identifikasiyası (*Pseudomonas*)



API 20E

→ **E**nterobacteria növlərinin identifikasiyası

API sistem vasitəsilə identifikasiyanın mərhələləri



1 bakteriya koloniyası



5 ml steril su



**Mikroborucuqlara
bakteriya suspenziyası
inokulyasiya edilir**



API sistem

24 saat 37 dərəcədə inkubasiyadan sonra API sistemin görüntüsü



Azotun metabolizmi

Karbohidratların metabolizmi

24h / 37° C.....

API sistem

API 20 E inkubasiya sonrası...Bütün testlər pozitiv nəticə verib:



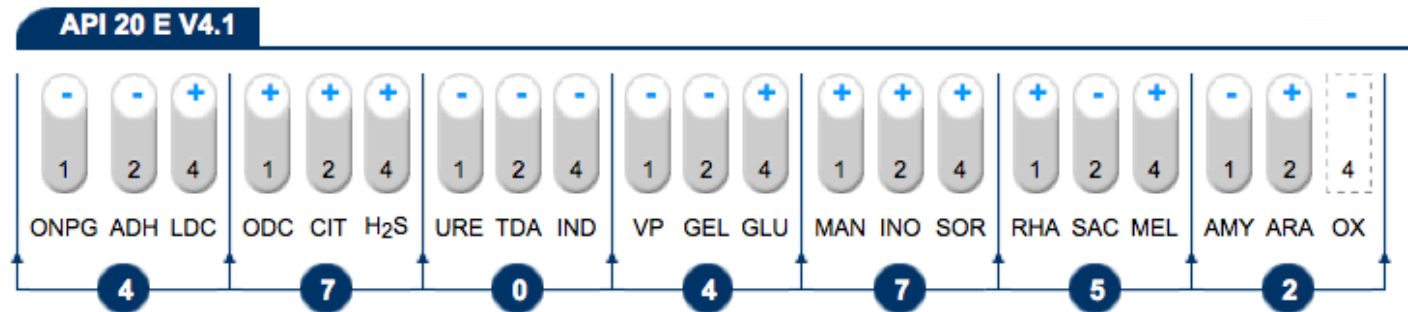
inkubasiya sonrası...Bütün testlər neqativ nəticə verib



API sistem (nəticələrin interpretasiyası)



Nəticələrin məlumat bazasına daxil edilməsi:



API sistem

(nəticələrin interpretasiyası)

Expression of results by software :

EXCELLENTE IDENTIFICATION						
Galerie	API 20 E V4.1					
Profil	4 7 0 4 7 5 2					
Note(s)	CONFIRMER PAR DES TESTS SEROLOGIQUES					
Taxons significatif(s)		% ID	T	Test(s) à l'encontre		
Salmonella spp		99.9	0.95			

**İdentifikasiya
edilmiş
bakteriya**

**İdentifikasiya
keyfiyyəti**

API sistemlə işləmə qaydası

(nəticələr online məlumat bazası vasitəsilə oxunur)



Reading an API20E using the online database (1).mp4

Mikroorqanizmlərin müasir avtomatik identifikasiya sistemləri

- **Vitek-2 Compact** analizatoru – 5-8 saat müddətində mikroorqanizmlərin (bakteriyaların və mayayabənzər göbələklərin) identifikasiyasını və onların antimikrob preparatlara qarşı həssaslığının müəyyən edilməsini təmin edən tam avtomatik sistemdir.
- İdentifikasiya mikroorqanizmlərin biokimyəvi xüsusiyyətlərinin avtomatik təyin edilməsi ilə aparılır, tam identifikasiya mümkün olmadığı təqdirdə kompyuter proqramı təhlili əsasında identifikasiya edilən mikroorqanizmin hansı mikroorqanizm ola bilməsi ehtimalı (faizlə) göstərilir.

Mikroorqanizmlərin müasir avtomatik identifikasiya sistemləri

- Bu və digər avtomatik identifikasiya sistemləri identifikasiya ediləcək mikroorqanizmlərin ideal təmiz kulturasının alınmasını tələb edir.
- Əldə edilmiş təmiz kultura (inokulyat) cihazın kassetinə yerləşdirilir, bundan sonra cihazın inkubasiya etməsi və nəticələri müəyyənləşdirməsi üçün müəyyən müddət vaxt tələb olunur.
- Analizin sonunda inokulyatdakı mikroorqanizmin cins və növ mənsubiyyəti, eləcə də hansı antimikrob preparata həssas, yaxud rezistent olması göstərilir.
- Analizator eləcə də antimikrob preparatın minimal inhibisiya konsentrasiyası (MİK) və rezistentlik mexanizmləri haqqında nəticə çıxarmağa imkan verir.

BioMerieux (ABŞ) firmasının *Vitek-2 Compact* avtomatik mikrobioloji analizatoru



Matriks aktivləşdirilmiş lazer desorbsiyası / ionlaşması (MALDI-TOF)

Mass spektrometriyasına əsaslanan avtomat sistem

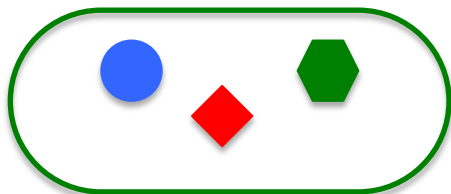
Prinsipi

**Mass spektrometriya vasitəsilə hüceyrə
proteinlərinin fiziki təyini**

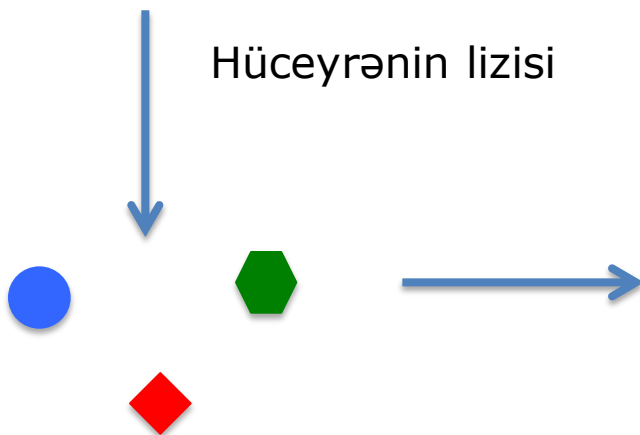
+ əldə edilən spektr profili məlumat bazası ilə
qarşılaşdırılır

MALDI-TOF

Bakteriya

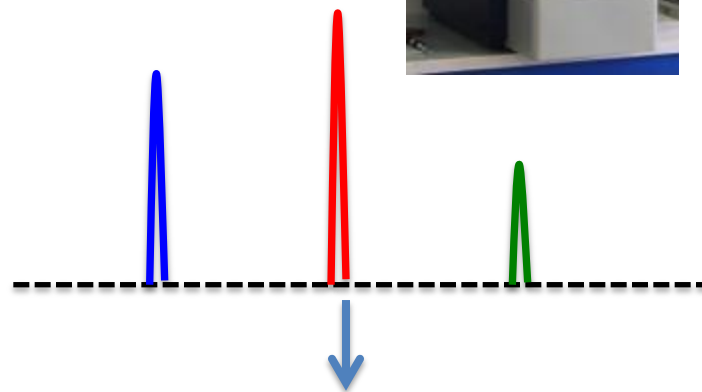


Hüceyrənin lizisi



Molekulların
ekstraksiyası

Mass-spektrometriya
vasitəsilə molekulların
deteksiyası və spektrin
tərtibi

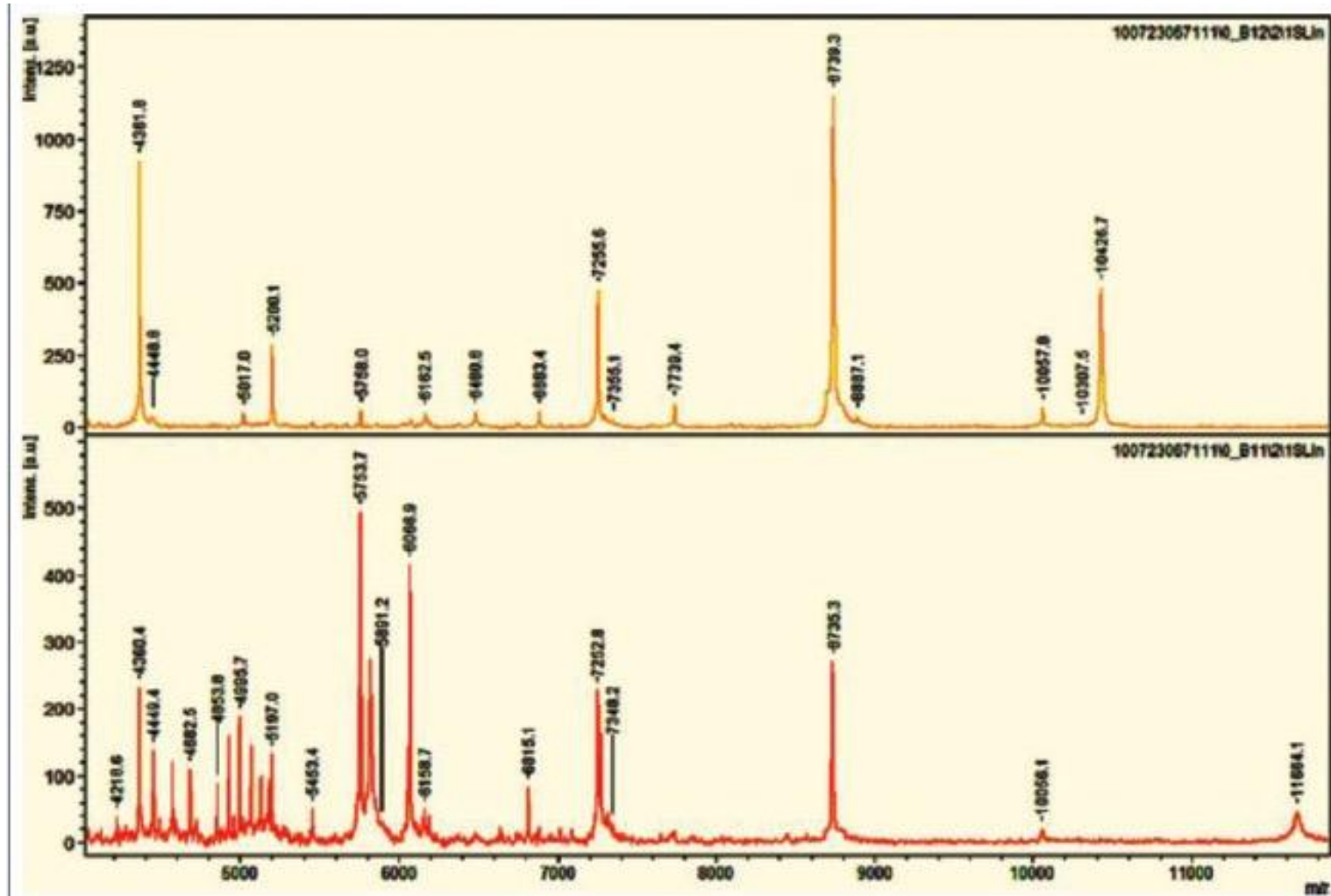


Əldə edilən spektrin
məlumat bazası ilə
qarşılaşdırılması və
identifikasiya



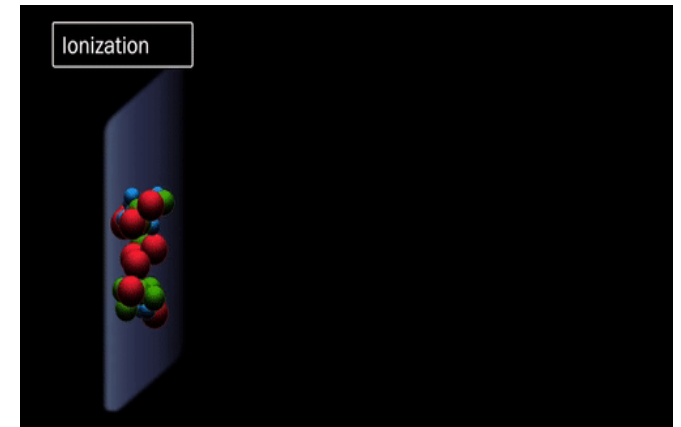
MALDI –TOF

(bakteriya spektrləri)



MALDI-tof mass spektrometriya

- MALDI-tof mass spektrometriya (*ing.* Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Matrisin aktivləşmiş lazer desorbsiyası (ionlaşması))
- Lazer şüalarının matriksdəki analiz olunan maddə ilə qarşılıqlı təsiri nəticəsində maddə ionlaşır
- Uçucu olmayan yüksək molekullu birləşmələr (peptid, zülallar, oliqonukleotid, karbohidratlar) təyin edilir.
- MALDI-tof cihazını yaratdığına görə yapon mühəndis K.T.Şimadzu 2002-ci ildə Nobel mükafatı almışdır.



Biomerieux VITEK-2 - bakterioloji analizator

- Vitek-2 Compact analizatoru avtomatik sistemdir.
- Mikroorqanizmlərin identifikasiyası
- Antimikrob preparatlara həssaslığı təyin edilir (1 gün ərzində)
- 64 çökəkli plastik kartdan ibarətdir
- Qram mənfi bakteriyalar
- Qram müsbət bakteriyalar
- Maya göbələkləri
- Anaerob bakteriyalar, neyссерiyalar, hemofil çöplər
- Yüksək virulentli mikroorqanizmlərdən: *Brucella melitensis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei*, *Escherichia coli* O157, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* təyin edilir.
- Nəticənin əldə edilmə vaxtı 6-8 saatdır.

Biomerieux VITEK-2 - bakterioloji analizator



***Antimikrob həssaslıq testi – (striplər)
antimicrobial susceptibility testing-
AST testi***

Növlərin identifikasiyası (İD) kartları