**Козловська Г. В., Мельник М. В., Виговська Л. М.,
Ігнатовська М. В., Дишкант О. В.**

ПРАКТИКУМ З ВЕТЕРИНАРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

Навчальний посібник

Київ
2026

УДК 636.09:579(072)
П 69

Рекомендовано до видання рішенням Вченої ради
Національного університету біоресурсів і природокористування України
(Протокол № 9 від 26 лютого 2026 року).

Рецензенти:
Мандигра М. С., доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН, академік-секретар відділення ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України;
Рубленко І. О., доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології та вірусології Білоцерківського НАУ;
Ковпак В. В., доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри ветеринарної репродуктології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

П 69 Практикум з ветеринарної мікробіології: навчальний посібник / Козловська Г. В., Мельник М. В., Виговська Л. М., Ігнатовська М. В., Дишкант О. В. / – Київ: НУБіП України, 2026, 284 с.

*При підготовці навчального видання частково використано програми штучного інтелекту (зокрема, ChatGPT, OpenAI) з метою мовного редагування та покращення стилістичного оформлення тексту. Усе змістове наповнення забезпечено авторами.

ISBN

Навчальний посібник призначений для формування практичних навичок роботи з мікроорганізмами у здобувачів вищої освіти спеціальності Н6 «Ветеринарна медицина». Він сприяє формуванню умінь щодо застосування класичних і сучасних методів виділення, культивування та ідентифікації мікроорганізмів, зокрема патогенних і умовно-патогенних збудників інфекційних хвороб тварин. Посібник також сприяє набуттю компетентностей у сфері санітарно-бактеріологічного контролю об’єктів довкілля. Зміст навчального посібника відповідає освітній програмі дисципліни «Ветеринарна мікробіологія».

УДК 636.09:579(072)

© Козловська Г. В., Мельник М. В.,
Виговська Л. М., Ігнатовська М. В.,
Дишкант О. В., 2026
© НУБіП України, 2026

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 5
ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ 7
ПЕРЕДМОВА 9

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ 10
Тема 1. Мікробіологічні лабораторії. Правила роботи й техніка безпеки в мікробіологічній лабораторії *(Козловська Г.В.)* 10
Тема 2. Морфологія бактерій *(Козловська Г. В.)* 25
Тема 3. Методи приготування препаратів за мікробіологічних досліджень *(Козловська Г. В.)* 29
Лабораторне заняття 1. Методика приготування мазків та простий метод їх фарбування 29
Лабораторне заняття 2. Диференційні методи фарбування мікроорганізмів 33
Лабораторне заняття 3. Спеціальні методи фарбування 35
мікроорганізмів 35
Лабораторне заняття 4. Методи фарбування для 38
виявлення капсул у бактерій 38
Тема 4. Визначення рухливості у бактерій *(Козловська Г. В.)* 39
Тема 5. Визначення розміру бактерій *(Козловська Г. В.)* 43
Тема 6. Морфологія цвілевих грибів, дріжджів та актиноміцетів *(Мельник М. В.)* 45
Тема 7. Методи стерилізації *(Козловська Г. В.)* 57
Тема 8. Культивування мікроорганізмів *(Козловська Г. В.)* 65
Лабораторне заняття 1. Живильні середовища 65
Лабораторне заняття 2. Техніка посіву мікроорганізмів на живильні середовища, виділення чистих культур 70
Лабораторне заняття 3. Культуральні властивості мікроорганізмів 75
Лабораторне заняття 4. Вивчення ферментативних властивостей мікроорганізмів 77
Тема 9. Визначення виду мікроорганізмів *(Козловська Г. В.)* 83
Тема 10. Вплив біологічних факторів на бактерії *(Козловська Г. В.)* 85
Тема 11. Санітарно-мікробіологічне дослідження об'єктів довкілля…… *(Козловська Г. В.)* 91
Тема 12. Серологічні (імунологічні) методи дослідження у ветеринарній мікробіології *(Мельник М. В.)* 100

РОЗДІЛ 2. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БАКТЕРІОЗІВ, МІКОПЛАЗМОЗІВ, РИКЕТСІОЗІВ, ХЛАМІДІОЗІВ, МІКОЗІВ ТА МІКОТОКСИКОЗІВ 131

Лабораторна діагностика стафілококозу *(Виговська Л. М.)*..... 131
Лабораторна діагностика миту коней *(Виговська Л. М.)*..... 137
Лабораторна діагностика сальмонельозу та колібактеріозу *(Виговська Л. М.)* . 143
Лабораторна діагностика кишкового ієрсиніозу *(Козловська Г. В., Дишкант О. В.)* 152
Лабораторна діагностика лістеріозу *(Виговська Л. М.)*..... 159
Лабораторна діагностика бешихи свиней *(Виговська Л. М.)*..... 166
Лабораторна діагностика пастерельозу *(Виговська Л. М.)*..... 171
Лабораторна діагностика бруцельозу великої рогатої худоби *(Виговська Л. М.)* 176
Лабораторна діагностика туляремії *(Виговська Л. М.)*..... 184
Лабораторна діагностика сибірки *(Ігнатовська М. В.)*..... 189
Лабораторна діагностика емфізематозного карбункула та некробактеріозу у великої рогатої худоби *(Ігнатовська М. В.)* 196
Лабораторна діагностика правця *(Ігнатовська М. В.)* 200
Лабораторна діагностика ботулізму *(Ігнатовська М. В.)*..... 204
Лабораторна діагностика туберкульозу *(Ігнатовська М. В.)*..... 206
Лабораторна діагностика лептоспірозу (*Ігнатовська* М. В.)..... 211
Лабораторна діагностика кампілобактеріозу у великої рогатої худоби *(Ігнатовська М. В.)*..... 216
Лабораторна діагностика сапу *(Мельник М. В.)*..... 221
Лабораторна діагностика дизентерії свиней *(Мельник М. В.)* 229
Лабораторна діагностика мікоплазмозів *(Мельник М. В.)* 232
Лабораторна діагностика хламідіозу *(Мельник М. В.)* 239
Лабораторна діагностика рикетсіозів *(Мельник М. В.)*..... 249
Лабораторна діагностика дерматомікозів *(Мельник М. В.)*..... 259
Лабораторна діагностика мікотоксикозів *(Мельник М. В.)*..... 271

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... 282

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – антиген
АСМ – атомно-силовий мікроскоп
АТ – антитіло
атм – атмосфера
БГКП – бактерії групи кишкової палички
БПА – біологічно небезпечні агенти
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ЗМЧ – загальне мікробне число
іРНК – інформаційна РНК
ІФА – імуноферментний аналіз
КР – кільцева реакція з молоком
КУО – колонієутворюючі одиниці
ЛПС – ліпополісахарид
ЛФ – летальний фактор
МІК – мінімальна інгібуюча концентрація
мкм – мікрометр
МПА – м’ясо-пептонний агар
МПБ – м’ясо-пептонний бульйон
МПЖ – м’ясо-пептонна желатина
МФА – метод флуоресціюючих антитіл
нм – нанометр
НФ – набряковий фактор
ОД – одиниці дії
ПА – протективний антиген
ПЗЛ – повальне запалення легень
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
ПППО – плевропневмонієподібні організми
РА – реакція аглютинації
РБП – реакція бенгальської проби
РДП – реакція дифузійної преципітації
РЗК – реакція зв’язування комплементу
РЗНГА – реакції затримки непрямої гемаглютинації
РІД – реакція імунодифузії у гелі
РІФ– реакція імунофлуоресценції
РМА – реакція мікроаглютинації
РНГА – реакції непрямої гемаглютинації
РНК – рибонуклеїнова кислота
РТЗК – реакція тривалого зв’язування комплементу
СЕМ – сканувальний електронний мікроскоп
СТМ – сканувальний тунельний мікроскоп
ТЕМ – трансмісійний електронний мікроскоп
УФО – ультрафіолетове опромінення
ЦПМ – цитоплазматична мембрана

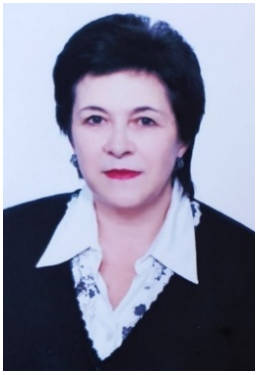
ЧА – числова апертура
ANI – Average Nucleotide Identity – середня нуклеотидна ідентичність
ATCC – American Type Culture Collection – Американська колекція типових культур
BSL – Biosafety Level – рівень біологічної безпеки
CDC – Centers for Disease Control and Prevention – Центр контролю та профілактики захворювань
CIN-агар – Cefsulodin–Irgasan–Novobiocin (CIN) agar – цефсулодин–іргасан–новобіоцин агар
NIH – National Institutes of Health – Національний інститут охорони праці та здоров'я
EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Європейський комітет з визначення чутливості до антимікробних препаратів
HEPA-filter – High-Efficiency Particulate Air filter – високоефективний повітряний фільтр тонкого очищення
MALDI-TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry – матрично-асистована лазерна десорбція/іонізація з часопролітною мас-спектрометрією
MLST – Multilocus Sequence Typing – мультилокусне типування за послідовностями
MRSA – Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* – метицилін-резистентний *Staphylococcus aureus*
PALM – Photoactivated Localization Microscopy – фотоактивована локалізаційна мікроскопія
STED – Stimulated Emission Depletion – мікроскопія на основі пригнічення спонтанного випромінювання
WGS – Whole Genome Sequencing – повногеномне секвенування

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ



Козловська Ганна Володимирівна

Кандидат ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин НУБіП України. Викладає навчальні дисципліни: «Ветеринарна мікробіологія», «Veterinary Microbiology», «Мікробіологія, вірусологія та імунологія», «Санітарна мікробіологія» «Ветеринарна вірусологія». Наукові інтереси пов'язані з вивченням еколого-біологічних аспектів збудників харчових токсикоінфекцій в плані розробки ефективних засобів їх діагностики і профілактики. Автор та співавтор понад 200 наукових та науково-методичних видань, зокрема 3 монографій, 6 підручників, 11 навчальних посібників, 8 науково-практичних рекомендацій, впроваджених у практику ветеринарної медицини. Співавтор 2 патентів на винахід та 6 патентів на корисні моделі. Електронна адреса: kozlovska@nubip.edu.ua



Мельник Марія Василівна

Кандидат ветеринарних наук, доцент, доцент кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин НУБіП України. Викладає навчальні дисципліни: «Ветеринарна мікробіологія», «Технічна мікробіологія», «Мікробіологія м'яса та м'ясних продуктів», «Мікробіологія риби і рибних продуктів», «Мікробіологія харчових продуктів», «Мікробіологія у тваринництві». Наукові інтереси та напрям наукових досліджень – якість та безпека продуктів тваринництва. Автор та співавтор понад 250 наукових та навчально-методичних праць, зокрема: 4 підручників, 1 практикуму, 2 навчальних посібників, 2 типових програм, 1 монографії, 4 курсів лекцій, 32 методичних розробок з навчальних дисциплін, 1 патенту на корисну модель. Співавтор 8 статей, які включені до міжнародної наукометричної бази Scopus. Електронна адреса: m.melnyk@nubip.edu.ua



Виговська Лілія Миколаївна

Доктор ветеринарних наук, професор кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни «Ветеринарна мікробіологія», «Ветеринарна вірусологія». Наукові інтереси пов'язані з ветеринарною мікробіологією, вірусологією, лабораторною діагностикою інфекційних хвороб, біотехнологією імунобіологічних препаратів. Автор та співавтор понад 150 наукових та навчально-методичних праць, зокрема 2 монографій, 1 навчального посібника, 12 патентів на корисну модель, 4 свідоцтв про реєстрацію авторського права на твір. Електронна адреса: lnvygovska@gmail.com



Ігнатовська Маріанна Володимирівна

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров’я тварин НУБіП України. Викладає навчальні дисципліни: «Ветеринарна мікробіологія», «Ветеринарна вірусологія», «Біотехнологія у ветеринарній медицині», «Методи мікологічних дослідження». Наукові інтереси пов'язані з ветеринарною мікробіологією, вірусологією, біотехнологією, санітарною оцінкою продуктів забою кролів за використання вітаміну Е у водорозчинній формі. Автор та співавтор понад 30 наукових та навчально-методичних праць, зокрема: 1 патенту на корисну модель, 1 патенту на винахід, співавтор 3 статей, які включені до міжнародної наукометричної бази Scopus. Електронна адреса: ihnatovska_mv@nubip.edu.ua



Дишкант Ольга Василівна

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров’я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни «Ветеринарна вірусологія» та «Ветеринарна мікробіологія». Наукові інтереси пов’язані з ветеринарною вірусологією, мікробіологією і лабораторною діагностикою інфекційних захворювань собак і котів. Автор понад 100 наукових праць, зокрема 4 посібників, 2 монографій, 3 патентів на корисну модель. Електронна адреса: dyshkant_olga@ukr.net

ПЕРЕДМОВА

Мікроорганізми широко розповсюджені та відіграють важливу роль у біосфері. Водночас багато з них здатні викликати захворювання у людини, тварин та рослин, спричиняти пошкодження металевих конструкцій, псувати харчові продукти та корми для тварин. Інфекційні хвороби, спричинені мікроорганізмами, нерідко набувають характеру епідемій, а інколи – пандемій у популяціях людини та епізоотій або панзоотій серед тварин.

Дисципліна «Ветеринарна мікробіологія» займає центральне місце у підготовці лікаря ветеринарної медицини. Вона формує базові знання про мікроорганізми, зокрема їх морфологію, фізіологію та взаємодію з макроорганізмом, розкриває механізми патогенності і забезпечує розуміння основ етіології, патогенезу, діагностики, профілактики та лікування інфекційних хвороб тварин. У контексті концепції ВООЗ «Єдине здоров'я» дисципліна інформує студентів про ключові аспекти профілактики зоонозних інфекцій у людини.

Опанування теоретичних основ мікробіології дозволяє студентам зрозуміти, що бактерії – це поліморфна група живих організмів, поєднання простоти будови та високої біологічної активності яких визначає їхню значущість. Вивчаючи екологію мікроорганізмів, молекулярні механізми їх взаємодії між собою та з макроорганізмами, освоюючи методи культивування й ідентифікації, а також лабораторні підходи до діагностики інфекційних хвороб тварин, студенти набувають знань і практичних умінь, необхідних для опанування наступних дисциплін: «Епізоотологія та інфекційні хвороби» та «Біотехнологія у ветеринарній медицині».

Автори розділів навчального посібника: Розділ 1 – Козловська Г. В., Мельник М. В.; Розділ 2 – Виговська Л. М., Мельник М. В., Ігнатовська М. В., Козловська Г. В., Дишкант О. В.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

Тема 1. МІКРОБІОЛОГІЧНІ ЛАБОРАТОРІЇ. ПРАВИЛА РОБОТИ Й ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ В МІКРОБІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета заняття: *ознайомити студентів з різновидами мікробіологічних ознайомити їх функціями, значенням в профілактиці захворювань інфекційної природи у людини і тварин, з правилами роботи в мікробіологічних лабораторіях, вимогами щодо біобезпеки та особистої гігієни при виконанні мікробіологічних досліджень.*

Матеріали та обладнання. *Світлові мікроскопи, фіксовані й пофарбовані мазки крові з бактеріями, імерсійна олія, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Мікробіологічні лабораторії (медичні, ветеринарні, фітолабораторії) – державні або приватні заклади у яких здійснюють мікробіологічні дослідження (аналізи). За напрямками мікробіологічних досліджень розрізняють діагностичні, науково-дослідні та виробничо-контрольні лабораторії.

У вищих навчальних закладах функціонують навчальні мікробіологічні лабораторії (університетські лабораторії).

Діагностичні лабораторії виконують аналізи в плані виявлення збудників захворювань інфекційної природи у медичній, ветеринарній або санітарно-епідеміологічній практиці.

Науково-дослідні лабораторії зосереджені на вивченні властивостей мікроорганізмів, розробці нових методів й засобів діагностики та профілактики захворювань інфекційної природи у людини, тварин чи рослин.

Виробничо-контрольні лабораторії контролюють мікробіологічні показники продуктів харчування, води, фармацевтичної продукції та об’єктів довкілля.

Навчальні лабораторії (зокрема студентські бактеріологічні, вірусологічні) забезпечують підготовку майбутніх фахівців, формування практичних навичок роботи з мікроорганізмами.

Організація та облаштування мікробіологічних лабораторій розпочинається ще під час їхнього проєктування. Залежно від того, з якими патогенами передбачається маніпулювати, проєктні завдання можуть відрізнятись. Йдеться, зокрема, про створення безпечних умов для працівників лабораторії та забезпечення нерозповсюдження патогенів у довкіллі.

Потенційна небезпека об’єктів мікробіологічних досліджень пов’язана, перш за все, з патогенністю їх видів і штамів, а також з потенційними шляхами їхнього розповсюдження, резистентністю до фізико-хімічних факторів, зокрема до дезінфектантів. Діяльність мікробіологічних лабораторій в Україні регламентується вимогами біологічної безпеки, які враховують потенційну небезпеку мікроорганізмів та можливі шляхи їх розповсюдження. За українською класифікацією біологічно небезпечних агентів (БПА) нині розрізняють чотири групи патогенності БПА 1, БПА 2, БПА 3 та БПА 4. Ця

класифікація регламентується Державними санітарними правилами та нормами України (ДСП 9.9.5-080-02), які встановлюють вимоги до організації мікробіологічних лабораторій та заходів біологічної безпеки залежно від групи патогенності мікроорганізмів з якими передбачаються маніпуляції.

БПА 1– мікроорганізми непатогенні, безпечні для здоров'я людини, не викликають захворювань і не потребують спеціальних умов роботи (наприклад, *Escherichia coli K-12, Bacillus subtilis*). Цій групі відповідає BSL-1 (Biosafety Level 1) за міжнародною класифікацією, яка регламентується Центром контролю та профілактики захворювань (CDC, США) та узгоджується з рекомендаціями Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) і передбачає базові правила гігієни та звичайне лабораторне обладнання.

БПА 2 – умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми з помірним ризиком для людини, здатні викликати захворювання, але при наявності ефективного лікування або профілактики (наприклад, *Salmonella spp., Staphylococcus aureus*). Міжнародний еквівалент – BSL-2, включає обмежений доступ до таких лабораторії, використання засобів індивідуального захисту, а також облаштування спеціальних біологічних кабінетів, використання ламінарних боксів.

БПА 3 – високонебезпечні патогени, здатні викликати тяжкі хвороби і передаватися повітряно-крапельним шляхом, для яких існують методи лікування або профілактики (наприклад, *Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia psittaci, Francisella tularensis)*. В Україні робота з БПА III групи регламентується суворим контролем доступу та спеціальними приміщеннями лабораторій. За міжнародною класифікацією це BSL-3, що вимагає герметичних лабораторних приміщень, спеціальної вентиляції та підготовленого персоналу.

БПА 4 – особливо небезпечні збудники, часто без ефективних засобів лікування або профілактики, що здатні спричиняти летальні інфекції. Наприклад, *Yersinia pestis,* віруси – збудники захворювань Ебола , Марбург. Для роботи з ними застосовуються надзвичайно суворі щодо біологічної безпеки вимоги, включаючи, зокрема, надійну ізоляцію їх приміщень. використання надійного обладнання, роботу персоналу лише в герметичних костюмах та ін. Міжнародний еквівалент таких лабораторій – BSL-4, стандарти якого регламентуються ВООЗ та CDC.

У студентських лабораторіях робота дозволена лише з мікроорганізмами 1 та 2 груп патогенності, що відповідає освітнім завданням і гарантує безпеку учасників навчального процесу.

Студентські мікробіологічні (бактеріологічні, вірусологічні) лабораторії є спеціалізованими навчальними підрозділами закладів вищої освіти, призначеними для проведення лабораторних занять з навчальних дисциплін мікробіологічного профілю, зокрема ветеринарної та сільськогосподарської мікробіології. Вони забезпечують формування у студентів чіткого уявлення про мікроорганізми, їх біологію і патогенність, розповсюдженість та різноманіття, а також набуття певних практичних навичок маніпулювання з ними (оволодіння

методиками виділення з різних об’єктів, культивування, ідентифікації, визначення патогенності та чутливості до різних антимікробних засобів тощо).

Організація роботи навчальних лабораторій враховує необхідність та важливість як освітнього так і безпекового аспектів. Навчальні лабораторії повинні бути оснащені сучасним обладнанням для реалізації передбачених навчальною програмою мікробіологічних досліджень (під керівництвом викладача та самостійно) за чіткого дотримання чинних нормативно-правових актів України у сфері біологічної безпеки, санітарних правил і міжнародних стандартів (зокрема рекомендаціям ВООЗ та рівням біобезпеки BSL-1 і BSL-2, дозволеним для студентських занять).

Лабораторії повинні бути спроектовані та обладнані таким чином, щоб мінімізувати ризик випадкового контакту з патогенними мікроорганізмами, запобігти їх потраплянню у навколишнє середовище, а також забезпечити ефективний контроль за дотриманням правил техніки безпеки студентами та персоналом. Кожен етап роботи, від підготовки живильних середовищ і стерилізації інструментів до обліку результатів і знешкодження відходів, повинен виконуватися відповідно до чітко регламентованих процедур.

Важливою особливістю студентських бактеріологічних лабораторій є необхідність поєднання навчального процесу з дотриманням суворих санітарно-гігієнічних та протиепідемічних вимог. Це передбачає обов’язкове проведення інструктажів з техніки безпеки, використання засобів індивідуального захисту (халати, шапочки, гумові або латексні рукавички, захисні окуляри, маски), а також постійний нагляд викладача за роботою студентів під час виконання практичних завдань.

Планування навчальних приміщень виконується з урахуванням рівнів біобезпеки BSL-1 та BSL-2, які допускають роботу з непатогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами.

Приміщення лабораторії доцільно розділити на функціональні зони:

- *чиста зона* – для підготовки поживних середовищ, стерилізації інструментів та зберігання стерильного посуду;
- *робоча зона з мікроорганізмами* – для виконання дослідів, ізоляції та ідентифікації культур;
- *зона знезараження* – для автоклавування, дезінфекції та утилізації відходів;
- *допоміжні приміщення* – комора для хімреактивів, гардероб, санвузол.

Важливими вимогами є наявність окремого входу та, за можливості, тамбура з місцем для перевдягання і зберігання верхнього одягу. Робочі столи повинні розташовуватися так, щоб забезпечувати зручний доступ до обладнання та вільне переміщення студентів.

Система вентиляції повинна гарантувати достатній повітрообмін та, у випадку роботи з BSL-2, переважний відтік повітря з робочої зони через фільтри. Стелі, стіни та підлоги мають бути виготовлені з матеріалів, стійких до вологи, дезінфікуючих розчинів і механічного очищення. Усі приміщення повинні мати належне освітлення, включно з локальним підсвічуванням робочих місць.

Оснащення. Оснащення студентської бактеріологічної лабораторії повинно відповідати профілю занять і забезпечувати виконання всіх етапів мікробіологічних досліджень – від підготовки матеріалів до аналізу результатів.

Базове обладнання:

- лабораторні столи з гладким, хімічно стійким покриттям;
- мікроскопи (світлові, за потреби – з фазово-контрастним або флуоресцентним модулем);
- термостати для інкубації мікроорганізмів;
- автоклав;
- ламінарні шафи біобезпеки класу I та II;
- центрифуги з закритими роторами;
- холодильники та морозильні камери для зберігання мікроорганізмів і реактивів.

Додаткове оснащення: мікропіпетки з наборами змінних наконечників, дезінфекційні ванни, газові або спиртові горілки, комплекти посуду (чашки Петрі, пробірки, колби тощо), контейнери для відходів.

Засоби індивідуального захисту (халати, шапочки, рукавички тощо) повинні бути в достатній кількості та зручними для використання під час занять.

Усе обладнання має регулярно проходити технічне обслуговування та калібрування, а витратні матеріали – своєчасно поповнюватися, щоб гарантувати безперервність навчального процесу та безпеку роботи.

Студенти та персонал допускаються до занять лише після проходження первинного інструктажу з техніки безпеки та біобезпеки. Інструктаж повинен охоплювати правила роботи з мікроорганізмами, порядок користування обладнанням, алгоритм дій у разі аварії та методи знезараження.

Правила техніки безпеки та поведінки у мікробіологічній лабораторії

- Під час роботи в лабораторії обов’язкове використання халата і шапочки, і за потреби, – захисних рукавичок, окулярів та маски.
- Забороняється вживати їжу та напої, зберігати особисті речі, користуватися мобільними телефонами у робочій зоні лабораторії.
- На робочому столі мають бути лише матеріали, необхідні для поточного заняття.
- Перед початком та після завершення роботи необхідно вимити руки водою з милом або антисептичним засобом.
- Заборонено торкатися руками обличчя, контактних лінз під час роботи в лабораторії.
- Піпетування ротом категорично заборонено. Використовують лише спеціальні пристрої для піпетування.
- Бактеріологічну петлю стерилізують до та після кожного використання.
- Усі маніпуляції з культурами проводяться так, щоб запобігти утворенню аерозолів та розливу матеріалу.
- Маркування культур є обов’язковим. На кожному контейнері, що підлягає інкубації, повинні бути зазначені: ініціали або прізвище студента,

назва мікроорганізму або номер зразка, дата постановки досліду. На чашках Петрі ці дані наносять на дно, а не на кришку.

- Пробірки з культурами завжди зберігають у вертикальному положенні у штативі, щоб уникнути їх падіння.
- Використані матеріали (вата, фільтрувальний папір тощо) збирають у спеціально марковані контейнери та знезаражують шляхом автоклавування або засобами дезінфекції. Забороняється викидати біологічні відходи у загальний сміттєвий контейнер.
- Після завершення заняття усі реактиви, барвники та обладнання необхідно повернути н місце їх зберігання.
- Очищення об'єктивів мікроскопа від імерсійної олії спеціальними серветками є обов'язковим після використання.
- Під час перерв та після завершення роботи необхідно вимкнути газовий пальник/ спиртівку та освітлення мікроскопа.
- Перед виходом з лабораторії необхідно переконатися, що подача газу, електроенергії та води припинена.
- Аварійні ситуації. У разі розливу інфікованого матеріалу, порізу чи опіку необхідно негайно повідомити викладача, обробити уражену ділянку дезінфікуючим розчином і, за потреби, звернутися за медичною допомогою.

МІКРОСКОПІЯ ОБ'ЄКТІВ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Мікроскопія – це метод дослідження об'єктів, розгледіти які без застосування мікроскопа неможливо. Роздільна здатність людського ока дозволяє візуалізувати об'єкти розміром 0,07–0,1 мм (70–100 мкм), тоді як розміри більшості мікроорганізмів не перевищують 10 мкм. Деякі з них, зокрема рикетсії та віруси, неможливо розгледіти навіть за допомогою світлового мікроскопа.

Світлова мікроскопія. У світлових мікроскопах для формування зображення об'єкта використовується видиме світло та оптична система. Основні типи світлових мікроскопів:

- *світловий біологічний мікроскоп* – класичний метод, об'єкт освітлюється знизу, спостерігається у прохідному світлі.
- *темнопольний мікроскоп* – світло падає на об'єкт під косим кутом, фоном є темне поле, а об'єкт виглядає світлим.
- *фазово-контрастний мікроскоп* – обумовлює зсув фаз світлових хвиль у різницю яскравості, дозволяючи досліджувати живі, нефарбовані клітини.
- *флуоресцентний мікроскоп* – використовує УФ або синє світло для збудження флуоресцентних барвників у зразку.

Світловий біологічний мікроскоп складається з механічної та оптичної частин (рис. 1.1). До механічної належать штатив, предметний столик, тубус, револьвер, а також мікро- та макрогвинти. Штатив утворений міцною нижньою частиною – ніжкою і верхньою – колонкою. Предметний столик може бути як нерухомим, так і рухомим, рухаючись у двох взаємно перпендикулярних

напрямках у горизонтальній площині. Оптична частина світлових мікроскопів включає об’єктив, окуляр і освітлювальний пристрій.

Об’єктив – це система скляних лінз, встановлених у металевому циліндрі. Передня лінза називається фронтальною, забезпечує збільшення зображення об’єкта. Інші лінзи – коригуючі – виправляють картинку, отриману через фронтальну лінзу.

Об’єктиви поділяють на сухі та імерсійні (олійні). Сухі об’єктиви працюють без проміжної рідини між об’єктивом і зразком. Вони застосовуються для збільшень від 4× до 40×. Ці об’єктиви прості у використанні та менш чутливі до пошкоджень. Зазвичай вони мають колірне маркування.

Між фронтальною лінзою імерсійного об’єктива і зразком є шар імерсійної олії. Імерсійні об’єктиви мають кращу роздільну здатність і збільшення. Однак із зростанням збільшення зростає кривизна фронтальної лінзи і зменшується «корисна площа», що знижує освітленість поля зору і робить зображення менш чітким. Покращити освітлення поля можна, мінімізувавши втрати світла між зразком і фронтальною лінзою. Це досягається створенням оптично однорідного середовища за допомогою імерсійної олії, яка має індекс заломлення близький до скла (приблизно 1,51), що зменшує втрати світла. Світловий пучок, проходячи крізь шар олії, не розсіюється й забезпечує достатню освітленість поля зору. Імерсійні об’єктиви зазвичай позначаються на корпусі об’єктива спеціальними символами або абревіатурами, які вказують на тип імерсії. Найпоширеніші позначення:

- "OIL" або "Immersion Oil" – об’єктив для олійної імерсії (масляний імерсійний об’єктив).
- "W" або "Water" – об’єктив для водяної імерсії (водний імерсійний об’єктив).
- "G" або "Gly" (іноді) – для гліцеринової імерсії.

Також часто поряд з позначенням імерсії вказується кратність збільшення (наприклад, 100×).

Окуляр складається з двох лінз, вмонтованих у металевий циліндр. Лінза, що повернута в бік дослідника, називається очною, а та, що у бік об’єктива – збираючою. Збільшуюча характеристика окулярів порівняно з об’єктивами значно менша: 8×, 10×, 20×.

Освітлювальний апарат в мікроскопі – це частина оптичної системи, яка забезпечує рівномірне і достатнє освітлення зразка для отримання чіткого та контрастного зображення. До освітлювального апарата належать джерело світла (лампа або світлодіод), конденсор, який збирає і фокусує світло на зразок, а також різні регулятори інтенсивності і напрямку світла.

Конденсор має дві скляні лінзи та ірисову діафрагму. Він концентрує промені світла на об’єкті дослідження. Опускаючи конденсор можна зменшити, а піднімаючи – збільшити освітленість поля зору мікроскопа.

Ірисова діафрагма складається з напівкруглих металевих пластин, змінюючи положення яких можна регулювати діаметр отвору для світлових променів. Світло, що виробляється лампою-джерелом, фокусується на зразку конденсорною лінзою. Світло, що дифрагується зразком, потім збирається

об’єктивом, який генерує справжнє збільшене зображення, яке додатково збільшується окуляром. Фронтальна лінза (та, що знаходиться між зразком та об’єктивом) перевертає світлові промені, щоб зображення не було «перевернутим».



Рис. 1.1. Світловий мікроскоп

Основні функціональні характеристики мікроскопа – це *збільшуюча* та *роздільна здатність*. Щоб визначити загальне збільшення мікроскопа (який складається щонайменше з двох оптичних компонентів: набору об’єктивів та окулярної системи), потрібно помножити збільшення об’єктива на збільшення окуляра. Наприклад, під час мікроскопії дослідник використав об’єктив 40× та окуляр 10×, у такому випадку зображення об’єкту дослідження збільшилось у 400 разів.

Роздільну здатність мікроскопа можна визначити як найменшу відстань, на яку можна розділити дві точки, і при цьому їх можна розрізнити як окремі об’єкти.

Існує декілька методів світлової мікроскопії. Зразки можна аналізувати за допомогою прохідного світла, відбитого світла та за допомогою стереомікроскопа, де можна спостерігати 3D-зображення. Також у мікроскопах можна використовувати різні режими візуалізації, такі як світле поле та темне поле. Світле поле – це звичайний режим у світловому мікроскопі. У прохідному світлі контрастність досягається завдяки варіаціям кольору та оптичної щільності зразка. Режим темного поля (часто використовується з відбитим світлом) усуває нерозсіяне світло, тоді фонове світло стає приблизно нульовим, контрастність підвищується.

Техніка мікроскопування. Правильне користування мікроскопом та дотримання техніки мікроскопування дозволяють отримати чітке зображення досліджуваного об'єкту.

Перед початком роботи слід переконатися, що мікроскоп встановлений на стійкій, рівній поверхні в добре освітленому приміщенні. Важливо перевірити чистоту оптичних лінз – окуляра, об'єктивів та конденсора. За необхідності їх очищення слід використовувати спеціальну серветку або м'яку тканину без ворсу, змочену у етиловому спирті або спеціальному очищувачі.

Досліджуваний зразок (мазок на предметному склі, висушений і зафіксований або інший) розміщують на предметному столику мікроскопу та закріплюють затискачами. Якщо спостерігають об'єкти в рідині (наприклад, для вивчення рухливості бактерій), краплю рідини наносять на поверхню предметного скла та обережно накривають покривним скельцем. При цьому крапля повинна бути достатньо маленькою, щоб при накладанні покривного скельця її краї не виходили за межі скла.

Освітлювальний апарат необхідно налаштувати так, щоб світло рівномірно і достатньо освітлювало зразок. Для цього регулюють положення конденсора та діафрагму, які контролюють інтенсивність і напрямок світлового потоку. Занадто яскраве або слабке освітлення може ускладнити розглядання структури об'єкта.

Спершу встановлюють об'єктив з невисоким збільшенням (зазвичай 4× або 10×). Потім, спостерігаючи за об'єктом дослідження через окуляр мікроскопу, фокусують його зображення, плавно піднімаючи або опускаючи предметний столик за допомогою макрогвинта. Коли зразок стає чітким, налаштування чіткого його зображення здійснюють користуючись мікрогвинтом.

Для детального вивчення структури об'єкту мікроскопії необхідно послідовно переходити до об'єктивів із більшим збільшенням (40×, 60×, 100×). При цьому важливо обережно змінювати об'єктив, не торкаючись об'єкту дослідження. При використанні імерсійного об'єктива (100×) потрібно нанести краплю імерсійної олії, занурити об'єктив (обережно, щоб не торкався поверхні скла) та відрегулювати якість зображення за допомогою мікрогвинта.

В процесі дослідження зразків поле (ділянку) мікроскопії можна змінювати користуючись відповідним пристосуванням у мікроскопі.

Після завершення мікроскопії штатив мікроскопа піднімають за допомогою макрогвинта на кілька сантиметрів, знімають досліджуваний зразок, повертають в сторону предметного столика об'єктив з найменшим збільшенням. Якщо в процесі дослідження використовували імерсійний об'єктив, залишки імерсійної олії видаляють користуючись спеціальною серветкою або папером для оптики, уникаючи пошкодження лінзи. Потім мікроскоп накривають пилозахисним чохлом та зберігають у відведеному для нього місці.

Дотримання правильної техніки мікроскопування забезпечує отримання чіткого та якісного зображення об'єкту, вважається обов'язковим елементом в роботі фахівців мікробіологічних лабораторій та студентів, що опановують основи мікробіології. Важливо пам'ятати про обережність, чистоту і послідов-

ність у налаштуванні мікроскопа, що забезпечить тривалу службу обладнання і комфортну роботу користувача.

Мікроскопія у темному полі зору. Мікроскопія у темному полі зору ґрунтується на використанні косого освітлення, при якому прямі промені світла від джерела не потрапляють безпосередньо в об'єктив мікроскопа. Освітлення зразка здійснюється під великим кутом за допомогою спеціального темнопольного конденсора. У поле зору об'єкти потрапляють завдяки тому, що вони розсіюють світлові промені, змінюючи їх напрямок. У результаті на темному, майже чорному фоні об'єкти виглядають як яскраві сяючі контури. Такий спосіб спостереження особливо ефективний для виявлення дуже тонких, прозорих і слабо забарвлених структур, які майже непомітні у світлому полі. Метод дозволяє проводити дослідження живих, рухливих мікроорганізмів без попереднього забарвлення та фіксації.

До переваг темнопольної мікроскопії належать: можливість спостереження дрібних і прозорих об'єктів (спірохети, джгутики, тонкі волокна, найпростіші); отримання висококонтрастного зображення без використання барвників; дослідження живих мікроорганізмів у природному стані.

Основними недоліками методу є обмежена придатність для вивчення товстих або інтенсивно забарвлених препаратів, а також висока чутливість до пилу, що може створювати хибні світлові ефекти.

Для проведення темнопольної мікроскопії запропоновані кілька різновидів темнопольних конденсорів – сухий, імерсійний та парабалоїдниий.

Сухий – застосовується з об'єктивами з числовою апертурою (ЧА) до приблизно 0,85; використовується без імерсійної рідини.

Імерсійний – призначений для роботи з об'єктивами великої апертури (ЧА до 1,2–1,4); між верхньою поверхнею конденсора та нижньою поверхнею предметного скла наноситься крапля імерсійної олії для зменшення втрат світла та підвищення яскравості зображення.

Параболоїдний або кардіоїдний – забезпечує максимальний контраст і високу яскравість, особливо ефективний при дослідженні дрібних об'єктів.

Техніка мікроскопування у темному полі. Використовується світловий мікроскоп, обладнаний темнопольним конденсором (сухим або імерсійним). Об'єктив обирають залежно від розміру досліджуваного об'єкту (зазвичай 40×(сухий) або 100× (імерсійний). При використанні *імерсійного конденсора* між його верхньою лінзою та предметним скельцем з досліджуваним зразком, наносять краплю імерсійної олії. Діафрагма у темнопольному конденсорі повинна бути повністю відкритою, а центральна частина світлового потоку – заблокованою спеціальним диском.

Важливо пам'ятати, що цей метод «чутливий» щодо забруднень скла, наявності пухирців повітря (бульбашок) в імерсійній рідині.

Препарат для темнопольної мікроскопії готують у вигляді тонкого шару (мазка) або наносять краплю досліджуваного матеріалу на предметне скло та накривають її покривним скельцем. і під покривним скельцем. В останньому випадку слід уникати надлишку рідини, щоб запобігти «розпливанню» зображення.

Для налаштування зображення предметний столик опускають, кладуть та закріплюють препарат, встановлюють об’єктив малого збільшення. Спостерігаючи через окуляр, повільно піднімають столик, поки зображення не стане чітким. Потім переходять на потрібний об’єктив більшого збільшення. Прямі світлові промені не потрапляють у об’єктив завдяки спеціальній конструкції конденсора, тому у полі зору фон залишається темним, а об’єкти розсіюють світло і виглядають яскравими.

Фазово-контрастна мікроскопія. Фазово-контрастна мікроскопія – це метод світлової мікроскопії, що дозволяє аналізувати прозорі, непофарбовані й слабко забарвлені об’єкти. Основою методу є перетворення (зсувів фаз) світлових хвиль, що проходять через об’єкт.

Метод дозволяє спостерігати живі клітини, мікроорганізми. Широко використовується в мікробіології, клітинній біології, цитології для вивчення процесів поділу клітин, руху організмів, дослідження культур клітин.

Метод був розроблений у 1932 році голландським фізиком Фріцем Церніке, за що у 1953 році він отримав Нобелівську премію з фізики. Церніке помітив, що при спостереженні прозорих біологічних об’єктів більшість світла проходить крізь них без значних змін інтенсивності, але з невеликим зсувом фази. Цей зсув фази недоступний для людського ока без спеціальної оптичної обробки. Впровадження фазового контрасту забезпечило можливість дослідження живих клітин у природному стані, без фіксації та забарвлення.

Коли світло проходить через об’єкт, ділянки з різною товщиною або показником заломлення змінюють фазу світлових хвиль. Це дає змогу спостерігати контрасти, навіть якщо об’єкт прозорий. У фазово-контрастному мікроскопі використовується спеціальна оптична система: *кільцевий діафрагмовий конденсор* формує порожнистий конус світла, а в об’єктиві розташований *фазовий кільцевий пластинчастий елемент* (фазова пластинка). Він зсуває фазу прямого світла на 1/4 довжини хвилі та зменшує його інтенсивність. Інтерференція прямого та дифрагованого світла перетворює фазові різниці на зміни яскравості, утворюючи контрастне зображення (рис. 1.2).

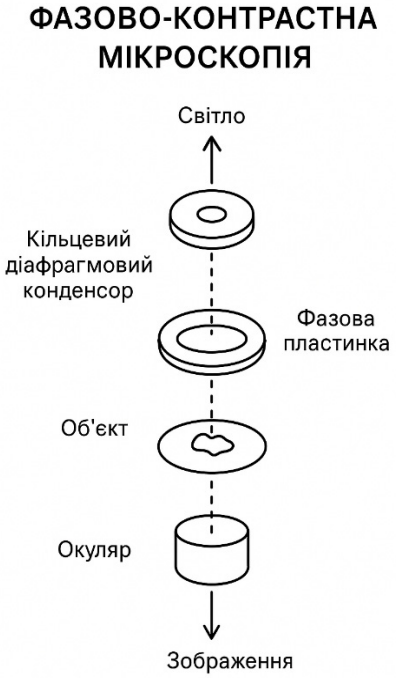


Рис. 1.2. Фазово-контрастна мікроскопія

Техніка виконання фазово-контрастної мікроскопії. Під час проведення фазово-контрастної мікроскопії необхідно дотримуватись послідовності підготовки та роботи з мікроскопом. Спершу проводять підготовку обладнання: встановлюють фазово-контрастний конденсор та об’єктив, оснащений фазовою

пластинкою. Далі здійснюють встановлення об'єкта дослідження, розміщуючи препарат на предметному столику. Для цього можна використовувати як забарвлені, так і незабарвлені зразки, зокрема живі клітини у краплі культури.

Наступним етапом є вирівнювання оптичної системи. Кільцеву діафрагму конденсора налаштовують таким чином, щоб її зображення точно збігалося з фазовим кільцем в об'єктиві.

Після цього здійснюють фокусування, регулюючи положення тубуса або предметного столика для отримання чіткого зображення. За необхідності коригують освітлення, щоб досягти оптимального контрасту та деталізації зображення.

На завершальному етапі переходять до безпосереднього спостереження та документування результатів. За потреби зображення фіксують за допомогою фотокамери або підключеної відеосистеми, що дозволяє зберегти матеріал для подальшого аналізу.

Люмінесцентна мікроскопія. Люмінесцентна мікроскопія – це метод дослідження, який дозволяє виявляти та вивчати об'єкти завдяки їх здатності випромінювати світло (люмінесценцію) за дії зовнішнього збудження, зазвичай ультрафіолетовим або синім світлом. Інакше кажучи прилад освітлює препарат світлом певного діапазону хвиль, а зображення його формується в іншому– і саме ця «зміна кольору» дає змогу помітити те, що лишається непомітним у звичайному світловому мікроскопі.

Люмінесцентний мікроскоп у його класичному вигляді був створений у 1911 році німецьким вченим Августом Кьолером у співпраці з Генріхом Шоттом у фірмі Carl Zeiss. У біології та медицині цей метод використовують давно, але його справжній прорив відбувся після винайдення спеціальних *флуорохромів* – речовин, які вибірково зв'язуються з певними структурами клітин, які за впливу променів світла флуоресціюють з різними відтінками. Наприклад, можна пофарбувати ядра одним барвником, а цитоплазму – іншим, і тоді навіть під слабким збільшенням видно їхні межі з неймовірною чіткістю. Один із характерних прикладів використання люмінесцентної мікроскопії у ветеринарній мікробіології – виявлення мікобактерій туберкульозу у тварин. У цьому випадку застосовують метод люмінесцентного фарбування (наприклад, за Цілем–Нільсеном у модифікації з флуорохромами).

Принцип роботи люмінесцентного мікроскопа полягає у вибірковій фільтрації світла. Усередині оптичної системи є два ключові фільтри: *збуджувальний фільтр*, який пропускає лише потрібну довжину хвилі для збудження люмінесценції, та *бар'єрний фільтр*, який відсікає збуджувальне світло, пропускаючи лише світло, випромінене об'єктом. Завдяки цьому спостерігаються яскраве світіння на темному фоні (рис. 1.3).

Техніка виконання люмінесцентної мікроскопії.

Методика флуорохромування бактерій полягає у наступному. Спочатку готують мазок із бульйонної або агарової культури мікроорганізму. Фіксують його висушуванням на повітрі або наносять суміш етилового спирту з ефіром та витримують протягом 10–15 хвилин. На препарат наносять розчин

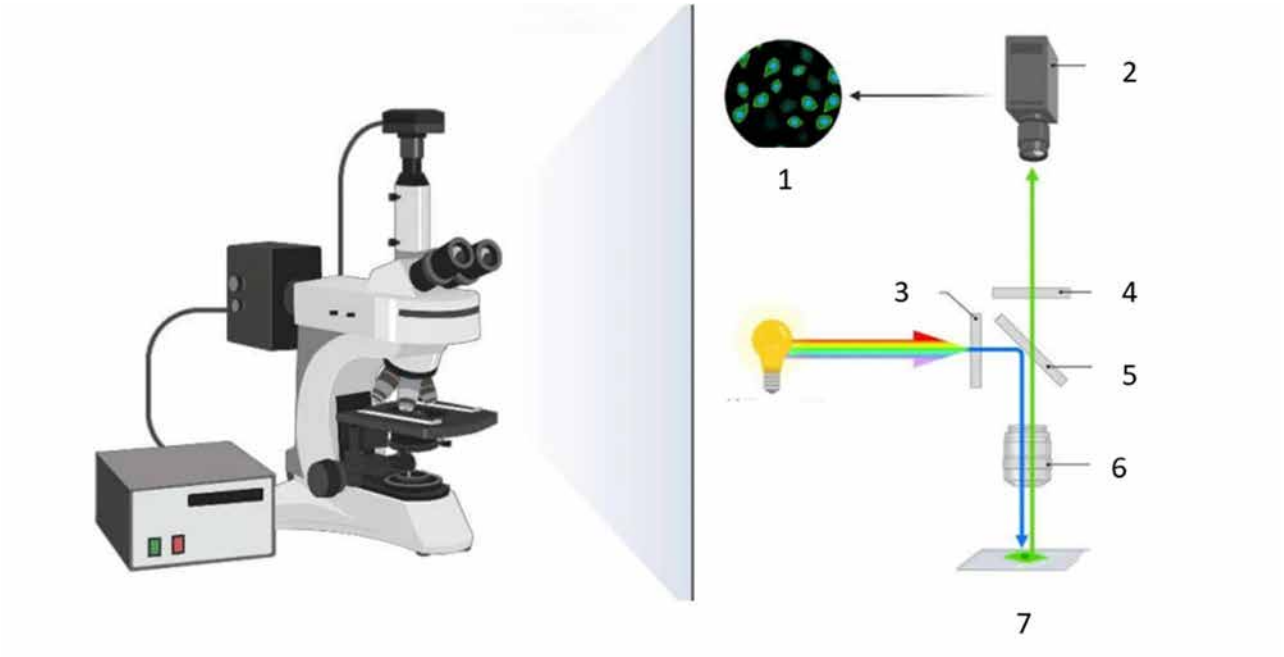


Рис. 1.3. Люмінесцентний мікроскоп і принцип його роботи:
1 – готове зображення; 2 – окуляр; 3 – збуджувальний фільтр; 4 - бар'єрний фільтр; 5 – дихроїчне дзеркало; 6 – об'єктив; 7 – дослідний зразок.

флуорохрому, наприклад акридинового оранжевого у розведенні 1:10 000, і витримують 1–5 хвилин. Далі залишки розчину флуорохрому зливають, препарат промивають дистильованою водою та висушують фільтрувальним папером. Заключним етапом є дослідження під люмінесцентним мікроскопом.

Правила роботи з люмінесцентним мікроскопом включають кілька важливих аспектів безпеки та правильної експлуатації. Робоче місце обладнують у затемненому приміщенні: мікроскоп розташовують на стійкому столі, подалі від джерел вібрації, дотримуючись інструктивних положень виробника приладу.

Слід уникати дії ультрафіолетового випромінювання (користуватися спеціальними окулярами, не роздивлятись джерело (потік) ультрафіолетових променів та ін.

Після встановлення досліджуваного зразка спочатку розглядають об'єкт при малому збільшенні, потім переходять до більшого; плавно регулюють фокусування.

Після завершення роботи мікроскоп від'єднують від електромережі, оптичні елементи закривають кришкою або чохлом; відповідно до інструкції виробника регулярно здійснюють технічне обслуговування приладу.

Електронна мікроскопія. Електронна мікроскопія – це метод дослідження структури об'єктів на дуже малих масштабах (ультраструктури) за допомогою електронного пучка замість світла. На відміну від світлової мікроскопії, електронний мікроскоп використовує електрони, які мають значно коротшу довжину хвилі, що дозволяє отримувати зображення з надзвичайно високою роздільною здатністю. Завдяки цьому можна спостерігати внутрішню будову клітин, органели, бактерії, віруси та навіть окремі молекули.

Історія електронної мікроскопії розпочалась в 1931 році, коли німецькі вчені Ернст Руска та Макс Кнол створили перший електронний мікроскоп. Ернст Руска пізніше отримав Нобелівську премію за свій внесок у розвиток цього методу. Відтоді електронна мікроскопія стала невід'ємною частиною науки, зокрема в біології, матеріалознавстві та нанотехнологіях.

Існує кілька основних видів електронних мікроскопів. *Трансмісійний електронний мікроскоп* (ТЕМ) забезпечує проходження електронів через надтонкі зрізи об'єкта та відтворює детальне зображення внутрішньої структури об'єкта мікроскопії (клітин, тканин тощо). *Сканувальний електронний мікроскоп* (СЕМ) «досліджує» поверхню об'єкта за допомогою електронного пучка, який сканує зразок, утворюючи тривимірне зображення з високою деталізацією рельєфу. Крім того, існують *пробивні* та *сканувально-пробивні мікроскопи*, а також спеціалізовані модифікації для аналізу хімічного складу та кристалічної структури матеріалів.

Електронний мікроскоп складається з кількох основних частин, які забезпечують формування та контроль електронного пучка, взаємодію його з об'єктом і реєстрацію зображення. До механічної та оптичної систем належать: електронна гармата (генерує пучок електронів); конденсорні лінзи (фокусують пучок на зразок); об'єктивна лінза (формує проміжне зображення); сканувальні системи (у СЕМ) або апаратура для пропускання електронів через зразок (у ТЕМ); детектори, що фіксують електрони і перетворюють їх у видиме зображення на екрані чи камері. Корпус (колона) електронних мікроскопів вакуумовані, оскільки електрони не здатні рухатися у повітрі без значних розсіювань (рис. 1.4).

Трансмісійні електронні мікроскопи (ТЕМ) забезпечують збільшення від 50 000 до 2 000 000 разів і дозволяють спостерігати внутрішню ультраструктуру клітин, органел, бактерій і вірусів.

Сканувальні електронні мікроскопи (СЕМ) зазвичай мають менше збільшення – до 500 000 разів, проте відтворюють об'ємне, тривимірне зображення поверхні об'єкта з високим показником різкості.

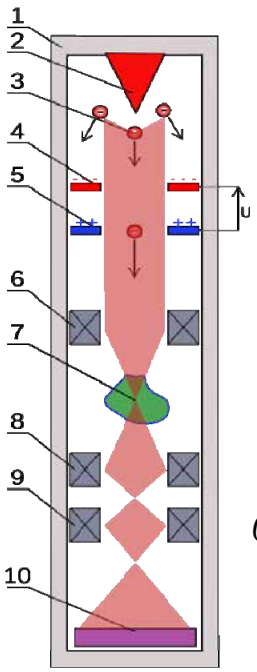


Рис. 1.4. Схематична будова електронного мікроскопа: 1 – колона; 2 – джерело електронів; 3 – електрони;4 – катод; 5 – анод; 6 – оптична лінза; 7 – зразок; 8 - дифракційний об'єктив; 9 – проекційний об'єктив; 10 – детектор.
(Джерело:https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/03/Electron_microscope.svg/375px-Electron_microscope.svg.png)

Таблиця 1.1. Порівняння основних типів мікроскопії

Метод мікроскопії	Джерело випромінювання	Роздільна здатність	Максимальна збільшувальна здатність	Об'єкти дослідження / Застосування
Світлова мікроскопія	Видиме світло	~200 нм	1000–1500×	Морфологія бактерій і грибів, підрахунок клітин
Люмінесцентна мікроскопія	УФ або видиме світло	~200 нм	1000–1500×	Виявлення флуоресцентно мічених мікроорганізмів, локалізація білків і нуклеїнових кислот
Темнопольна мікроскопія	Видиме світло	~200 нм	1000–1500×	Спостереження живих бактерій і їх руху без забарвлення
Контрастна (фазово-контрастна)	Видиме світло	~200 нм	1000–1500×	Детальне вивчення живих клітин, внутрішньоклітинні структури
Електронна (TEM)	Електронний пучок	0,1–0,2 нм	2 000 000×	Ультраструктура бактерій, вірусів, органел
Електронна (CEM)	Електронний пучок	1–10 нм	500 000×	Поверхня клітин, морфологія мікроорганізмів
Сканувальна зондова (AFM, STM)	Контактний зонд	<1 нм	1 000 000× (еквівалент)	Морфологія поверхні клітин, наноструктури, біоплівки
Конфокальна лазерна скануальна (CLSM)	Лазерне світло	~200 нм	1000–2000×	3D-моделі біоплівок, внутрішньоклітинне розташування білків
Суперроздільна флуоресцентна (STED, PALM, STORM)	Лазерне світло	20–50 нм	1000–2000×	Субклітинні структури, ультра малі елементи бактерій і вірусів
Двохфотонна мікроскопія	Інфрачервоне лазерне світло	~500 нм	1000–2000×	Дослідження живих тканин, глибокі шари
Голографічна мікроскопія	Лазерне світло	~1–2 μм	100–1000×	Безконтактне спостереження росту та поведінки мікроорганізмів, 3D-візуалізація

У сучасній мікробіології електронний мікроскоп широко використовується для дослідження морфології та ультраструктури бактерій, вірусів та грибів, вивчення органел клітин, взаємодії патогенів із клітинами-господарями, а також для оцінки ефективності антимікробних препаратів на клітинному рівні. Наприклад, за допомогою ТЕМ можна спостерігати внутрішню будову бактерії або вірусу, а СЕМ – деталі поверхневих структур, таких як ворсинки або капсули.

Сучасна мікроскопія також включає низку методів, які дозволяють досліджувати об’єкти на нанометровому рівні або отримувати тривимірні їх зображення з високою роздільною здатністю.

Сканувальна зондова мікроскопія використовує тонкий зонд, що рухається над поверхнею зразка, для побудови зображень на атомарному рівні. До основних її видів належать *атомно-силовий мікроскоп (АСМ)*, який вимірює сили взаємодії між зондом і поверхнею, та *сканувальний тунельний мікроскоп (СТМ)*, що фіксує тунельний струм між зондом і провідною поверхнею. Ці методи дозволяють досліджувати структуру матеріалів, окремі молекули та наночастинки з винятковою точністю.

Ще одним сучасним підходом є *конфокальна лазерна сканувальна мікроскопія*, яка дозволяє отримувати оптичні зрізи зразка на різних глибинах і будувати тривимірні моделі. Серед інших методів виділяють *суперроздільну флуоресцентну мікроскопію (STED, PALM, STORM)*, що перевищує дифракційну межу світла до 20–50 нм, *двохфотонну мікроскопію*, яка дає змогу досліджувати живі тканини на великій глибині, та *голографічну мікроскопію*, яка створює тривимірні зображення без механічного сканування. Ці технології значно розширюють можливості сучасної мікробіології та матеріалознавства.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Здійснити мікроскопічне дослідження готових мікропрепаратів використовуючи імерсійну систему та нарисувати мікроскопічну картину в робочому зошиті. Студенти розписуються у журналі щодо ознайомлення з правилами роботи та біобезпеки у мікробіологічній лабораторії.*



Питання для самоконтролю

1. *Мікробіологічні лабораторії, їх різновиди та функції; значення лабораторій в діагностиці й профілактиці захворювань людини і тварин.*
2. *Назвіть основні вимоги до облаштування мікробіологічних лабораторій за різним рівнем біобезпеки.*
3. *Правила роботи в мікробіологічних лабораторіях.*
4. *Світлові мікроскопи (різновиди та конструктивні їх особливості).*
5. *Принцип роботи електронного мікроскопу.*

Тема 2. МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ

Мета заняття: *ознайомити студентів з ультраструктурою мікробних клітин та основними морфологічними формами мікроорганізмів.*

Матеріали та обладнання. *Світлові мікроскопи, пофарбовані препарати (мазки), зроблені з різних за формою мікроорганізмів (бактерій і бацил, коків, спірил і спірохет тощо), імерсійна олія, контейнери для знезараження використаних матеріалів.*

Бактерії – це одноклітинні мікроорганізми прокаріотичного типу. На відміну від еукаріот вони не мають оформленого ядра, а містять нуклеоїд – єдину молекулу ДНК кільцевої форми. У бактерій відсутні також і мембранні структури – мітохондрії, апарат Гольджі та ін. Єдиними органелами у них є рибосоми. Не дивлячись на значно простішу, у порівнянні з еукаріотами, будову, бактерії здатні адаптуватись до різних умов довкілля, проникати, виживати й репродукуватись в організмі еукаріот.

Вперше бактерії спостерігав за допомогою світлового мікроскопа голландський натураліст Антоні ван Левенгук (1632–1723) у XVII столітті, та описав їх як «маленькі тваринки». Термін «бактерія» запропонував у 1828 році німецький природознавець Крістіан Готфрід Еренберг. Пізніше було встановлено різноманітність морфологічних форм бактерій.

Бактерії поділяють за формою на кілька основних груп: коки, паличкоподібні, звивисті (рис. 1.5).

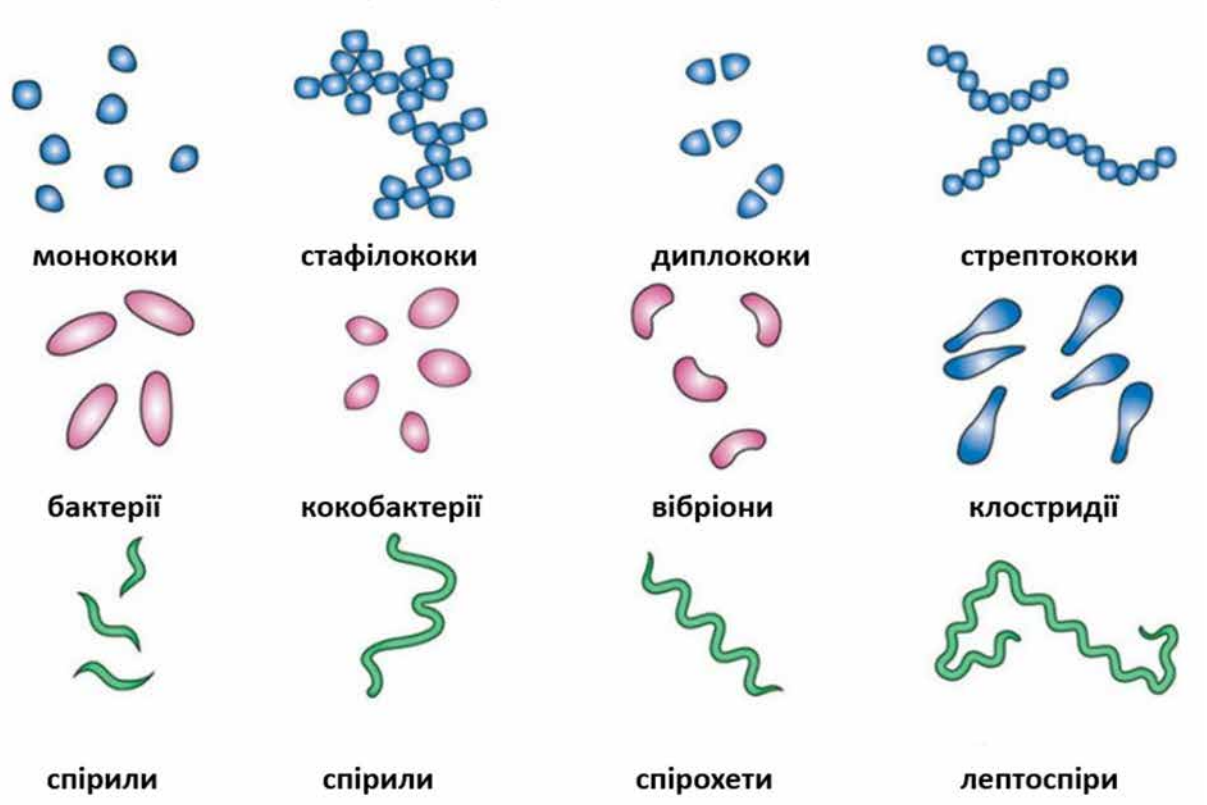


Рис. 1.5. Форми бактерій

Коки (coccus, від грец. *kokkus* – зерно) – бактерії округлої або сферичної форми. Вони можуть зустрічатися поодинці – *монококи*, утворювати пари – *диплококи*, ланцюжки – *стрептококи*, скупчення гроноподібні – *стафілококи*, або утворювати кубоподібні структури – *сарцини*. Діаметр коків – близько 1 мкм. Їх організація у своєрідні морфологічні групи пов'язана перш за все з характером поділу клітин в процесі розмноження. Коки зазвичай джгутиків не утворюють, переважна більшість нерухливі. Серед численних видів коків існують як сапрофіти так і корисні та патогенні види. У тварин стафілококи (зокрема *Staphylococcus aureus*) можуть викликати мастити, утворення абсцесів тощо; стрептококи (зокрема *Streptococcus agalactiae* та *Streptococcus equi*) – запалення молочної залози, органів дихання; диплококи (зокрема *Diplococcus septicus*) – диплококову інфекцію – гостре інфекційного захворювання, що вражає переважно молодняк сільськогосподарських тварин (телят, поросят і ін.) та характеризується запаленням легень, кишечнику, суглобів і ін.

Паличкоподібні бактерії (грец. βακτήριον – паличка) – це мікроорганізми у вигляді паличок різної довжини й товщини, прямої або злегка зігнутої форми. Останні, залежно від виду бактерій, можуть розташовуватися поодинці, утворювати пари, ланцюжки або компактні групи (скупчення).

Деякі паличкоподібні бактерії утворюють спори, їх називають *бацилами*. Спори – надзвичайно стійка структурна форма мікробної клітини. Вони здатні витримувати високі температури, висушування, надзвичайно резистентні до дезінфікуючих засобів, тривалий час не гинуть через відсутність поживних речовин. Так, спори *Bacillus anthracis* – збудника сибірки *(Anthrax)* можуть зберігатися в ґрунті роками. Переважна більшість збудників бактеріозів у людини паличкоподібні.

До ***звивистих бактерій*** належать вібріони, спірили та спірохети.

Вібріони (від лат. *vibrio* – згинаюсь) мають форму коми або зігнутої палички і зазвичай оснащені джгутиками, надзвичайно рухливі у водному середовищі (наприклад, *Campylobacter fetus* викликає у великої рогатої худоби та овець аборти, у людини, на фоні імунодефіцитів, обумовлює опортуністичні інфекції (менінгіт, тромбофлебіт, абсцеси в органах і тканинах, мертвонародження та аборти у вагітних жінок та ін.).

Спірили (від лат. *spira* – завиток) – це бактерії спіралеподібної форми, відносно товсті і жорсткі, мають по 2–3 завитки. Їхній рух здійснюється за допомогою джгутиків, які розташовані зазвичай на кінцях клітини (наприклад, *Spirillum minus* – збудник содоку – інфекційної хвороби, що уражає людину і тварин, передається через укуси гризунів (щурів) та характеризується гарячкою, запаленням лімфатичних вузлів, висипами на шкірі).

Спірохети – тонкі, довгі, гнучкі бактерії спіралеподібної форми, мають більше 10 завитків. Рухаються за допомогою характерного «штопороподібного» обертання (наприклад, *Leptospira spp.* викликають тяжкі захворювання у людини і тварин, що характеризуються гарячкою, ураженням внутрішніх органів, крововиливами на шкірі, абортами та ін.).

Інколи виявлять бактерії іншої («*неправильної*», *«спотвореної») не характерної для виду форми чи розміру*. Поява нетипових морфологічних ознак

у мікроорганізмів (плеоморфізм, інволюція) зазвичай є реакцією на стрес або зміну середовища, зокрема на різке підвищення, або ж, навпаки, – зниження температури середовища, коливання його pH, а також дія радіації, високого тиску чи антимікробних речовин тощо. Поява нетипових форм може бути пов'язана також з віком мікробної культури.

Набуті нетипові видові ознаки можуть передаватись спадково (генотипова мінливість), або ж бути тимчасовими (фенотипова мінливість).

В основі механізмів генетично детермінованих змін у морфології бактерій – мутації та рекомбінації, що можуть призвести до утворення сферопластів, L-форм тощо).

Морфологічні особливості мікоплазм. Мікоплазми – це група прокаріотичних мікроорганізмів класу *Mollicutes*. Вони відрізняються від більшості бактерій відсутністю типової для переважної більшості мікроорганізмів жорсткої зовнішньої оболонки. Їх цитоплазма оточена лише збагаченою стеролами цитоплазматичною мембраною.

За розмірами мікоплазми наближаються до розміру крупних вірусів – 0,2–0,8 мкм.

Мікоплазми не мають сталої форми клітини – вони можуть бути кулястими, грушоподібними, ниткоподібними або амебоподібними. Деякі види формують розгалужені нитки або невеликі колоніальні агрегати.

Відсутність клітинної стінки зумовлює стійкість мікоплазм до антибіотиків, що діють на синтез пептидоглікану (наприклад, пеніциліну), проте вони чутливі до препаратів, що порушують синтез білка або функції мембрани (тетрациклін та ін.). Серед відомих понад 100 видів мікоплазм, близько десяти – збудники захворювань – мікоплазмозів у людини і тварин. Характеризуються вони ураженням дихальних шляхів, урогенітального тракту та ін. Зокрема *Mycoplasma bovis* викликає захворювання у великої рогатої худоби, *Mycoplasma hyopneumoniae* – ензоотичну пневмонію у свиней, *Mycoplasma gallisepticum* – хронічне респіраторне захворювання у курей і синусит у індиків.

Морфологічні особливості рикетсій. Рикетсії – це дрібні облігатні внутрішньоклітинні мікроорганізми. Їхні розміри коливаються від 0,3–0,5 мкм у ширину до 0,8–2 мкм у довжину, тому виявити їх вдається лише за допомогою електронного мікроскопа або ж після спеціального фарбування у світловому мікроскопі. Розмножуються рикетсії в цитоплазмі клітин.

Рикетсії у більшості випадків мають вигляд коротких паличок, зрідка коко- або ниткоподібні; мають характерну для грамнегативних бактерій клітинну стінку, що містить пептидоглікан, та оточені зовнішньою мембраною ліпополісахаридної природи. Джгутики у рикетсій відсутні тож вони нерухомі, хоча деякі їх види здатні переміщатись усередині клітини господаря за допомогою актинових філаментів.

Передаються рикетсії переважно через членистоногих – кліщів, вошей, бліх, які одночасно є і переносниками, і резервуаром інфекції. Серед відомих збудників у тварин можна назвати *Rickettsia rickettsii* (гарячка Скелястих гір у собак), *Rickettsia felis* (котячий рикетсіоз), *Rickettsia conorii* (середземноморська плямиста гарячка у собак та інших ссавців).

Морфологічні особливості хламідій. Хламідії – це дрібні облігатні внутрішньоклітинні паразити, які за своїм розвитком і властивостями поєднують риси як бактерій, так і вірусів. Вони здатні синтезувати власні білки, але повністю залежать від енергетичних ресурсів клітини господаря.

Розміри хламідій коливаються від 0,2–0,4 мкм у діаметрі, через що вільні інфекційні форми – елементарні тільця – зазвичай невидимі у світловий мікроскоп без спеціального фарбування. Вони мають сферичну або овальну форму та грамнегативну будову клітинної стінки. Хламідії нерухомі.

Хламідії існують у двох морфологічних формах:

- *Елементарне тільце* – дрібна щільна форма, яка є стійкою в зовнішньому середовищі та відповідає за зараження нових клітин.
- *Ретикулярне тільце* – більша метаболічно активна форма, яка розмножується всередині клітини господаря шляхом бінарного поділу.

Життєвий цикл хламідій відбувається у дві стадії: елементарні тільця проникають у клітину, перетворюються на ретикулярні, розмножуються, а потім знову утворюють елементарні тільця, які виходять назовні, руйнуючи клітину.

Хламідії – єдиний ряд типу *Chlamydiae*, всі представники якого є облігатними внутрішньоклітинними паразитами еукаріотичних клітин. Переважна більшість відомих видів уражає ссавців і птахів, проте окремі різновиди виявлено також у інших господарях, зокрема в амебах. Хламідії можуть уражати епітелій дихальних шляхів, кон'юнктиву, статеві органи, а також внутрішні органи.

Більш детально морфологія мікоплазм, рикетсій і хламідій охарактеризована у розділі 2.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти мікроскопують готові мікропрепарати бактерій і зарисовують різні форми бактерій в робочому зошиті.*



Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення поняття «бактерія».
2. Назвіть основні морфологічні групи бактерій.
3. Чим відрізняються бактерії від бацил?
5. Назвіть морфологічні особливості мікоплазм, рикетсій і хламідій?

Тема 3. МЕТОДИ ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ ЗА МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мета заняття: *ознайомити студентів з методикою приготування препаратів (мазків) для мікроскопічного дослідження мікроорганізмів та з простим й складними методами їх забарвлення.*

Лабораторне заняття 1.
МЕТОДИКА ПРИГОТУВАННЯ МАЗКІВ ТА ПРОСТИЙ МЕТОД ЇХ ФАРБУВАННЯ

Мета заняття: *ознайомити студентів з методикою приготування мазків в процесі мікробіологічних досліджень та з простим методом їх фарбування.*

Матеріали та обладнання*. Матеріал для виготовлення мазків (бульйонна і агарова мікробна культура (сапрофіт), суспензія бактерій, пофарбовані простим методом препарати (мазки та мазки-відбитки), світлові мікроскопи, спиртівки, бактеріологічні петлі, пінцети, предметні скельця, зливні чаші (обладнані пристосуванням для розміщення предметних скелець), фарба для забарвлення мікроорганізмів простим методом, маркери, фільтрувальний папір, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Призначені для виготовлення мазків предметні скельця повинні бути чистими та знежиреними. В лабораторіях їх готують завчасно, зберігають в спеціальних герметичних контейнерах та використовують протягом 7–9 діб.

Раніше з метою тривалого (протягом кількох місяців) зберігання підготовлених предметних скелець широко використовували суміш етилового спирту та ефіру (рідина Нікіфорова). Нині цю методику (в лабораторіях, доступних для аналізу методології проведення мікробіологічних досліджень) не практикують.

Інструменти: пінцети, скальпелі, ножиці, пастерівські піпетки, повинні бути чистими, знежиреними та стерильними. Деякі з них, зокрема бактеріологічну петлю, стерилізує (методом фламбування) фахівець перед використанням, в процесі маніпуляцій та після їх завершення.

Використання бактеріологічної петлі під час мікробіологічних досліджень вимагає чіткого дотримання апробованої протягом тривалого часу техніки, надзвичайно важливої для отримання достовірних результатів досліджень та біобезпеки.

Техніка фламбування бактеріологічної петлі.

1. Бактеріологічну петлю беруть у праву/ліву руку за ручку, тримаючи її під кутом приблизно 45°, повільно проводять через верхню частину полум’я, де температура найвища, починаючи від робочої частини петлі та поступово переходячи до стрижня. Важливо прогрівати всю металеву частину, але не надто довго тримати в одному місці, щоб уникнути перегріву та

пошкодження інструмента. Робочу частину петлі розжарюють до яскравого червоного кольору.

2. Після фламбування петлю потрібно охолодити кілька секунд, тримаючи її в повітрі або занурivши у стерильний фізіологічний розчин чи стерильний агар (якщо методика допускає). Це важливо, щоб при дотику до культури гарячий метал не зруйнував мікробні клітини. Після роботи з мікроорганізмами та перед відкладанням інструмента його обов'язково знову фламбують, щоб знищити залишки мікробної культури.

Цей метод – один із базових навичок у мікробіології, і правильне його виконання є запорукою отримання достовірних результатів в процесі виявлення чи вивчення мікроорганізмів.

Техніка приготування мазків. В процесі мікробіологічних досліджень (діагностичних, наукових) важливим етапом є візуалізація мікроорганізмів. Для реалізації її необхідно, перш за все, приготувати препарат (залежно від характеру досліджень – «мазок», «мазок-відбиток», препарати «роздавлена крапля» чи «висяча крапля»).

В лабораторіях ветеринарної медицини за проведення бактеріологічних досліджень частіше всього готують мазки та мазки-відбитки. Виготовлення препаратів здійснюють фахівці, які володіють бактеріологічною технікою, обізнані з правилами асептики й антисептики та біологічної безпеки. Виготовлення препаратів та їх дослідження відбувається в спеціально визначеній кімнаті, добре освітленій, належним чином підготовленій (опроміненій бактерицидною лампою згідно з інструкцією її використання, провітреній тощо).

Приготування препаратів фахівець здійснює сидячи за лабораторним столом, оснащеним необхідними інструментами й матеріалами та зручно розміщеними для використання. За підозри відомої чи ймовірної контамінації досліджуваного матеріалу збудником зоонозної (або антропозоонозної) інфекції фахівець, окрім халату, шапочки та зміни взуття, одягає захисні окуляри та, скориставшись медичною маскою, захищає органи дихання, одягає гумові рукавички; перед початком маніпуляцій аналізує якість проведених підготовчих робіт (звертає увагу на наявність необхідних приладів, інструментів, реактивів тощо), дотримуючись правил протипожежної безпеки запалює спиртівку/газовий пальник. Визначений для бактеріологічного аналізу матеріал (зразок) розпаковує та розпочинає виготовлення препарату.

Отримання мазків з бульйонної культури. У бульйонній культурі концентрація мікроорганізмів зазвичай висока. Простерилізовану бактеріологічну петлю, дотримуючись правил асептики, занурюють у бульйон із мікроорганізмами, після чого невелику кількість культури переносять на підготовлене предметне скло. Круговими рухами рівномірно розподіляють суспензію в центральній частині поверхні скла (не доходячи до його країв) і висушують мазок на повітрі (рис 1.6).

Отримання мазків з агарових культур. У разі приготування мазків з мікроорганізмів, що виросли на щільному середовищі, спочатку на предметне скло наносять краплю стерильного фізіологічного розчину. Потім стерильною петлею або голкою відбирають з колонії невелику кількість бактеріальної маси,

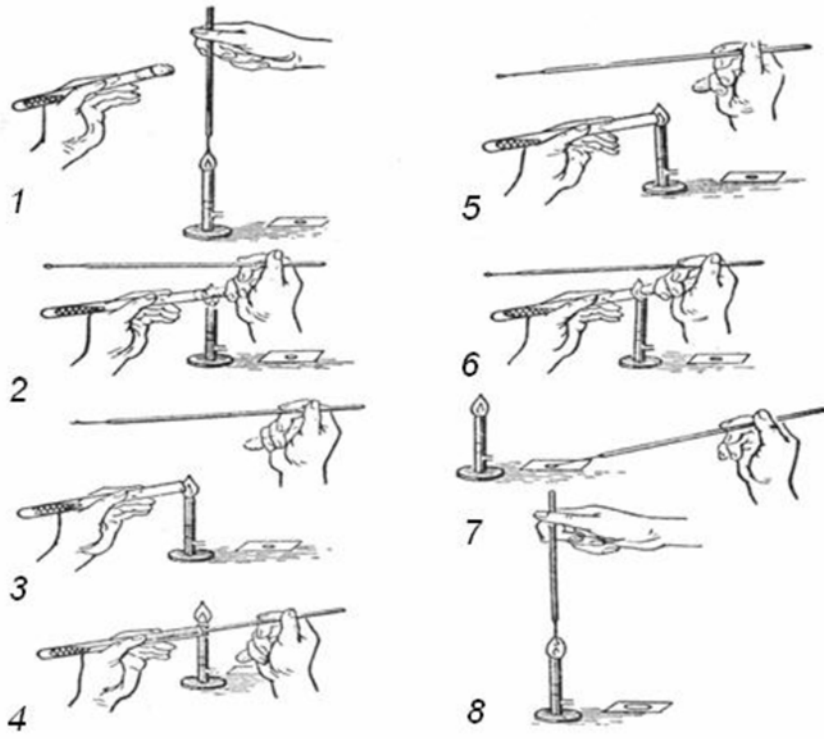


Рис. 1.6. Етапи (1 – 8) послідовності відбору бактеріальної культури та виготовлення мікроскопічного препарату

(Джерело:https://studfile.net/html/2706/1083/html_Z85m8JFJUb.7qqD/htmlconvd-H1IB0921x1.jpg)

ретельно розмішують у краплі рідини та отриману суспензію розподіляють тонким шаром на поверхні предметного скла. Висушують мазок на повітрі.

Мазки-відбитки (відомі також як «клятч-препарати») широко використовують за постмортальної діагностики захворювань у тварин. Матеріли відбирають зазвичай досвідчені фахівці ветеринарної медицини, орієнтуючись на анамнестичні дані, результати клініко-епізоотологічного аналізу та патологоанатомічного розтину тварини, що загинула. Це можуть бути різні органи і тканини, вміст кишківника, гнійні маси абсцесів та ін. Інколи доставляють трупи дрібних тварин та здійснюють розтин (патологоанатомічне дослідження) і відбирають матеріал для дослідження в умовах лабораторії.

Мазки-відбитки готують з органів і тканин, що мають ознаки ураження (зміна кольору, набряк, крововиливи тощо). За відсутності явних ознак ураження їх готують з печінки, селезінки, лімфатичних вузлів та ін. (враховуючи анамнез і клініко-епізоотологічний аналіз представлений фахівцем, ветеринарної медицини, який обслуговує тваринницьке господарство, населений пункт тощо).

Техніка приготування препаратів-відбитків нескладна. Відібраний зразок за допомогою пінцета легенько притискають до скла кілька разів (отримують 3–5 його «відбитків», розташованих по одній лінії на поверхні предметного скла), а далі маніпулюють як і під час приготування препаратів-мазків: висушують, фіксують та фарбують.

За мікроскопії препаратів-відбитків вдається не лише виявляти збудника захворювання, а й їх концентрацію та розташування його відносно клітин, зокрема фагоцитів тощо; спостерігати ймовірні зміни в тканині тварини, що загинула.

Фіксація мазків. Фіксація – процес закріплення досліджуваного матеріалу на поверхні предметного скла, сприяє збереженню структури мікроорганізмів за подальших маніпуляцій, сприяє якісному їх пофарбуванню.

Існують два основні способи фіксації термічна і хімічна. *Термічна фіксація* – предметне скло (мазком догори) кілька разів проводять через полум'я пальника. Надмірне нагрівання неприпустиме, може призвести до спотворення морфології.

Хімічна фіксація – мазок обробляють протягом 1–5 хв 96%-м етиловим чи метиловим спиртом або формаліном. Останній варіант вважають більш якісним.

Фарбування мазків здійснюють барвниками анілінового ряду. В мікробіологічній практиці використовують «основні», «кислі» та «нейтральні» фарбники. *Основні фарбники* мають позитивно заряджені іони, які взаємодіють з негативно зарядженими компонентами бактеріальної клітини. До них належать метиленовий синій, фуксин, кристалічний фіолетовий та сафранін. Основні фарбники особливо якісно фарбують бактерії.

Кислі (аніонні) – містять негативно заряджені іони, які зв'язуються з позитивно зарядженими структурами мікробних клітин (наприклад, еозин, пікринова кислота). Аніонні фарбники використовують переважно для забарвлення фону, а не мікробних клітин.

Нейтральні фарбники (отримані шляхом поєднання основного та кислого барвників), забезпечують чітке контрастне зображення об'єкту дослідження.

Простий метод фарбування мазків

Просте фарбування полягає у використанні лише одного барвника, дозволяє визначити наявність мікроорганізмів у досліджуваному зразку, їх розмір (приблизно) і форму та, в окремих випадках, виявити наявність капсули.

Методика фарбування

1. На мазок наносять декілька крапель барвника (наприклад, водного розчину метиленового синього, фуксину або сафраніну), витримують за кімнатної температури протягом 1–2-х хвилини (залежно від інтенсивності забарвлення, яку потрібно отримати).
2. Обережно змивають барвник дистильованою водою, тримаючи скельце під невеликим струменем.
3. Просушують препарат фільтрувальним папером або на повітрі.
4. Досліджують під мікроскопом, використовуючи імерсійну систему.

Просте фарбування зручне для швидкої орієнтовної діагностики, визначення морфологічних форм (коки, палички, звивисті бактерії) та розташування клітин (ланцюжки, грона, диплококи тощо). Воно є початковим етапом перед застосуванням складних методів фарбування, які дозволяють диференціювати бактерії за структурними та біохімічними ознаками.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують мазки з бульйонної і агарової мікробної культури (сапрофіт), фіксують термічним методом та фарбують простим методом, мікроскопують, записують результати у робочий зошит.*

Питання для самоконтролю

1. Назвіть обладнання, необхідне для приготування мазків?

2. Особливості приготування мазків з бульйонних та агарових культур мікроорганізмів ?

3. Охарактеризуйте бактеріологічні барвники.

4. З якою метою фіксують мазки?

5. Методика пофарбування мазків простим методом.

Лабораторне заняття 2.

ДИФЕРЕНЦІЙНІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів із методиками диференційного забарвлення мазків для мікроскопічного дослідження бактерій.*

Матеріали та обладнання. *Матеріал для виготовлення мазків (бульйонна і агарова мікробна культура (сапрофіт), суспензія бактерій), знежирені предметні скельця, бактеріологічні петлі, спиртівки, набір фарб для методу Грама та методу Ціля–Нільсена, зливні чаші, маркери, пінцети для тримання скелець, фільтрувальний папір для просушування, світлові мікроскопи, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

На відміну від простого, складні методи фарбування передбачають використання не менше двох фарбників та інших реактивів. У мікробіологічній практиці широко застосовують диференційні та спеціальні методи пофарбування.

Диференційні (багатофазні, диференційно-діагностичні) методи фарбування – дозволяють відрізнити різні групи бактерій в процесі їх ідентифікації. В мікробіологічній практиці широкого застосування набули метод Грама та метод Ціля-Нільсена.

Спеціальні методи фарбування – фарбування орієнтоване на виявлення певних структур у бактерій (ендоспор, капсул, джгутиків). Досить часто в мікробіології використовують методи Шаффера-Фултона та Буррі-Гінса.

Фарбування за методом Грама

1. Готують тонкий мазок із мікробної культури (бульйонної або з агаризованого середовища), висушують на повітрі та фіксують над полум’ям спиртівки.
2. Наносять розчин генціанвіолету (кристалічного фіолетового), витримують 1 хвилину, після чого промивають водою.
3. Наносять розчин Люголя, витримують 1 хвилину та промивають водою.

4. Знебарвлюють мазок 96% етиловим спиртом протягом 15–30 секунд (до припинення відходження барвника) і негайно промивають водою.

5. Наносять контрастний барвник (водний або карболовий фуксин чи сафранін), витримують 30–60 секунд, промивають водою та висушують.

6. Результати пофарбування визначають шляхом мікроскопії (за використанням імерсійного об'єктива).

Усі без винятку мікроорганізми на першому етапі фарбування (обробка генціанвіолетом і розчином Люголя) набувають синьо-фіолетового кольору. Надалі під дією етилового спирту одні з них знебарвлюються, тоді як інші зберігають початкове забарвлення. Після нанесення контрастного барвника (фуксину або сафраніну) знебарвлені мікроорганізми набувають червоного кольору, а ті, що не знебарвилися, залишаються синьо-фіолетовими. Мікроорганізми, які зберігають синьо-фіолетове забарвлення, називають *грампозитивними*, а ті, що забарвлюються у червоний колір, – *грамнегативними*.

Методика пофарбування препаратів за методом Грама (запропонована данським бактеріологом Гансом Крістіаном Грамом у 1884 році), не лише дозволяє оперативно диференціювати виявлені мікроорганізми на групи, що суттєво прискорює остаточну ідентифікацію виявленого мікроорганізму, а й, за певних обставин, слугує орієнтиром під час призначення хворому пацієнту (з біоматеріалів якого виділено мікроорганізм) потенційно ефективних антибіотиків.

Фарбування кислотостійких бактерій

Кислотостійкі бактерії – це особлива група мікроорганізмів, клітинна стінка яких відрізняється високим вмістом ліпідів, восків та міколових кислот. Завдяки такій структурі вони стійкі до знебарвлення кислотами, спиртами та багатьма органічними розчинниками. Кислоторезистентними мікроорганізмами є зокрема, є *Mycobacterium tuberculosis* – збудник туберкульозу та *Mycobacterium leprae* – збудник лепри.

Звичайні методи фарбування кислотостійких бактерій неефективні, оскільки барвники погано проникають крізь гідрофобний шар їх клітинної стінки. Для фарбування кислотостійких мікроорганізмів використовують спеціальні барвники й інші речовин, підвищують температуру. Після фарбування кислотостійкі бактерії міцно утримують барвник і не знебарвлюються навіть під дією кислот і спиртів, тоді як інші за аналогічних умов втрачають первинний барвник і забарвлюються контрастним.

Фарбування кислотостійких мікроорганізмів за методом Ціля–Нільсена

1. Готують мазок, висушують на повітрі та фіксують. Фіксацію проводять термічно (2–3 рази швидко проводять скельцем, мікробною плівкою догори, крізь полум'я) або обробляють 100% метанолом протягом 1 хвилини (після чого залишки зливають і мазок висушують).

2. Наносять розчин карболового фуксину, обережно підігрівають, доводячи до легкого випаровування (не до кипіння). Підтримують поверхню вологою, додаючи, за потреби, краплі барвника.

3. Промивають обережно проточною водою протягом 30–60 с.

4. Наносять 3%-у HCl у етанолі на 1 хв для знебарвлення; зливають розчин кислоти і повторюють промивання до повного знебарвлення фону (зазвичай протягом 1–3 хв).

5. Наносять контрастний барвник метиленовий синій на 30–60 с.

6. Фінальне промивання водою 30 с; мазок висушують на повітрі або фільтрувальним папером.

Мікроскопічна картина: кислотостійкі бактерії зберігають червоне або рожеве забарвлення, всі інші – забарвлюються у синій колір.

Розроблений німецькими вченими Францем Цілем та Фрідріхом Нільсеном ще наприкінці XIX століття метод забарвлення кислотостійких бактерій має виняткове значення у клінічній діагностиці ряду захворювань у людини і тварин, зокрема дозволяє швидко виявити мікобактерії у мазках, зроблених з біологічних матеріалів (харкотиння, біоптатах та ін.).

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують мазки з культури кишкової палички та молочнокислих бактерій, фарбують за методом Грама, мікроскопують, зарисовують мікроскопічну картину в робочому зошиті.*

Питання для самоконтролю

1. Які етапи включає фарбування бактерій за Грамом і яке значення має цей метод у мікробіології?

2. Чому одні бактерії забарвлюються за Грамом позитивно, а інші – негативно?

3. У чому полягає суть методу Ціля-Нільсена, запропонованого для фарбування кислотостійких мікроорганізмів?

Лабораторне заняття 3.
СПЕЦІАЛЬНІ МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів зі спеціальними методами фарбування, що використовуються для виявлення ендоспор у бактерій. Сформувати практичні навички виявлення спор під мікроскопом, а також уміння розрізняти вегетативні клітини та спори за їх морфологічними ознаками й забарвленням.*

Матеріали та обладнання. *Матеріал для виготовлення мазків (бульйонна і агарова мікробна культура бацил (сапрофіт)), бактеріологічні петлі, спир-*

тівки, предметні скельця, набір фарб для фарбування за методом Шеффера–Фултона (5% розчин малахітового зеленого, 0,5% розчин сафраніну), імерсійна олія, водяна баня, фільтрувальний папір для просушування, світлові мікроскопи, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.

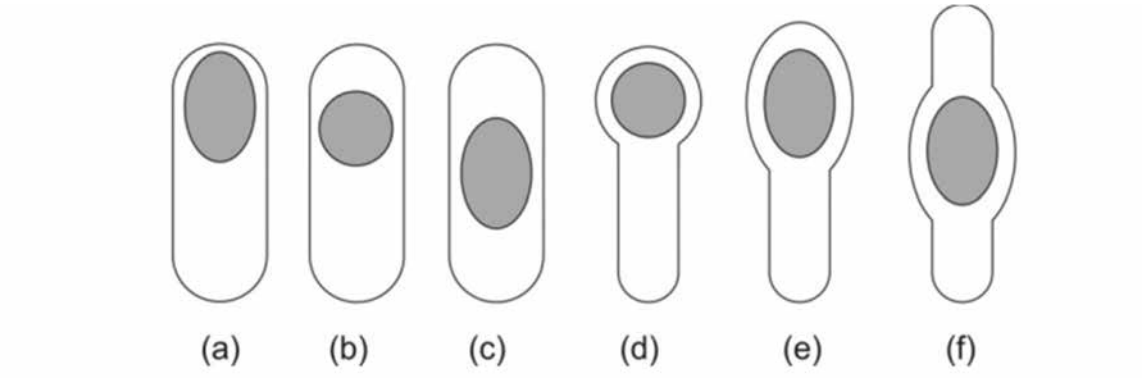


Рис. 1.7. Морфологія ендоспор.
Розташування: *термінальне (a, d, e), субтермінальне (b), центральне (c, f).*
Форма: *кругла (b, d), еліпсоїд (a, c, e, f).*
Діаметр спори порівняно з діаметром клітини:
недеформована (a, b, c), деформована (d, e, f).

Багато видів бактерій, зокрема представники родів *Bacillus* та *Clostridium*, трансформуються, зазвичай під впливом несприятливих умов, у спори.

В період формування та перебування останніх в межах ще не зруйнованої повністю структури мікробної клітини, їх називають *ендоспорами*.

По-суті спора – це форма перебування (існування) мікроорганізму в стані анабіозу за непридатних для його росту і розмноження умов. Вона тривала проте не безкінечна. Так, спори збудника сибірки (*Bacillus anthracis* **)** можуть зберігати життєздатність у ґрунті до 40–60 років, спори збудника правця (*Clostridium tetani)* залишаються життєздатними до 10–20 років.

За формою спори можуть бути овальні або круглі, а за розміром – такі, що не змінюють контур клітини, або ж збільшують її об'єм, як наприклад, у клостридій. За типом розташування бувають: центральні – розташовані посередині клітини (наприклад, *Bacillus anthracis*); субтермінальні – зміщені до одного з полюсів клітини (*Clostridium botulinum*); термінальні – розташовані на кінці клітини, інколи надаючи їй характерного «барабанного» вигляду (*Clostridium tetani*) (рис. 1.7).

З метою візуалізації спороутворювальних видів мікроорганізмів запропоновані ряд методик пофарбування препаратів, зокрема метод Шеффера–Фултона, Метод Дорнера та Метод Ожешко з бурою.

Метод Шеффера–Фултона

Метод розроблений у 1930 році. Для фарбування спор автори його запропонували використання малахітового зеленого як основного барвника та сафраніну як контрастного.

Методика фарбування

1. Виготовлений мазок висушують на повітрі та фіксують.
2. На поверхню мазка кладуть смужку фільтрувального паперу, просоченого 0,5%-м водним розчином малахітового зеленого та обережно нагрівають предметне скло над полум'ям або на водяній бані протягом 5–10 хвилин. Слідкують, щоб препарат не пересихав; у разі необхідності додають барвник. Далі знімають фільтрувальний папір і промивають препарат водою.
3. Наносять 0,5%-й сафранін, витримують протягом 30–60 секунд.
4. Ретельно промивають мазок водою, висушують фільтрувальним папером і досліджують під мікроскопом з імерсійною системою.

Мікроскопічна картина: спори мають чітке зелене забарвлення, вегетативні клітини забарвлюються у червоне.

Метод Дорнера

Цей метод поєднує фарбування карболовим фуксином із прийомом негативного забарвлення (на темному фоні).

Методика фарбування

1. Готують мазок і висушують його на повітрі.
2. Наносять карболовий фуксин і нагрівають над полум'ям або на водяній бані протягом 5–10 хвилин.
3. Після охолодження на повітрі обережно змивають надлишок барвника водою.
4. Наносять краплю туші або нігрозину (негативне фарбування створює темний фон). Розчин нігрозину готують наступним чином: суміш 10 г нігрозину і 100 мл дистильованої води занурюють на 30 хвилин в киплячу воду, та у випадку необхідності тривалого зберігання, після охолодження додають 0,5 мл формаліну; перед використанням суміш фільтрують.
5. Мазок накривають покривним скельцем та мікроскопують.

Мікроскопічна картина: спори – яскраво-червоні (чітко помітні на темному фоні), вегетативні клітини – рожеві, а фон препарату – темний (чорний або темно-сірий).

Метод Ожешко з бурою

1. На мазок, фіксований над полум'ям спиртівки, наносять метиленовий синій з бурою (до 100 мл 5 %-го водного розчину бури додають 3,3 г метиленового синього). Фарбують протягом 2 хв з підігріванням до пароутворення.
2. Після охолодження наносять 10 %-й водний розчин азотної кислоти та через 10–20 с ретельно промивають водою.
3. Наносять 1 %-й водний розчин сафраніну протягом, витримують 1 хв, промивають водою й висушують.

Мікроскопічна картина: спори синього кольору, тіла бацил – червоного кольору.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують препарати з культури бацил та фарбують одним із описаних методів;*

мікроскопують, аналізують результати і записують висновки в робочий зошит.



Питання для самоконтролю

1. *Назвіть методи фарбування мазків з метою виявлення спор.*
2. *У чому полягає суть методу Шеффера–Фултона, запропонованого для виявлення спор?*
3. *Як виглядають спори та вегетативні клітини мікроорганізмів в препаратах, фарбованих за методом Ожешко з бурою ?*

Лабораторне заняття 4.

МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КАПСУЛ У БАКТЕРІЙ

Мета заняття: *ознайомити студентів зі спеціальними методами фарбування, що використовуються для виявлення капсул у бактерій.*

Матеріали та обладнання. *Матеріал для виготовлення мазків (мікробна культура (капсулоутворюючий вид, сапрофіт), бактеріологічні петлі, спиртівки, предметні скельця, набір фарб для фарбування за методом Буррі–Гінса, Міхіна чи ін., імерсійна олія, фільтрувальний папір, світлові мікроскопи, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

У збудників захворювань капсула є одним із факторів патогенності. Так, вірулентні штами збудника сибірки, мають капсули та викликають захворювання у людини і тварин, а безкапсульний варіант авірулентний, використовується у якості ефективної вакцини.

Традиційними барвниками капсула бактерій не забарвлюється, що спонукало розробку спеціальних методик їх фарбування.

Метод Буррі–Гінса

Метод фарбування капсул запропонований Буррі (1905) та вдосконалений Гінсом (1913), належить до комбінованих методів фарбування.

Методика фарбування

1. На предметне скло наносять краплю туші (індійської туші) і додають невелику кількість бактеріальної суспензії.
2. Суміш рівномірно розподіляють по поверхні скла іншим предметним склом під кутом, отримуючи тонкий мазок.
3. Препарат не фіксують нагріванням, а висушують на повітрі.
4. На висушений мазок наносять насичений розчин генціанвіолету у 40%-му розчині формальдегіду та витримують 1–2 хв.
5. Барвник змивають водою, препарат висушують і досліджують під імерсійним об’єктивом.

Мікроскопічна картина: бактеріальні клітини – фіолетові, фон – темний, капсули – у вигляді світлих, безбарвних ореолів навколо клітин.

Метод Міхіна

1. На чисте предметне скло наносять бактеріальну культуру, розподіляють суспензію тонким мазком і висушують на повітрі.
2. Препарат заливають розчином фуксину Міхіна (основний фуксин у карболовому розчині) та прогрівають до появи парів протягом 30–60 секунд і барвник зливають.
3. На препарат наносять розчин індигокарміну на 1–2 хвилини.
4. Зливають барвник, препарат промивають водою, висушують і досліджують під імерсійним об'єктивом.

Мікроскопічна картина: бактеріальні клітини – червоні, фон мазка – синій, капсули – світло-блакитні прозорі ореоли навколо клітин.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують мікропрепарати з культури капсулоутворювальних видів бактерій та фарбують одним із описаних методів; мікроскопують, аналізують результати і записують висновки в робочий зошит.*

Питання для самоконтролю

1. Капсули у бактерій; значення капсул у патогенних мікроорганізмів?
2. Суть методу фарбування капсул за Ребігером.
3. Охарактеризуйте методику фарбування капсул за Міхіним.
4. Суть методу фарбування капсул за Буррі-Гінсом.

Тема 4. ВИЗНАЧЕННЯ РУХЛИВОСТІ У БАКТЕРІЙ

Мета заняття: *ознайомити студентів із методами визначення рухливості бактерій.*

Матеріали та обладнання. *Молода 18–20-годинна бульйонна мікробна культура (сапрофіт), бактеріологічні петлі, спиртівки, предметні скельця, покривні скельця, вазелін, імерсійна олія, світлові мікроскопи (зокрема мікроскопи, обладнані конденсором темного поля), контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Рухливість є однією з ключових властивостей бактерій, яка забезпечує їх здатність до активного пересування у середовищі, «пошук» поживних речовин та уникнення несприятливих умов.

Бактерії можуть пересуватися кількома способами, які визначаються структурними особливостями клітини та механізмом руху.

Переважна більшість бактерій рухаються за допомогою джгутиків (флагелярний рух). Джгутики – це розташовані на поверхні мікробної клітини тонкі ниткоподібні структури білкової природи, що обертаються навколо власної осі подібно до пропелерів. За допомогою джгутиків бактерії здатні реагувати на хімічні (хемотаксис) та фізичні подразники змінюючи напрямок пересування в залежності від характеру останніх. Деякі бактерії, що не мають джгутиків, пересуваються по поверхні за рахунок виділення слизу або скорочення цитоскелетних структур (гліколітичний або слизовий рух). Цей тип руху притаманний бактеріям роду *Myxococcus* та роду *Cytophaga*.

У рідкісних випадках бактерії можуть рухатися подібно до амеби (амебоїдний рух), змінюючи форму клітини та просуваючи псевдоподії. Цей механізм є менш поширеним і спостерігається переважно у деяких бактерій-сапрофітів.

Наявність та розташування джгутиків – важлива морфологічна видова ознака. Залежно від кількості джгутиків та розташуванні їх на поверхні мікробної клітини розрізняють: монотрихи, лофотрихи, амфітрихи та перитрихи (рис. 1.8).

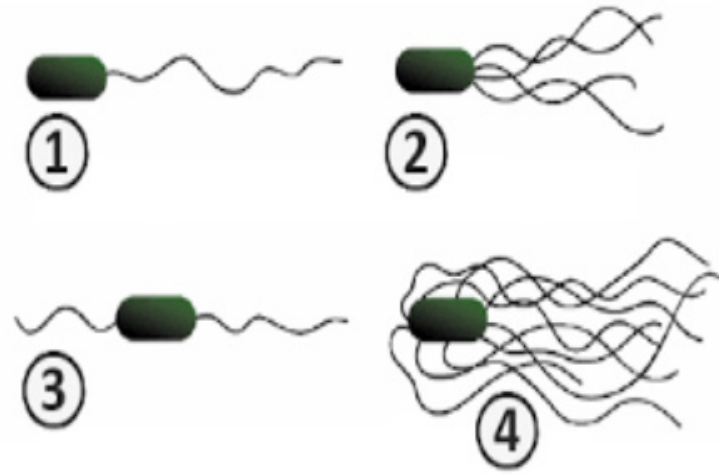


Рис. 1.8. Типи розташування джгутиків у бактерій:
1 – монотрих, 2 – лофотрих,
3 – амфітрих, 4 – перитрих.

монотрихи мають єдиний джгутик, розташований на одному з полюсів клітини, який забезпечує прямолінійний рух (вперед або назад);

•*лофотрихи* мають пучок джгутиків, розташованих на одному з полюсів клітини, які забезпечують прямолінійний та маневрений рух мікроорганізму;

•*амфітрихи* – джгутики розташовані на обох полюсах клітини. Така організація дозволяє змінювати напрямок руху без обертання клітини;

•*перитрихи* – джгутики розташовані по всій поверхні клітини. Перитріхіальні джгутики забезпечують рухливість мікроорганізму у різних напрямках.

З метою визначення рухливості мікроорганізмів запропоновано кілька методів. Найбільш популярним виявився мікроскопічний метод, який дозволяє не лише визначити рухливість мікроорганізму, а й охарактеризувати її характер (швидкість, напрямок руху тощо).

Рухливість необхідно досліджувати у молодих бульйонних культур мікроорганізмів (такими у переважній більшості мікроорганізмів є 18–24-годинні). За певних обставин можна визначати рухливість у мікроорганізмів, що репродукувались в умовах конденсату агарової культури.

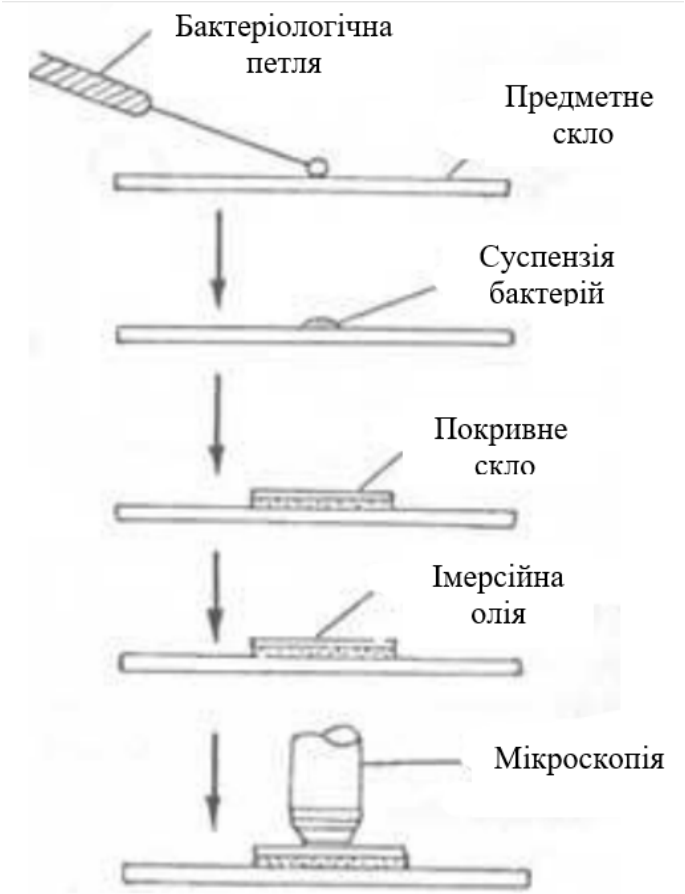


Рис. 1.9. Методика приготування препарату «роздавлена крапля»

За використання мікроскопічного методу визначення рухливості у мікроорганізмів, готують спеціальні препарати – «роздавлена» крапля, або «висяча» крапля.

Методика приготування препарату «роздавлена крапля»

1. На чисте, знежирене предметне скло наносять за допомогою стерильної піпетки краплю рідкої мікробної культури (0,01–0,02 мл) (рис. 1.9).

2. Покривне скельце акуратно опускають на краплю, торкаючись її лише одним краєм. Потім скельце повільно опускають, уникаючи утворення бульбашок повітря.

3. Легким натисканням на покривне скельце (наприклад, краєм пінцета) краплю трохи розплющують. Це зменшує товщину препарату і дозволяє краще спостерігати клітини, не пошкоджуючи їх.

Методика приготування «висячої краплі»

1. На середину покривного скельця наносять краплю рідкої бактеріальної культури (0,1–0,2 мл) (рис. 1.10).

2. Краї лунки предметного скла (використовують спеціальне предметне скло з лункою) змащують вазеліном і накривають покривним скельцем із краплею досліджуваної мікробної суспензії, розміщуючи його так, щоб крапля опинилася в центрі лунки, після чого злегка притискають. Змонтований таким чином комплекс «предметне скло – покривне скло – крапля досліджуваної суспензії» обережно перевертають на 180°. Утворюється стабільний простір для спостереження бактерій у рідкому середовищі.

Останній препарат має певні переваги. У препараті «роздавлена» відбувається швидка дегідратація, що може вплинути на рухливість досліджуваного мікроорганізму, тоді як у препараті «висяча» крапля вологість зберігається тривалий час.

Для мікроскопії підготовлених препаратів можна використати звичайний світловий мікроскоп, проте більш чітке зображення мікроорганізмів забезпечують темнопольна та фазово-контрастна мікроскопії.

В процесі мікроскопії препаратів важливо розрізняти справжню рухливість мікроорганізмів від явищ, що можуть її імітувати.

Справжній рух бактерій проявляється здатністю мікробних клітин змінювати швидкість, положення у просторі та напрям.

До несправжніх рухів відносять броунівський рух, який проявляється у вигляді хаотичного коливання мікробних тіл та немікробних дрібних часточок у рідині через удари молекул розчину. До несправжніх рухів належать також переміщення бактерій унаслідок течії рідини або випадкових зіткнень з іншими частинками та клітинами.

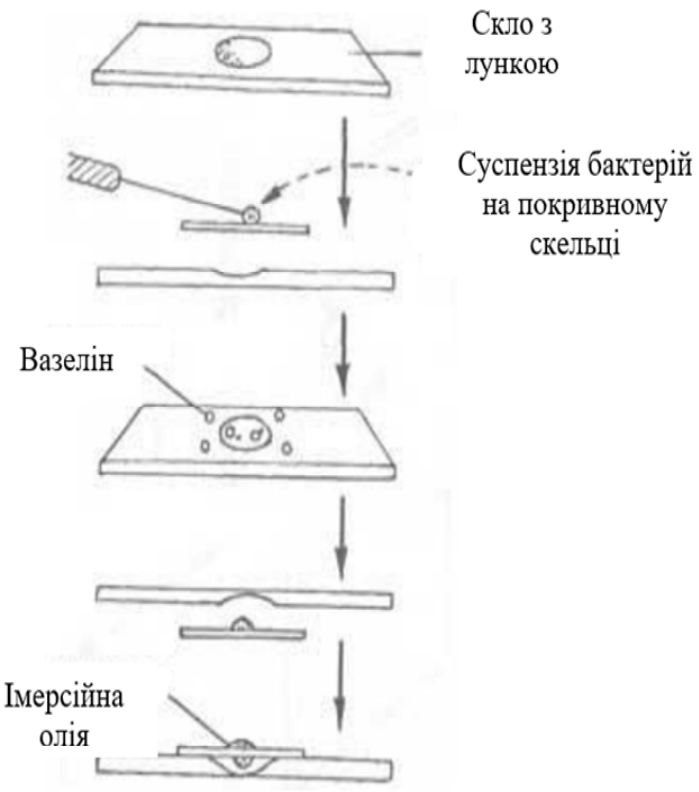


Рис. 1.10. Методика приготування препарату «висяча крапля»

Також з метою визначення рухливості мікроорганізму здійснюють посів його *уколом у напіврідкий агар* або *посів в конденсат МПА в пробірці*. У першому випадку, за росту рухливих бактерій, спостерігається дифузне розповсюдження ознак росту з місця уколу, в останньому (*метод Шукевича*) – з конденсату – по вертикалі. Надзвичайно рухливі представники деяких видів, зокрема бактерії роду *Proteus*, обумовлюють характерний «повзучий» ріст на поверхні середовища.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують препарати «роздавлена» і «висяча крапля»; мікроскопують, аналізують результати і записують висновки в робочий зошит.*

Питання для самоконтролю

1. Які є типи розташування джгутиків у бактерій?
2. Які є види таксису у бактерій?
3. Які є методи визначення рухливості у бактерій?
4. Суть методу «висяча крапля».
5. Суть методу Шукевича.

Тема 5. ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРУ БАКТЕРІЙ

Мета заняття: *ознайомити студентів із методами визначення розміру бактерій.*

Матеріали та обладнання. *Мікропрепарати фіксовані і пофарбовані, бактеріологічні петлі, спиртівки, предметні скельця, імерсійна олія, світлові мікроскопи, окуляр-мікрометр, об'єктив-мікрометр, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Розмір мікробних клітин відносно стабільна та характерна видова ознака для переважної більшості мікроорганізмів. Для його визначення запропоновано ряд методів. Одним із найбільш поширених є *мікрометричний метод* (визначення розміру бактерій за використання світлового мікроскопу). Для цього застосовують окуляр-мікрометр (вставляється в окуляр) та об'єктив-мікрометр (слугує для калібрування шкали окуляру).

Після калібрування кожна поділка окулярної шкали відповідає певному значенню в мікрометрах, і дослідник може вимірювати довжину та ширину бактеріальної клітини безпосередньо під мікроскопом. Цей метод забезпечує точні результати при роботі з бактеріями звичайних розмірів.

Раціональним вважається *фотографічний метод* визначення розміру мікроорганізмів. Бактерії фотографують через мікроскоп із використанням спеціальних камер або цифрових систем, а на отримане зображення «наносять» масштаб за допомогою мікрометра. Після цього розміри клітин визначають шляхом порівняння зі шкалою. *Фотографічний метод* дозволяє зберігати результати, проводити повторні вимірювання, застосовувати комп'ютерні програми для автоматичного аналізу результатів дослідження.

Для надзвичайно дрібних бактерій, розміри яких становлять менше 0,3 мкм, використовують *електронну мікроскопію.* Вона дозволяє не лише визначати загальні розміри клітини, а й досліджувати ультраструктури – товщину клітинної стінки, діаметр джгутиків чи наявність капсули. Цей метод забезпечує найвищу точність, але потребує складного обладнання та спеціальної підготовки зразків.

Сучасні можливості значно розширилися завдяки *комп'ютерно-аналітичним методам*. Використання програм для аналізу цифрових зображень, отриманих зі світлового або електронного мікроскопа, дозволяє автоматично вимірювати велику кількість клітин, що підвищує об'єктивність та статистичну достовірність результатів.

Методика визначення розміру бактерій мікрометричним методом у світловій мікроскопії

1. На початковому етапі необхідно підготувати мікроскоп до роботи: увімкнути освітлення, встановити потрібний об'єктив (наприклад, 40× або 100× з використанням імерсійної олії) та вставити окуляр-мікрометр у відповідне гніздо окуляра.

2. Далі виконують калібрування шкали (рис. 1.11). Для цього на предметний столик поміщають об’єктив-мікрометр, який являє собою скло з нанесеною точною мікроскопічною шкалою. Після наведення різкості необхідно отримати чітке одночасне зображення шкали окуляр-мікрометра та шкали об’єктив-мікрометра. Нульові поділки обох шкал поєднують, після чого визначають, через скільки поділок вони знову збігаються. На основі цих даних обчислюють ціну поділки окуляр-мікрометра (ЦОМ) у мікрометрах за відповідною формулою:

$$Ц_{ОМ} = \frac{n \cdot d}{m}$$

де:

ЦОМ – ціна поділки окуляр-мікрометра, мкм;

n – кількість поділок об’єктив-мікрометра, що співпали;

d – значення однієї поділки об’єктив-мікрометра (зазвичай 10 мкм);

m – кількість поділок окуляр-мікрометра, що відповідають цим n поділкам.

Наприклад, якщо 100 поділок об’єктив-мікрометра (що відповідає 1000 мкм) співпали з 80 поділками окуляр-мікрометра, то одна поділка окуляр-мікрометра дорівнюватиме 12,5 мкм.



Рис. 1.11. Накладання шкал окуляр-мікрометра і предметного мікрометра

3. Після калібрування замість об’єктив-мікрометра встановлюють препарат бактерій. Після наведення різкості, визначають положення бактеріальних клітин і вимірюють їхні розміри, співвідносячи довжину чи ширину клітини з поділками шкали окуляр-мікрометра. Отримане значення у поділках множать на величину однієї поділки, розраховану на етапі калібрування.

2. Для забезпечення достовірності результатів вимірюють щонайменше 20 бактеріальних клітин. Після цього обчислюють середні показники довжини та ширини клітин і заносять їх у протокол дослідження. Результати подають у вигляді таблиці або середніх статистичних величин із зазначенням середнього значення та похибки, наприклад: довжина клітин – 2,5 ± 0,3 мкм; ширина – 0,7 ± 0,1 мкм.

Зауваження. Калібрування шкали необхідно проводити окремо для кожного об’єктива мікроскопа (10×, 40×, 100×), оскільки величина поділки змінюється залежно від збільшення. При роботі з імерсійним об’єктивом обов’язково застосовують краплю спеціальної імерсійної олії, що забезпечує правильне заломлення світла та підвищує якість зображення.

Під час проведення вимірювань слід враховувати морфологічні особливості досліджуваних бактерій: у паличкоподібних форм визначають як довжину, так і ширину клітини, тоді як для коків вимірюють діаметр. Це дозволяє отримати максимально точні та коректні дані.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти визначають розмір бактерій мікрометричним методом у світловій мікроскопії, аналізують результати і записують висновки в робочий зошит.*



Питання для самоконтролю

1. *В яких одиницях вимірюється розмір бактерій?*
2. *Методи визначення розміру бактерій.*
3. *Як визначити розмір бактерій мікрометричним методом?*

Тема 6. МОРФОЛОГІЯ ЦВІЛЕВИХ ГРИБІВ, ДРІЖДЖІВ ТА АКТИНОМІЦЕТІВ

Мета заняття*: ознайомити студентів з морфологією і методами дослідження цвілевих грибів, дріжджів та актиноміцетів.*

Матеріали та обладнання. *Мікроскопи світлові, предметні і покривні скельця, бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, бактеріологічні голки, культури грибів і актиноміцетів (вирощені завчасно на живильних середовищах), гліцерин, спиртівки (газові горілки), контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Біологічна класифікація грибів. Домен еукаріоти *(Eukaryota*), надцарство *Opisthokola* , царство гриби *(Fungi*).

Мікроскопічні гриби – велика група (більше 150 тис. видів) нижчих безхлорофільних гетеротрофних мікроорганізмів, які живляться переважно осмотрофно і відрізняються від бактерій більш досконалою будовою та складнішими методами розмноження. Клітини грибів мають диференційоване ядро, тому вони належать до нижчих рослинних організмів – еукаріотів. Представників відділу гриби поділяють на макро- і мікроміцети (або макрофіти і мікрофіти). Макроміцети утворюють великі плодові тіла (наприклад, їстівні гриби), що відсутні у мікроміцетів. Мікроміцети відомі як плісеневі гриби.

Ознаки подібності грибів із рослинами: у більшості добре виражена клітинна стінка, необмежений ріст, живлення шляхом всмоктування, розмноження спорами. *Ознаки подібності грибів із тваринами:* гетеротрофний тип живлення, наявність у клітинній оболонці хітину, запас поживних речовин у вигляді глікогену, утворення сечовини в результаті обміну речовин, відсутність пластид.

Більшість цвілевих грибів є аеробами, тому краще розмножуються за наявності кисню на поверхні субстрату (продукту), однак, зазвичай, вони не

вибагливі до поживних середовищ, однак існують і мікроаерофіли, які розвиваються при невисоких концентраціях кисню (менше 5%) і здатні проростати в середину субстрату. Більшість грибів є мезофілами і віддають перевагу середнім температурам 16–27° С, деякі види є холодолюбиві (психрофіли), тому легко переносять низькі температури і можуть жити та розмножуватися навіть у холодильних камерах (-11… -15° С).

Мікроскопічні гриби існують переважно на поверхні субстрату у вигляді пухнастих чи павутиноподібних утворень, а деякі – у вигляді плівок. Багато із них мають промислове значення через використання їх у виробництві органічних кислот, ферментів, антибіотиків, вітамінів, деяких сирів тощо. Інші плісеневі гриби зумовлюють псування харчових продуктів і промислових товарів, деякі здатні викликати захворювання рослин, тварин чи людини. Тобто, серед плісеневих грибів зустрічаються як сапрофіти, так і паразити та симбіонти. Для ветеринарії найбільше значення мають мікроскопічні гриби, які викликають патологію у тварин і людей – представники родів *Penicillium, Aspergillus, Mucor, Fusarium, Trichopfiton, Microsporum, Candida, Histoplasma, Coccidioides, Stachybotrys тощо.*

Будова тіла гриба. В залежності від характеру будови гриба розрізняють *гриби безміцеліальні* (наприклад, дріжджі) та *міцеліальні* (наприклад, плісеневі гриби). Вегетативне тіло (талом) плісеневих грибів називається *міцелій (або грибниця)*, який складається з окремих тонких, розгалужених переплетених ниток – *гіф*. Розрізняють два типи міцелію: *субстратний* – з його допомогою гриби прикріплюються до субстрату, всмоктують воду і поживні речовини; *повітряний міцелій* – знаходиться на поверхні субстрату і саме тут розташовані органи розмноження. Гіфи можуть бути одно- і багатоклітинними. Якщо гіфи не мають перетинок (септи), то такі гриби належать до нижчих, у вищих грибів гіфи, як правило, з перетинками – багатоклітинні. Діаметр гіф більшості грибів лежить у межах 5–50 мкм.

Способи розмноження. На відміну від бактерій у грибів спостерігаються велике різноманіття способів і органів розмноження. Міцеліальні гриби розмножуються вегетативно, нестатевим способом (спорами, оїдіями, конідіями тощо), статевим способам і брунькуванням. (рис 1.12).

Вегетативне розмноження здійснюється без спеціальних органів розмноження – частинками міцелію, де будь-який шматочок останнього, при потраплянні на поживний субстрат, здатний до розвитку й утворення нової грибниці.

Деякі гриби розмножуються за допомогою специфічних утворень (спори, оїдії, конідії, тощо) – *нестатевий спосіб*. Нестатевими спорами є спорангіоспори, що утворюються в середині спорангію (роди *Mucor, Rhizopus*), або конідіоспори, які формуються на вільних кінцях плодоносних гіфів у представників родів *Penicillium* та *Aspergillus.*

Оідії – це особливі тільця, які утворюються в міцеліальних гіфах деяких багатоклітинних грибів, у яких зрілий міцелій розпадається на багато дрібних часток, кожна із яких здатна утворювати новий міцелій.



Рис. 1.12 Способи розмноження міцеліальних грибів
(Джерело: https://studfile.net/preview/7791728/page)

Спори грибів. Розрізняють *ендоспори* (спорангіоспори, зооспори) і *екзоспори* (конідії). Спорангіоспори розвиваються всередині особливих клітин – спорангіїв. При дозріванні спорангіоспор спорангії розриваються, спори із них висипаються, і при потраплянні у сприятливі умови проростають у гіфи. Гіфи нижчих грибів повітряного міцелію, що утворюють спорангії, мають назву **спорангієносіїв.** Таке утворення спор характерно для одноклітинних (нижчих) грибів. Зооспори, це рухливі спорангіоспори нижчих грибів, які мають джгутики.

У багатоклітинних (вищих грибів) формуються так звані *екзоспори*, тобто зовнішні, які відомі під назвою *конідій*, а повітряні гіфи, що несуть їх – *конідієносіями.*

Спорангієносії і конідієносії на поверхні субстратів, уражених пліснявими грибами, утворюють пухнастий наліт різного кольору (зелений, чорний, рожевий, білий, сірий та ін.), який зумовлений кольором конідій, спор чи оідій (гриби у стадії спороношення). Міцелій грибів, як правило, немає забарвлення.

При сприятливих умовах багато грибів здатні до *статевого розмноження*. При цьому утворюються особливі плодові тіла, які в окремих випадках досягають величезних розмірів (шляпкові, пластинчасті, трубчасті й інші гриби). Гриби, які здатні до статевого розмноження, називаються **досконалими.** Деякі гриби, що не здатні до статевого розмноження, мають назву **недосконалих** (клас дейтероміцети).

Статевий процес у різних груп грибів протікає по-різному і має свої особливості. При статевому розмноженні грибів спороутворенню передує злиття гаплоїдних чоловічих і жіночих гамет, в результаті чого настає диплоїдна фаза з повним (парним) набором хромосом. В разі статевого розмноження цвілевих грибів утворюється три типи статевих спор: зигоспори та ооспори – у фікоміцетів; аскоспори – у сумчастих грибів.

Гриби порівняно до бактерій, більш досконалі організми, про що свідчить багатоклітинна будова, розподіл життєвих функцій між частинами міцелію (повітряний і заглиблений у субстрат міцелій).

Систематика грибів

Систематика грибів – це розділ мікології, що займається класифікацією цих організмів за їхнім походженням, генетичною близькістю та особливостями будови.

Сучасна класифікація поділяє гриби на кілька великих груп залежно від будови міцелію (грибниці) та способів розмноження:

1. Поділ за будовою міцелію

• **Нижчі гриби (фікоміцети)**: мають несептовану (неподілену) грибницю, що виглядає як одна велетенська багатоядерна клітина (наприклад, мукор).

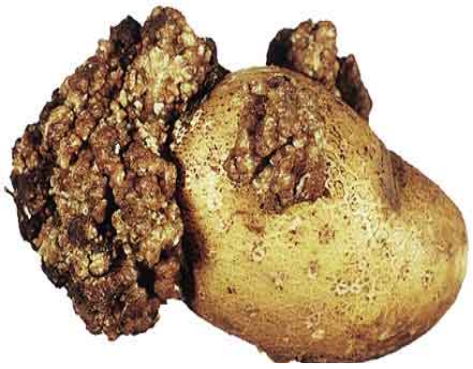


Рис. 1.13. Рак картоплі

• **Вищі гриби (мікоміцети)**: мають септовану грибницю, розділену на окремі клітини поперечними перегородками (септами).

2. Основні таксономічні відділи

За сучасною системою (яка постійно оновлюється завдяки генетичним дослідженням), виділяють такі ключові класи та відділи.

Серед **нижчих грибів** виділяють три класи:

1. Клас Хітридіоміцети (*Chytridiomycetes*) – найпримітивніші одноклітинні гриби (близько 300 видів), які існують без утворення міцелію або утворюють слаборозвинений міцелій. Зооспора має один джгутик, розмножуються переважно безстатевим шляхом.

Багато представників цього класу є водними організмами (синьо-зелені водорості, які утворюють планктон). Деякі існують у ґрунті, інші є внутрішньоклітинними паразитами рослин. Вони вражають розсаду капусти, молоді пагінці і столони бульби картоплі та інші рослини. На пошкоджених бульбах біля вічок утворюються нарости різного розміру з нерівною горбкуватою поверхнею (рак картоплі) (рис. 1.13). На цих наростах міститься значна кількість спор гриба – цист з товстою тришаровою оболонкою золотистого кольору. При руйнуванні наростів цисти потрапляють у ґрунт і там перезимовують. Навесні вони проростають і утворюють рухомі зооспори, які й заражають молоді пагони

Клас Ооміцети (*Oomicetes*) – мають добре розвинений одноклітинний, не септований міцелій. Зооспори мають два джгутики, які утворюються при безстатевому спороутворенні. Статеве розмноження (оогамія) здійснюється за допомогою ооспор. Більшість грибів цього класу викликає захворювання рослин. Найбільше значення мають фітофтора і плазмопара. Фітофтора відома як картопляний гриб, що вражає бульби і бадилля картоплі, томати і баклажани. Плазмопара викликає захворювання винограду – мільдью. Гриб вражає листя і

ягоди. Розвитку плазмопари сприяє підвищена вологість повітря. Спори плазмопари здатні зимувати в ґрунті і зберігати життєздатність протягом кількох років.

2. Клас Зигоміцети (*Zigomycetes*) – мають добре розвинений одноклітинний міцелій, коренеподібно розгалужений. Розмноження безстатеве (поділом міцелію) або утворенням спорангієносців та статеве – зигоспорами. Представники цього класу поширені у природі, багато з них викликають псування харчових продуктів. Переважно зустрічаються плісняві гриби з роду мукор, різопус і тамнідіум.

Мукорові гриби (Mucor). Вегетативне тіло гриба представлене однією гігантською багатоядерною клітиною. Типовим представником є мукорова («головчаста плісень»). Від субстратного міцелію у мукорових цвілей відходять спороносні гіфи – спорангієносці, які закінчуються плодовими тілами – спорангіями, заповненими спорангієспорами (ендоспорами). При розпаді спорангія спори виходять у зовнішнє середовище і за наявності сприятливих умов проростають (рис. 1.14).



Рис. 1.14. Гриби роду *Mucor*
(Джерело: https://www.youtube.com/watch?v=BoQC6qjLz5A

Мукорові гриби відомі як сіра пліснява, яка дуже швидко розмножується, і є збудником псування плодів, овочів, кулінарних виробів, товарів і матеріалів. Найчастіше пошкоджують продукти, багаті на крохмаль, текстильні вироби, шпалери, часто псують вологе зерно. Деякі мукорові гриби відіграють позитивну роль, завдяки здатності продукувати органічні кислоти, ферменти, зброджувати цукор до етилового спирту. У східних країнах їх використовують поряд з дріжджами, у виробництві спирту та напоїв. Серед мукорових грибів існують і збудники захворювань людини і тварин.

Гриби *роду різопус (Rhizopus)* відрізняються тим, що їх спорангієносці ростуть групами у вигляді пучків по декілька штук із сплетіннями гіфів, яке називається вузлом. Розмножуються спорангієспорами. Гриби цього роду є типовими ґрунтовими мікроорганізмами, які вражають ягоди, коренеплоди, бульби, викликаючи «м'яку» гниль. Гриби швидко розповсюджуються на поверхні субстрату, утворюючи столони – скупчення гіфів, які, в свою чергу, утворюють нові колонії грибів. Основним хазяїном штаму *Rhizopus microsporus* є рис, спричиняючи хворобу фітофтороз розсади рису, а також цей гриб часто зустрічається в кукурудзі та соняшнику, у людей, спричиняє інфекції легень. Діапазон росту *R. microsporus* коливається від 25 ° до 55 ° з оптимальною температурою 28 °.

Гриби *роду Thamnidium* відрізняються тим, що у головного спорангієносця є бокові відгалуження виделко- подібної форми (дихотомічні), а на їх кінцях розташовані невеликі спорангії – спорангіоли, які містять одну або невелику кількість спор (рис. 1.15).

Вид *Thamnidium elegans* є найбільш холодостійким і здатний псувати продукти харчування навіть у холодильнику, однак може рости й за звичайних умов. Гриб синтезує мікотоксини, тому м'ясо і м'ясні вироби, уражені *Thamnidium elegans,* не придатні до використання.

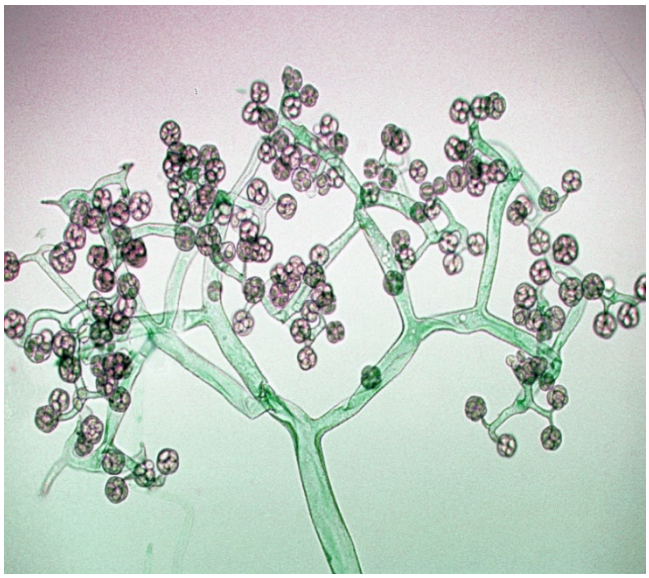


Рис. 1.15. Гриби роду *Thamnidium*
(Джерело:https://atrium.lib.uoguelph.ca/items/3f30ffd0-efe5-4c78-852f-b118d97ab0e6)

До вищих грибів належать представники трьох класів: аскоміцети, базидіоміцети і дейтероміцети (недосконалі гриби).

1. Клас Аскоміцети або сумчасті гриби (*Ascomyce Від субстратного міцелію у мукорових цвілей відходять плодонесучі гіфи tes*). Один із найбільших класів грибів, що включає близько 30 тис. видів. Серед них багато паразитів рослин, збудників псування харчових продуктів, а також грибів, які використовують для отримання корисних речовин (вітамінів, антибіотиків). Характерна особливість класу – утворення під час статевого розмноження асків (сумок) – одноклітинних структур, що містять спори.



Рис.1.16. Дріжджі під мікроскопом
(Джерело:https://fr.beifanequipment.com/info/yeast-under-the-microscope-95452074.html)

Типовим представником цього класу є дріжджі.

Дрі́жджі – поза таксономічна група, одноклітинних організмів яка об'єднує більше 2000 видів.

Дріжджові клітини є типовими еукаріотами з відокремленим ядром у цитоплазмі і рештою структур, характерних для вищих клітин. Дріжджі не мають справжнього міцелію, а на стадії вегетативного розмноження можуть формувати псевдоміцелій.

Під мікроскопом видно, що дріжджі являють собою окремі клітини, круглої або овальної форми величиною близько 10 мкм, або формують ланцюжки із них (рис. 1.16). За Грамом фарбуються позитивно.

Найчастіше дріжджі розмножуються *брунькуванням*, в результаті чого від материнської клітини поступово відмежовується одна чи декілька дочірніх.

При недостатньому живленні й посиленні аерації у дріжджів відбувається статеве розмноження, механізм якого зводиться до копуляції (злиття) двох клітин з утворенням однієї сумки (аска). В останній формуються чотири або вісім аскоспор, здатних витримувати дію несприятливих умов зовнішнього середовища.

Місця існування дріжджів пов'язані переважно з багатими цукрами субстратами: поверхнею плодів і листя, де вони харчуються прижиттєвими виділеннями рослин, нектаром, раневими соками рослин, мертвою фітомасою тощо, проте вони поширені також у ґрунті (особливо в підстилці й органогенних горизонтах) і природних водах.

Дріжджі роду *Candida, Pichia, Ambrosiozyma,* постійно присутні в кишечнику і ходах ксилофагів (комах, що харчуються деревиною), багаті дріжджові співтовариства розвиваються на листі, ураженому попелицею. Представники роду *Lypomyces* є типовими мешканцями ґрунту.

Сапрофітні види дріжджів використовують у спиртовій, винокурній, хлібопекарській промисловості. Деякі види здатні викликати у тварин хвороби (мікози, зокрема бластомікози).

2. Клас Базидіоміцети (*Basidiomycetes*) – вищі гриби з багатоклітинним міцелієм, який включає близько 30 тисяч видів і є другим за кількістю видів після аскоміцетів. Представниками цього класу є їстівні та отруйні шляпкові гриби (мають плодове тіло великих розмірів), а також сапрофіти і факультативні гриби-паразити хлібних злаків, наприклад іржиста сажка, домовий гриб, який псує деревину, яка мають підвищену вологість.

Базидіальні гриби утворюють статеві спори у спеціальних структурах, статевих органах – базидіях пластинчастої або трубчастої форми. Вони нагадують сумку (аски) і гомологічні до них. На відміну від аскоміцетів, у базидіальних грибів відсутні диференційовані статеві органи (рис. 1.17). Статевий процес – соматогамія, яка відбувається або шляхом злиття двох вегетативних клітин гаплоїдного міцелію, або двох базидіоспор чи продуктів їх брунькування.

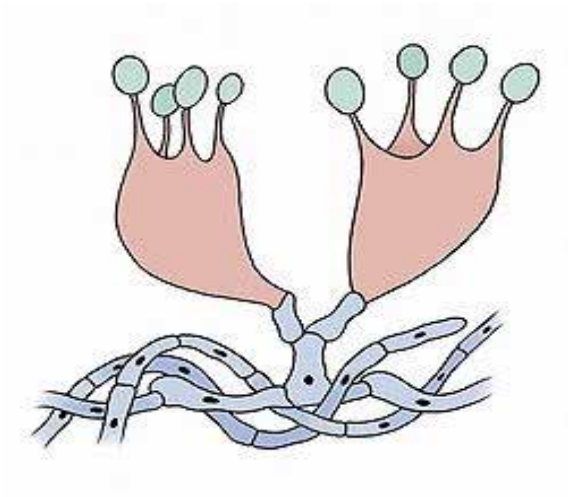


Рис. 1.17. Схематичне зображення базидії із базидіоспорами на гіфах міцелію *(Джерело: https://uk.wikipedia.org/wiki/*

Клас дейтероміцети або недосконалі гриби (*Deuteromycetes*), за морфологією належать до вищих, але не розмножуються статевим способом, не утворюють аск і базидій. Мають багатоклітинний (септований) міцелій, розмножуються лише спорами *(оїдіями та конідіями) – нестатевий спосіб,* на підставі чого їх відносять до незавершених грибів *(Fungi imperfecti).*

Життєвий цикл проходить у гаплоїдній стадії без зміни ядерних фаз. Цей клас нараховує біля 25000 видів, із яких більшість є збудниками інфекційних хвороб рослин, тварин і людини, зокрема: фузаріум (*Fusarium*), *Penicillium*, *Aspergillus*, збудники дерматомікозів: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Achorion*, дріжджеподібні гриби роду *Candida* і *Criptococcus*, оїдіум (*Oidium lactis*) та ін.

Пеніцилові гриби – це рід багатоклітинних цвілевих грибів, що утворюють зелений або блакитний наліт на субстратах. У представників роду *Penicillium* субстратний і повітряний міцелій септовані. Плодоносні гіфи (конідієносці) розгалужені, кожна гілка закінчується пучком стеригм у вигляді китички, на яких ланцюжками розміщено конідії (екзоспори). Така структура певною мірою нагадує кисть руки, у зв'язку з чим пеніцилові гриби одержали назву «гриб кістьовик». У перекладі з латини *Penicillus* означає «маленький пензлик» (рис. 1.18).

Існує 16 видів грибів роду *Penicillium*: деякі із них зумовлюють псування (цвілість) кормів і продуктів харчування, інші – здатні нагромаджувати токсин й викликати кормові отруєння у тварин (пеніциліотоксикози). Окремі види *(P. crustosum, P. notatum)* – продуценти антибіотика пеніциліну, *P. roqueforti*, застосовуються для виготовлення сирів (Рокфор, Камамбер).



Рис. 1.18. Гриби роду *Penicillium*:
будова, культуральні властивості.

У грибів ***роду Aspergillus*** перетинки є лише в субстратному міцелії. Конідієносці септ не мають, закінчуються потовщенням у вигляді кулі чи груші, навколо якого радіально розміщуються стеригми з ланцюжками конідій, що нагадують струмені води, які виливаються з лійки. Тому аспергілові гриби одержали назву «лійкові цвілі» (рис. 1.19).

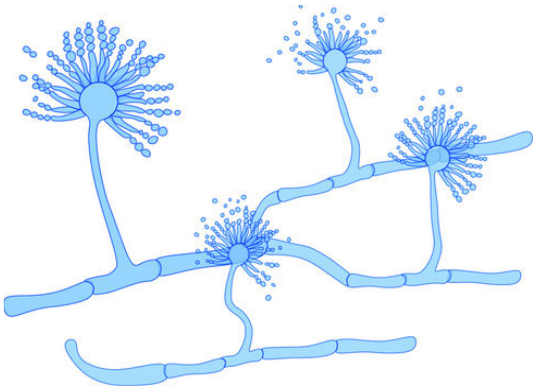


Рис. 1.19. Гриби роду *Aspergillus*
(Джерело: https://www.istockphoto.com/it/illustrazioni/aspergillosi

Колонії можуть бути різних кольорів залежно від виду: зеленого, чорного (*A. niger*), жовтого або коричневого.

Деякі види аспергілів викликають у тварин аспергілотоксикози та аспергільоз. Окремі аспергіли корисні *(A. niger)* й використовуються для одержання органічних кислот, зокрема лимонної та щавлевої. У східній кухні (Японія, Китай) за допомогою аспергілів роблять соєвий соус, місопасту та рисове вино (саке). Як і будь-які цвілі аспергіли псують корми та продукти харчування. Деякі види (наприклад, *A. flavus*) виділяють небезпечні отрути на горіхах та зерні, які мають канцерогенну дію.

Міцелій грибів роду ***Fusarium*** також має перетинки, утворює різні пігменти, за рахунок яких гриб набуває рожевого, фіолетового, білого чи іншого кольору. Плодоносні гіфи (звичайні або розгалужені конідієносці) закінчуються серпоподібними конідіями (рис. 1.20).

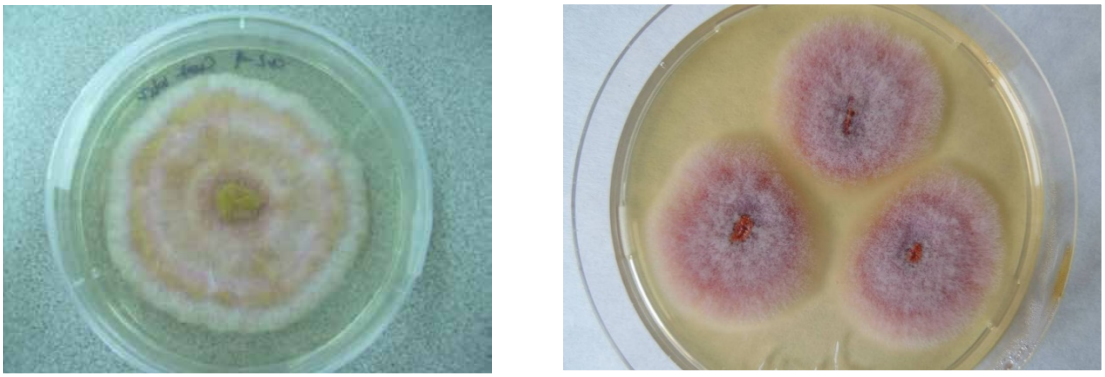


Рис. 1.20. Колонії гриба *роду Fusarium*
(Джерело: https://it.wikipedia.org/wiki/File:Fusarium_plate_1.png)

Гриби цього роду ведуть сапрофітний, або паразитичний спосіб життя на рослинах та їхніх рештках. Досить часто уражають зерно, при згодовуванні якого у тварин виникає фузаріотоксикоз. У людей, у випадку вживання хліба з ураженого фузаріями зерна, також може розвиватись інтоксикація. Народна назва цієї хвороби – «п'яний хліб».

Види Alternaria – це рід мікроскопічних цвілевих грибів, які поширені в усьому світі. Вони відіграють подвійну роль: як небезпечні патогени рослин та як потужні алергени для людини.

Альтернарія розмножується частинами міцелію (вегетативно) і спорами (рис. 1.21). Альтернарія вражає коренеплоди під час зберігання, викликаючи чорну гниль у вигляді сухих утиснутих темно-сірих плям. Вразливими овочевими культурами є помідори, картопля, баклажани тощо.

Вид *Alternaria alternata* є одним із найпоширеніших джерел спорової алергії у людини, особливо влітку та восени. Часто ростуть в приміщеннях, спричинюють сінну гарячку, реакції гіперчутливості, що інколи призводять до появи бронхіальної астми, а у хворих із зниженим імунітетом можуть сприяти розвитку опортуністичних інфекцій.

Це пліснявий гриб, який складається з розгалуженого септованого (поділеного перегородками) міцелію, що проникає в субстрат. Будова включає темнозабарвлені гіфи та характерні багатоклітинні спори (конідії) з поперечними та поздовжніми перегородками, зібрані в ланцюжки, що забезпечує швидке поширення.

АКТИНОМІЦЕТИ

Біологічна класифікація: домен бактерія (*Bacteria*), тип актинобактерії (*Actinobacteria*), клас актинобактерії (*Actinobacteria*), ряд актиноміцети (*Actinomycetales*). До родини *Actinomycetaceae* входять 370 видів, але тільки деякі з них, є збудниками актиномікозу. Патогенними актиноміцетами є *A. bovis,* виявлений у 1877 р. К. Гарцом і *A. israilii,* виділений у 1891 р. І. Ізраїлем від хворих на актиномікоз.

Актиноміцети або променеві гриби (*aktis* – промінь, *myces* – гриб) – одноклітинні бактерії, які раніше вважали грибами через здатність клітин галузитись, тобто займають проміжне місце між бактеріями і міцеліальними грибами. Подібно до бактерій – прокаріоти, фарбуються позитивно за Грамом (клітинна стінка містить пептидоглікан), мають неоформлене ядро, тонкий міцелій, що нагадує нитчасті бактерії діаметром 0,4–1,5 мкм. Подібно грибам, мають одноклітинний міцелій, деякі види розмножуються спорами. В актиноміцетів, як і в бактерій, генетичну функцію виконує нуклеоїд. У нитках міцелію є зерна хроматину.

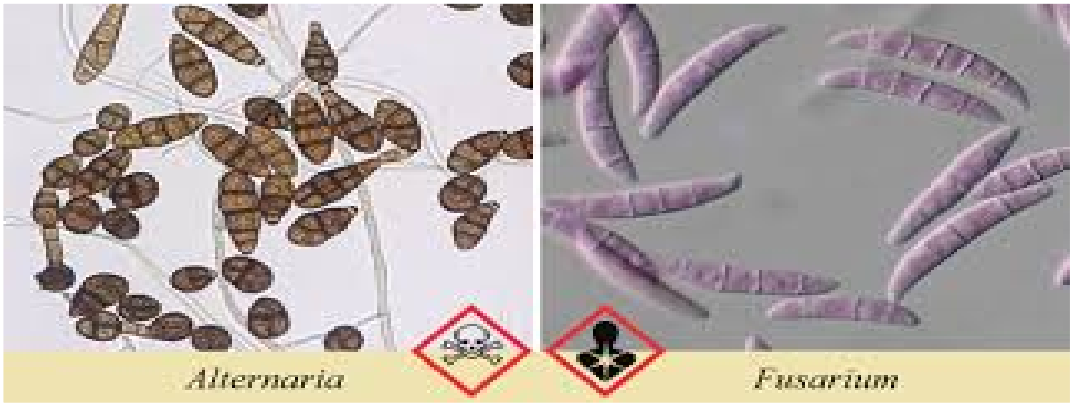


Рис. 1.21. Міцелій грибів *роду Fusarium і Alternaria*
(Джерело: https://ru.wikipedia.org/wiki/)

Одержали таку назву у зв'язку з утворенням в уражених тканинах організму тварин особливих колоній – *променевих друз*. Останні, роздавлені між двома предметними скельцями, під мікроскопом мають своєрідний вигляд: центр – у стадії розпаду, від якого як промені радіально відходять

морфологічно змінені колбоподібні гіфи (рис.1.22). Розмножуються актиноміцети проростанням спор, прикріплених на спороносцях, простим діленням, перешнуруванням і брунькуванням.

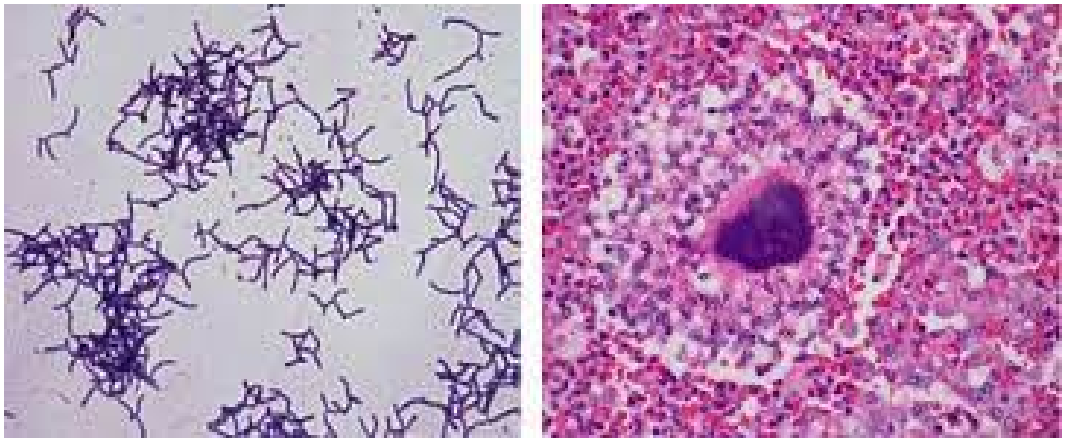


Рис. 1.22. Міцелій актиноміцет і променеві друзи гриба

Культуральні властивості. Актиноміцети – факультативні анаероби, мезофіли, добре розвиваються при температурі 25–30 °С (оптимальна температура 35–37 °С), кислотостійкі, у свіжих культурах утворюють зернистість. Добре ростуть на простих середовищах з pH 4,4–9,0. На щільних середовищах одні види ростуть з утворенням твердих гладеньких колоній, інші мають складчасті горбкуваті кіркоподібні, бархатисті, пухнасті або борошнисті колонії, які вростають в агар і досить важко знімаються петлею. Колонії можуть бути безбарвними або пігментованими (сині, фіолетові, червоні, жовті, оранжеві, зелені тощо).

Актиноміцети досить поширені у природі, але найбільш поширені в ґрунті та на рослинних рештках. Позитивне значення їх полягає у тому, що вони беруть активну участь у ґрунтоутворенні, є активними продуцентами багатьох антибіотиків (стрептоміцин, тетрациклін та ін.).

Резистентність. Актиноміцети – дуже стійкі мікроорганізми, витримують температуру 60 °С протягом 1 год, довго зберігаються у висушеному стані. Особливо резистентні спори.

Патогенність. Патогенні актиноміцети уражують велику рогату худобу, рідше – свиней, коней. Захворювання має хронічний перебіг, при якому утворюються запальні вогнища і фістули. Проникаючи в організм людини або тварин, патогенні збудники, за певних умов здатні викликати захворювання з хронічним перебігом – актиномікоз. Перебіг захворювання супроводжується утворенням запальних вогнищ і фістул Найчастіше ушкоджуються шкіра, підшкірна клітковина з утворенням нориць, лімфатичні вузли, органи дихання.

До патогенних актиноміцет належать деякі види роду *Nocardia*, зокрема *N. asteroides*. *N. asteroides* живе в ґрунті. Зараження, частіше, відбувається повітряно-пиловим шляхом і через ушкоджену шкіру. Крім людини, хворіють велика рогата худоба, коні, собаки, коти, мавпи, норки, видри та інші тварини. У людини *N. asteroides* спричиняє нокардіоз – хронічне гранулематозне

ураження легень, шкіри, лімфатичних вузлів, мозку та його оболонок, нирок. Якщо місцем проникнення актиноміцетів є шкіра стопи, розвивається міцетома стопи (мадурська хвороба), що проявляється утворенням абсцесів і множинних фістул.

N. asteroides росте в аеробних умовах, утворює зморшкуваті зернисті колонії жовтого або темно-оранжевого кольору. При бактеріоскопії збудник має тонкий розгалужений міцелій, що розпадається на паличкоподібні і кокоподібні елементи.

Мікроскопічне дослідження грибів

Зазвичай плісеневі гриби досліджують у не зафарбованому стані.

Приготування препарату. Препарат для мікроскопії із плісеневих грибів готують методом «роздавленої краплі». Цей метод дозволяє детально розглянути міцелій та спороносні структури (конідії, спорангії).

Основні етапи приготування препарату

1. **Підготовка:** Знежирити предметне скло (спиртом або сумішшю) та підготувати препарувальні голки або петлі, простерилізувавши їх у полум'ї пальника.
2. **Нанесення рідини:** на предметне скло нанести 1-2 краплі дистильованої води, фізіологічного розчину або барвника (наприклад, розчин Люголя, фуксин або лактофенол). Можна використовувати суміш етилового спирту і гліцерину у рівних обсягах.
3. **Відбір культури:** З поверхні культури плісені (вирощеної на середовищі, наприклад, Чапека або сусло-агарі) обережно взяти препарувальною голкою невелику частину міцелію, намагаючись не пошкодити спороносці і поміщають його у краплю рідини.
4. **Створення і фіксація препарату:** міцелій гриба у краплі на склі, обережно розправляють голками, щоб уникнути скупчення гіфів, накривають покривним скельцем і злегка придавлюють (щоб запобігти утворенню бульбашок повітря).
5. **Мікроскопія препарату:** дослідити під мікроскопом при малому, а потім середньому збільшенні (доцільно користуватися об’єктивами сухої системи (8х і 40х)).

При роботі з пліснявою важливо проводити всі маніпуляції в асептичних умовах, щоб не допустити поширення спор у повітрі, та використовувати засоби індивідуального захисту. Препарат потрібно готувати поблизу спиртівки, препарувальні голки після роботи ретельно фламбують над полум’ям спиртівки.

Мікроскопію препарату із дріжджів проводять аналогічним способом, або готують із них мазки і фарбують за Грамом. Фарбований препарат розглядають під імерсійною системою мікроскопа.

Включення глікогену (запасний полісахарид) виявляють за допомогою фарбування розчином йоду життєздатних дріжджових клітин. Для цього, на предметне скло наносять краплю дріжджів, додають до неї краплю йоду і

накривають покривним склом. Розглядають за допомогою мікроскопа, із застосуванням об'єктивів 40х і 90х.

Глікоген у клітині зафарбовується в червоно-бурий колір і є ознакою зрілості дріжджів.

***Завдання для самостійної роботи студентів**. Студенти оглядають колонії різних видів грибів, актиноміцетів, дріжджів, готують препарати, мікроскопують їх та зарисовують основні структурні елементи грибів в альбом. Визначають рід гриба, відмічають будову субстратного і повітряного міцелію у нижчих і вищих грибів, будову спорангієносців і нестатевих спор.*



Питання для самоконтролю

1. *Основні класи грибів.*
2. *Морфологія, біологічні особливості дріжджів, мукорових, аспергілових та пеніцилових грибів, представників роду Fusarium.*
3. *Морфологія актиноміцетів, їх поширення і значення у природі.*
4. *Методика приготування мікробіологічних препаратів для вивчення морфології клітин грибів і дріжджів?*

Тема 7. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ

***Мета заняття:** Ознайомити студентів із методами стерилізації поживних середовищ, лабораторного посуду, інструментів тощо.*

***Матеріали та обладнання.** Стерилізатори, набір інструментів (скальпелі, пінцети, ножиці та ін.), сухожарова шафа, автоклав, спиртівки (газові горілки) бактерицидні лампи, скляні колби, скляні градуйовані піпетки, пастерівські піпетки, пробірки, бактеріологічні чашки з МПА, суспензія мікробної культури (сапрофіт), бактеріологічні петлі, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Стерилізація є однією з фундаментальних процедур у мікробіологічній практиці, що забезпечує достовірність досліджень і безпеку персоналу. Її сутність полягає у повному знищенні всіх форм мікроорганізмів, включно з вегетативними клітинами, спорами бактерій і грибів, а також вірусами. Сам термін «стерилізація» був запропонований у середині XIX століття французьким ученим Шарлем Шамберланом (1851–1908), відомим співробітником Луї Пастера. Він увів його для позначення процесу, який гарантує абсолютну відсутність будь-якого живого мікроорганізму в об’єкті чи середовищі. Саме Шамберлан розробив і перший автоклав (1879 р.), що заклало основу сучасних методів теплової стерилізації.

З історичної точки зору розвиток уявлень про стерилізацію був тісно пов’язаний із дослідженнями Луї Пастера, які довели роль мікроорганізмів у

процесах бродіння та виникненні інфекційних хвороб. Потреба у створенні абсолютно чистих, «вільних від життя» середовищ виникла в той період, коли експериментальна мікробіологія тільки формувалася як наука. Запровадження поняття стерилізації дозволило не лише стандартизувати лабораторні процедури, а й стало основою для розвитку асептики та антисептики в медицині, ветеринарії та харчовій промисловості.

Сьогодні стерилізація розглядається як невід'ємний компонент будь-якої мікробіологічної роботи. Вона забезпечує правильність результатів експериментів, виключає ймовірність випадкових контамінацій, дозволяє отримати чисті культури мікроорганізмів, а також захищає дослідника від інфекційних ризиків. Стерильність інструментів, живильних середовищ та лабораторного посуду є обов'язковою умовою не лише для наукових досліджень, але й для практичних сфер – від діагностики захворювань до виробництва вакцин і біотехнологічних продуктів.

Вибір конкретного методу стерилізації визначається природою об'єкта, його стійкістю до високих температур, тиску, вологості, а також наявністю відповідного обладнання. Для цього в мікробіологічній практиці розроблено широкий спектр методів – від класичних теплових до сучасних фізико-хімічних і радіаційних.

Теплові методи стерилізації. Найпоширенішим способом є використання високих температур, які призводять до денатурації білків, руйнування клітинних мембран і знищення спор. У мікробіологічній практиці застосовують два різновиди теплової стерилізації: вологу та суху.

Волога стерилізація проводиться у парових стерилізаторах – автоклавах. Принцип методу ґрунтується на обробці матеріалів насиченою водяною парою під тиском (зазвичай 1 атм надлишкового тиску в камері відповідає температурі 121°C). Тривалість експозиції становить 15–40 хвилин залежно від об'єму матеріалу (таблиця 1.2). Цей метод є надзвичайно ефективним для стерилізації поживних середовищ, перев'язувальних матеріалів, хірургічних інструментів та більшості скляного посуду, а також для знешкодження матеріалів біологічного походження.

Автоклав складається з кількох основних елементів, які забезпечують ефективну та безпечну стерилізацію матеріалів (рис. 1.23). Основною частиною пристрою є *металева камера (4)*, виготовлена з міцного матеріалу, стійкого до високого тиску та температури. У цю камеру завантажують стерилізовані об'єкти, при цьому вона повинна бути герметично закрита під час роботи.

Для щільного закриття служать *двері з герметичним замком (5)*, які запобігають витіканню пари та забезпечують підвищення тиску всередині камери. Пар для стерилізації виробляється *паровим генератором*, який нагріває воду до утворення насиченої пари.

Для контролю робочих параметрів автоклав обладнаний *манометром (2)* та *датчиками температури*, які дозволяють регулювати тиск та температуру під час циклу стерилізації. *Випускний клапан (8)* використовується для безпечного скидання пари після завершення роботи.

Таблиця 1.2. Режими автоклавної стерилізації для різних матеріалів

Матеріал / Об’єкт	Температура, °C	Тиск, атм	Час експозиції	Примітки
Живильні середовища (більшість)	121	1,1–1,2	15–20 хв	Для об’ємів до 1 л; для більших – час подовжують
Скляний посуд (пробірки, колби)	121	1,1–1,2	30 хв	Перед стерилізацією посуд загортають у папір або марлю
Гумові вироби, латекс	115	0,7–0,8	20–30 хв	Уникати перегрівання, інакше можливе пошкодження
Металеві інструменти (пінцети, ножиці)	132	2,0	15 хв	Використовується для швидкої стерилізації
Білизна, перев’язувальні матеріали	121	1,1–1,2	30–45 хв	Загортають у крафт-пакети або тканинні мішки
Відходи біологічного походження	134	2,0	30–40 хв	Обов’язкова утилізація після стерилізації

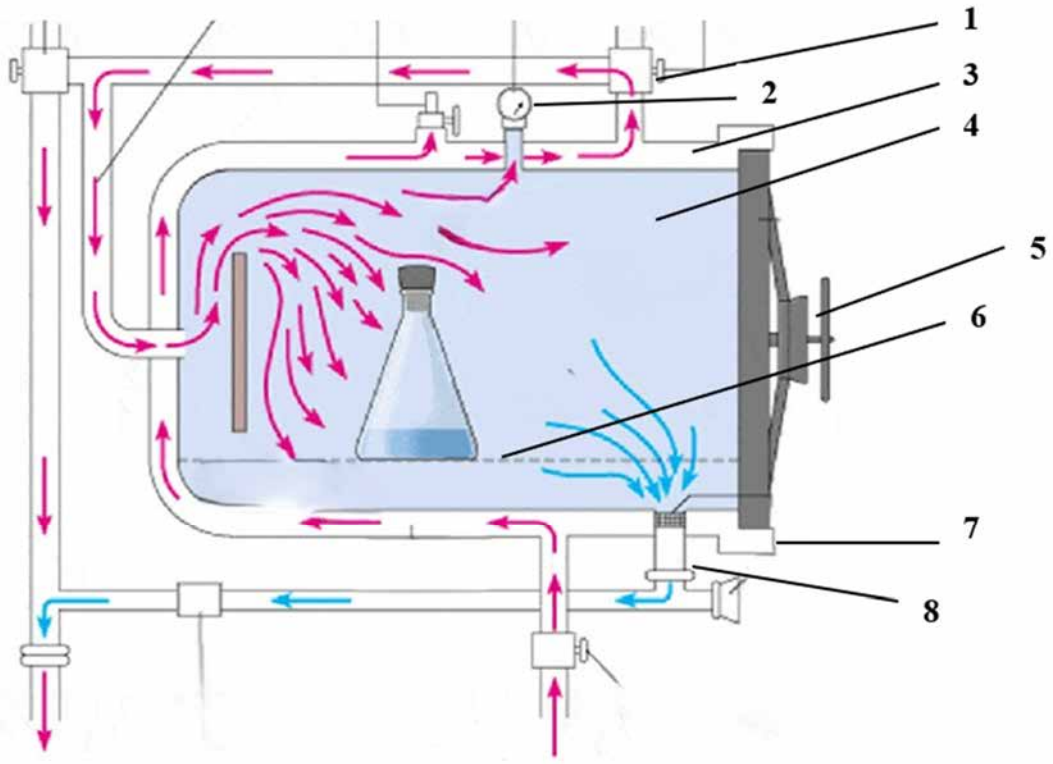


Рис. 1. 23. Схема будови горизонтального автоклава.

1 – клапан безпеки, 2 – манометр, 3 – парова камера, 4 – камера стерилізації, 5 – двері з ущільнювачем і замками, 6 – решітка для розміщення посуду, поживних середовищ, інструментів, 7 – корпус автоклава, 8 – випускний клапан. ***Червоні стрілки*** – рух гарячої пари. Пара надходить зверху, рівномірно розподіляється всередині камери, огортає предмети, нагріваючи їх до температури стерилізації (зазвичай 121 °C при тиску 1,1 атм). ***Сині стрілки*** – відведення охолодженого повітря та конденсату вниз через дренажну систему.

Сучасні автоклави оснащуються системою управління – автоматичною або ручною, яка дозволяє встановлювати потрібний режим стерилізації, час експозиції та контроль температури.

Завдяки такій конструкції автоклав забезпечує надійну і безпечну стерилізацію матеріалів, включно з термостійкими спорами та патогенними мікроорганізмами.

Правила роботи з автоклавом

1. Перед завантаженням перевірте герметичність камери та стан клапанів.
2. Матеріали слід укладати так, щоб пара могла вільно циркулювати навколо них; щільно закриті контейнери не можна переповнювати.
3. Використовувати лише витратні матеріали, придатні для обробки в автоклаві.
4. Не відкривати кришку до повного скидання тиску та охолодження камери, щоб уникнути опіків та вибуху пари.
5. Після завершення циклу стерилізації матеріали слід обережно витягувати, використовуючи термостійкі рукавички або інструменти.
6. Регулярно проводити технічне обслуговування та очищення автоклава відповідно до інструкції виробника.

Суха стерилізація здійснюється у сухожарових шафах, де об’єкти піддають впливу гарячого повітря при температурі 160–180 °С протягом 1–2 годин (таблиця 1.3). Метод ефективний для скляного та металевого інструментарію, оскільки він не пошкоджує їхні властивості, але непридатний для поживних середовищ та термолабільних речовин.

Таблиця 1.3. Режими сухої стерилізації для різних матеріалів

Матеріал / Об’єкт	Температура (°С)	Час експозиції	Примітки
Скляний посуд (пробірки, колби, чашки Петрі, предметні скельця)	160 °С	120 хв	Найпоширеніший режим, забезпечує надійну стерильність
Скляний посуд	180 °С	60 хв	Використовується при потребі швидшої стерилізації
Металеві інструменти (пінцети, ножиці, шпателі)	160 °С	120 хв	Рекомендується упаковувати в крафт-пакети
Металеві інструменти	180 °С	60 хв	Допускається багаторазове застосування
Порошки (тальк, крохмаль), жири, олії	150 °С	60 хв	Важливо уникати перегріву, щоб не змінити властивості речовини
Вата, марля, текстильні матеріали	160 °С	150 хв	Стерилізують у металевих коробках або пакетах
Ножиці, пінцети у футлярах	180 °С	45 хв	Додатково перевіряють стан футлярів після стерилізації

До теплових методів стерилізації також можна віднести кип’ятіння та фламбування. *Кип’ятіння* полягає у витримуванні продуктів, розчинів або інструментів у киплячій воді при температурі близько 100 °С протягом певного часу, зазвичай 15–30 хвилин. Цей метод дозволяє знищити більшість бактерій, вірусів та грибкових спор, хоча не завжди ефективний проти термостійких спор. Він застосовується для знезараження води, простих живильних середовищ і лабораторного посуду. *Фламбування* передбачає короткочасне обпалювання робочих інструментів, таких як петлі або шпателі, над полум’ям спиртівки чи газової пальника. Цей метод забезпечує практично миттєве знезараження поверхні інструменту та широко використовується під час роботи з культурами мікроорганізмів у лабораторії для локальної стерилізації інструментів.

Фільтраційна стерилізація. Деякі рідини, наприклад, сироватка крові, вітаміни, антибіотики, гормони або ферменти, руйнуються під впливом високих температур. Для них застосовують метод фільтрації через спеціальні бактеріальні фільтри з порами діаметром 0,22–0,45 мкм, які затримують бактерії, але пропускають рідину. Цей метод дозволяє зберегти біологічну активність речовин, хоча не гарантує повного видалення вірусів та мікоплазм.

Фільтраційна стерилізація бере свій початок у 1884 році, коли Шарль Шамберлан запропонував свій фарфоровий «свічковий фільтр», який затримував бактерії та інші мікроорганізми. Цей метод дав змогу вперше отримати стерильні рідини без нагрівання та став основою для подальшого розвитку мікробіології. Згодом з’явилися різні модифікації пористих фільтрів – з діатомітів, азбесту, скловолокна. У XX столітті були створені целюлозні та мембранні фільтри з точно визначеним розміром пор, що дозволило стандартизувати процес стерилізації. Саме завдяки цим вдосконаленням стало можливим не лише знезаражувати поживні середовища та лікарські препарати, але й відкривати нові мікроорганізми, у тому числі віруси.

Хімічна стерилізація. Якщо об’єкти чутливі як до високих температур, так і до механічної фільтрації, застосовують хімічні агенти. Найчастіше використовуються етиленоксид, формальдегід, бета-пропіолактон, перекис водню, спирти та інші антисептики. Ці речовини взаємодіють із білками й нуклеїновими кислотами мікроорганізмів, порушуючи їхню структуру та життєдіяльність. Хімічна стерилізація широко використовується для одноразових медичних матеріалів (шприців, катетерів, пластикових інструментів), але потребує ретельного контролю залишкових кількостей реагентів, оскільки вони можуть бути токсичними.

Газова стерилізація. Окремим напрямом є стерилізація газоподібними агентами. Найчастіше застосовують етиленоксид, який здатен проникати у важкодоступні місця і забезпечувати повну дезактивацію мікроорганізмів. Метод придатний для стерилізації термочутливих матеріалів, оптики, пластмас та складних інструментів, проте потребує тривалої аерації після обробки, щоб усунути токсичні залишки.

Променеві та плазмові методи. Окрім іонізуючого випромінювання, у практиці все більшого поширення набуває плазмова стерилізація, при якій

використовується перекис водню у газоподібному стані, активованому електромагнітним полем. Утворені плазмові радикали ефективно руйнують клітинні структури мікроорганізмів, при цьому метод є щадним до матеріалів і не залишає токсичних залишків.

Методи контролю якості стерилізації. Сам факт проведення стерилізації ще не означає досягнення стерильності, тому необхідним етапом є контроль її якості. Методи контролю поділяють на фізичні, хімічні та біологічні.

Фізичні методи контролю полягають у вимірюванні параметрів стерилізаційного процесу. Зазвичай це контроль температури, тиску та часу експозиції. Для цього використовують вмонтовані термометри, манометри, термопари або електронні системи реєстрації, які фіксують усі дані стерилізації. Такі методи дозволяють швидко оцінити, чи були дотримані необхідні умови, однак вони не дають повної гарантії знищення мікроорганізмів, оскільки показують лише відповідність режиму.

Хімічні методи ґрунтуються на застосуванні спеціальних індикаторів, що змінюють свої властивості під дією фізичних факторів. Це можуть бути індикаторні стрічки, етикетки або ампули з хімічними речовинами, які плавляться чи змінюють колір при досягненні певної температури або тиску. Хімічні методи широко використовуються для щоденного контролю, оскільки вони прості та наочні. Проте, як і фізичні, вони лише підтверджують досягнення потрібних параметрів, але не свідчать безпосередньо про загибель мікроорганізмів.

Найбільш надійним є біологічний метод контролю стерильності. Його суть полягає у використанні спороутворювальних бактерій, що відзначаються високою стійкістю до стерилізаційних факторів. Найчастіше застосовують *Geobacillus stearothermophilus* для контролю парової стерилізації та *Bacillus subtilis* для сухожарової чи газової. Біотести закладають у стерилізаційну камеру разом із матеріалами, а після завершення процесу їх висівають у поживні середовища. За відсутності росту бактерій роблять висновок про ефективність стерилізації. Біологічні методи потребують більше часу, проте вони вважаються «золотим стандартом» контролю.

Таким чином, для забезпечення надійності стерилізації доцільно поєднувати різні методи контролю.

Стерилізація повітря в лабораторіях мікробіологічного профілю. Це комплекс заходів, спрямованих на видалення або знищення мікроорганізмів у повітрі з метою запобігання контамінації зразків, обладнання та робочого середовища. У сучасних лабораторіях для стерилізації повітря застосовують кілька основних методів. Фільтраційна стерилізація здійснюється за допомогою високоефективних повітряних фільтрів (HEPA), які здатні затримувати частки розміром 0,3 мкм і більше, включно з бактеріями та спорами. Такі фільтри встановлюють у ламінарних шафах, боксах і системах вентиляції лабораторій.

Ультрафіолетове опромінення є ще одним поширеним методом, який руйнує ДНК і РНК мікроорганізмів, знищуючи їх життєздатність. УФ-лампи використовують для обробки повітря та робочих поверхонь у приміщеннях і

лабораторних шафах, найчастіше поза робочим часом. Ефективність цього методу залежить від інтенсивності лампи, часу експозиції та відсутності перешкод, що затуляють промені (таблиця 1.4).

Таблиця 1.4. Основні режими ультрафіолетового опромінення повітря

Режим опромінення	Умови застосування	Час дії	Призначення / ефект	Особливості
Міжробочих перерв	Лабораторія не працює (після закінчення робочого дня)	30–60 хв	Знищення більшості бактерій, вірусів, грибкових спор на відкритих поверхнях	Ефективний для повітря та поверхонь; персонал відсутній
Короткочасний протягом робочого дня	Періодичні короткі перерви у роботі	Кілька хвилин за раз	Підтримка чистоти повітря під час робочого процесу	Лампи вмикаються лише при відсутності прямого контакту персоналу або при захисному екрануванні
Постійний режим обмеженого впливу	Спеціальні шафи (ламінарні, біологічно безпечні)	Протягом усього робочого процесу	Підтримання стерильності повітря в робочій зоні	Промені не впливають на персонал; ефективне знезараження всередині шафи

Треба пам’ятати, що УФ-опромінення не проникає через скло або пластик, тому воно ефективне лише на відкритих поверхнях та у прямій видимості променю.

Іноді для стерилізації повітря застосовують озон, особливо для камерної обробки після забруднень або планових дезінфекцій. Озон і формальдегід ефективно знищують мікроорганізми в закритих приміщеннях, проте їхнє використання вимагає суворого контролю концентрації та часу експозиції через токсичність. У деяких лабораторіях застосовують також повітряні стерилізатори з нагріванням або плазмовими генераторами, які знищують мікроорганізми без використання хімічних речовин.

Після розгляду методів стерилізації, які забезпечують повне знищення мікроорганізмів, до уваги варто взяти ***пастеризацію*** – термічну обробку, що дозволяє зменшити мікробне забруднення у продуктах і середовищах, зберігаючи їхні поживні та фізико-хімічні властивості.

Пастеризацію здійснюють за відносно низьких температур протягом обмеженого часу, що дозволяє знищити більшість патогенних мікроорганізмів і значно зменшити загальне мікробне обсіменіння. Цей метод був запропонований французьким ученим Луї Пастером у 1864 році для запобігання псуванню вина та молока. Пастеризація відрізняється від стерилізації тим, що вона не забезпечує повної стерильності продукту, а лише робить його мікробіологічно безпечним, при цьому зберігаючи смакові та поживні властивості.

Існують різні методи пастеризації, що застосовуються залежно від продукту та умов обробки. *Низькотемпературна пастеризація* передбачає нагрівання продукту до 63–65 °C протягом 30 хвилин. Цей метод використовується для молока, соків та інших рідких продуктів у невеликих обсягах. *Високотемпературна короткочасна пастеризація* здійснюється при 72–75 °C протягом 15–30 секунд і широко застосовується в промисловому виробництві молока та соків. Для більш тривалого зберігання продуктів без охолодження застосовують *обробку ультрависокою температурою* – 135–150 °C протягом 1–5 секунд.

Значення пастеризації у мікробіології та харчовій промисловості важко переоцінити. Цей метод дозволяє знизити ризик харчових інфекцій, спричинених такими бактеріями, як *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* та *Mycobacterium bovis*, а також подовжує термін зберігання продуктів без істотної втрати їхніх якостей. У лабораторній практиці пастеризація застосовується для підготовки живильних середовищ, наприклад молочних середовищ, перед введенням стерильних добавок або культур мікроорганізмів.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують посуд та поживні середовища до стерилізації у автоклаві, стерилізують металеві інструменти у стерилізаторі.*

Питання для самоконтролю

1. *Дайте визначення терміну «стерилізація».*
2. *Назвіть методи стерилізації, обладнання.*
3. *Охарактеризуйте фізичні методи стерилізації.*
4. *Принципова схема конструкції автоклава.*
5. *Назвіть способи контролю якості стерилізації.*

Тема 8. КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Лабораторне заняття 1. Живильні середовища

Мета заняття: *ознайомити студентів з загальними принципами та технологією приготування живильних середовищ для культивування мікроорганізмів.*

Матеріали та обладнання. *Компоненти для приготування живильних середовищ: агар-агар, желатин, пептон, м'ясна вода, х. ч. NaCl, 0,1 н розчин хлоридної кислоти (HCl), 0,1 н розчин гідроксиду натрію (NaOH), дистильована вода, фільтрувальний папір, градуйовані піпетки, стерильні пробірки і флакони з ватяними пробкам, середовища промислового виробництва, (прості і складні спеціальні), pH-метр.*



Рис. 1.24.Термостат сухоповітряний ТС-160

Культивування мікроорганізмів є одним із ключових елементів мікробіологічних досліджень в лабораторіях медико-біологічного напряму, підприємств з виробництва лікарських засобів та засобів профілактики захворювань у людини, тварин і рослин, а також в лабораторіях з виробництва та контролю якості і безпеки харчових продуктів та ін.

Виділення, ідентифікація та культивування мікроорганізмів в лабораторіях потребує спеціального обладнання, зокрема мікроскопів, термостатів і анаеростатів, центрифуг, холодильників і морозильних камер, pH-метрів, шуттель-апаратів, водяних бань, ваг, термометрів, мірних піпеток і колб, предметних і покривних скелець тощо.

Термостат (інкубатор) забезпечує стабільний температурний режим, оптимальний для росту й розмноження певних видів мікроорганізмів (рис. 1.24). Так, оптимальною для багатьох збудників інфекційних захворювань у людини і тварин є температура близько 37–38 °С, а для дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* значно нижча – 28–30 °С. Нині доступні десятки модифікацій лабораторних термостатів, які мають певні відмінності, зокрема різняться за об'ємом. Сучасні моделі термостатів обладнані системою програмування температурного режиму.

Виділення й культивування анаеробів здійснюють в ***анаеростатах*** – герметикних контейнерах (металевих чи ін.) де створюють анаеробне

середовище (без кисню) шляхом заміни атмосферного повітря індиферентними газами (CO_2, H_2, N_2) або використовуючи спеціальні «хімічні пакети» (GasPac). Останні забезпечують безкисневе середовище шляхом хімічної реакції, що відбувається безпосередньо всередині анаеростата. При контакті вмісту пакета з водою відбувається реакція, за якої весь вільний кисень зв'язується. Одночасно з поглинанням кисню виділяється вуглекислий газ, який стимулює ріст і розмноження переважної більшості мікроорганізмів-анаеробів. Використання хімічних пакетів має певні переваги (зручності), не потребує обладнання анаеростатів вакуумними насосами та газовими балонами.

Запропоновані також пакети Anaerocult з метою створення оптимальних умов для мікроаерофілів (*Campylobacter* та ін.).

Для контролю анаеробіозу в анаеростатах використовують хімічні індикатори (наприклад смужки «Anaerotest»). Індикатори містять речовину (частіше метиленовий синій), яка, залежно від наявності кисню змінює колір. Індикатор кладуть в анаеростат одночасно з посівами мікроорганізмів та названим пакетом (згідно інструкції виробника індикатору) та спостерігають за його кольором, орієнтуючись на наступне: *синій колір* (смужка залишається пофарбованою) – висновок: кисень не видалено; *білий колір* (відбулось знебарвлення смужки) – кисень відсутній, анаеробіоз досягнуто.

У випадках, коли смужна протягом кількох годин не знебарвлюється роблять висновок, що анаеростат не герметичний або ж пакет прострочений чи пошкоджений.

Запропоновано також і біологічний метод контролю анаеробіозу в анаеростаті (в анаеростат поміщають посів на живильне середовище *Clostridium*). За наявності кисню останній не росте.

Для виділення й культивування мікроорганізмів в умовах лабораторії використовують ***живильні середовища*** (отримані на спеціалізованих виробництвах) або ж виготовляють власні з певних інгредієнтів в умовах лабораторії. Вимоги до живильних середовищ надзвичайно жорсткі.

Вони повинні забезпечувати мікробні клітини речовинами, необхідними для їх росту і розмноження, прояву типових для виду фізіолого-біохімічних властивостей, бути ізотонічними та стерильними.

До складу живильних середовищ зазвичай входять джерела карбону та енергії (цукри, органічні кислоти), азоту (пептони, амінокислоти, солі амонію), мінеральні солі, а також фактори росту – вітаміни, гормоноподібні речовини. У деяких випадках до середовищ додають кров або сироватку крові чи інші компоненти, що створюють спеціальні умови для вибагливих мікроорганізмів.

За консистенцією розрізняють рідкі, щільні та напівщільні живильні середовища. *Рідкі середовища* (бульйони) застосовують переважно в процесі отримання достатньої кількості мікробної біомаси та під час вивчення фізіологічних властивостей мікроорганізмів. *Напівщільні середовища* містять невелику кількість агару (біля 0,2–0,5 %) й використовуються для визначення рухливості мікроорганізмів та культивування факультативних анаеробів. *Щільні середовища* (з вмістом агару 1,5–2 %) слугують переважно для ізоляції чистих культур мікроорганізму, вивчення морфології їх колоній в процесі ідентифікації.

За призначенням розрізняють, прості, спеціальні, диференційно-діагностичні та селективні середовища. *Прості (універсальні)* середовища, зокрема м'ясо-пептонний агар (МПА) та м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) придатні для вирощування багатьох невибагливих мікроорганізмів. *Спеціальні середовища* використовують для культивування мікроорганізмів, які не ростуть на простих середовищах (наприклад середовище Левенштейна-Йенсена для мікобактерій туберкульозу). *Диференційно-діагностичні середовища* дозволяють не лише вирощувати, а й розрізняти деякі види мікроорганізмів за їх біохімічними властивостями (наприклад, середовище Ендо для диференціації збудників колібактеріозу й сальмонельозу). *Селективні середовища* містять речовини, що пригнічують ріст небажаних видів і сприяють виділенню певної групи мікроорганізмів, наприклад, сольовий агар (містить 7,5% NaCl) для стафілококів, селенітовий бульйон для виділення збудників сальмонельозу та жовчний бульйон для ізоляції збудника холери. Склад та призначення деяких живильних середовищ наведено в таблиці 1.5.

Таблиця 1.5. Характеристика основних живильних середовищ

Назва середовища	Компоненти середовища	Призначення / Приклади мікроорганізмів
М'ясо-пептонний агар (МПА)	Екстракт м'яса, пептон, NaCl, агар	Універсальне середовище для ізоляції та вирощування багатьох видів бактерій (*E. coli, Bacillus subtilis*)
М'ясо-пептонний бульйон (МПБ)	Екстракт м'яса, пептон, NaCl	Отримання біомаси, тестування фізіологічних властивостей
Агар Ендо	Лактоза, фуксин, сульфіт натрію, агар	Диференціація лактозопозитивних і лактозонегативних кишкових бактерій (*E. coli, Salmonella*)
Агар МакКонкі	Лактоза, жовчні солі, нейтральний червоний, агар	Вирощування та диференціація ентеробактерій
Жовчно-сольовий агар	Жовчні солі, пептон, NaCl, агар	Селективне середовище для кишкових бактерій (*Enterococcus, E. coli*)
Середовище Сабуро	Глюкоза, пептон, агар	Вирощування грибів і дріжджів (*Candida, Aspergillus*)
Середовище Левенштейна-Йенсена	Яєчний субстрат, гліцерин, малахітовий зелений	Культивування *Mycobacterium tuberculosis*
Кров'яний агар	Пептонне середовище + 5–10% дефібринованої крові	Виявлення гемолітичних властивостей (*Streptococcus, Staphylococcus*)
Мінімальні синтетичні середовища	Відомі неорганічні солі, джерело вуглецю (глюкоза)	Генетичні дослідження, вивчення метаболічних потреб мікроорганізмів (*E. coli мутанти*)

Особливу групу становлять *середовища для тестування антибіотикочутливості*, а також синтетичні та мінімальні середовища, у яких точно відомий хімічний склад. Вони використовуються у генетичних і біохімічних дослідженнях для вивчення потреб клітин у конкретних речовинах.

Від правильного вибору середовища залежить успішність ізоляції чистої культури, ідентифікація мікроорганізмів, а також точність експериментальних результатів.

Приготування м'ясо-пептонного бульйону (МПБ). Для приготування середовища у 1 літрі дистильованої води розчиняють 10 г пептону, 3 г м'ясного екстракту та 5 г кухонної солі (NaCl) і кип'ятять, постійно помішуючи, до повного розчинення пептону й інших компонентів; стерилізують у автоклаві при 121°С протягом 15 хвилин. Після охолодження до кімнатної температури бульйон придатний для використання.

Приготування м'ясо-пептонного агару (МПА). В 1 літрі дистильованої води розчиняють 10 г пептону, 3 г м'ясного екстракту, 5 г NaCl та 15 г агар-агару і кип'ятять, постійно помішуючи, до повного розчинення компонентів. Далі середовище розливають у скляні флакон, стерилізують у автоклаві при 121°С протягом 15–20 хвилин. Після стерилізації середовище охолоджують за кімнатної температури до 45–50°С та розливають у бактеріологічні чашки або пробірки, де воно застигає. МПА у пробірках найчастіше використовують у вигляді «косяків», що значно збільшує поверхню середовища для росту мікроорганізмів. Для цього пробірки з розплавленим агаром кладуть під кутом 5–6° й тримають доти, поки агар не затвердіє.

Приготування м'ясо-пептонного желатину (МПЖ). МПЖ використовується як напівщільне середовище при дослідженні рухливості бактерій та виявлення здатності розщеплювати желатин – важливої ознаки в процесі ідентифікації мікроорганізмів. Для приготування МПЖ в 1 літрі дистильованої води розчиняють 10 г пептону, 3 г м'ясного екстракту, 5 г NaCl та 120 г желатину. Компоненти підігрівають до повного розчинення желатину, після чого стерилізують при 110–115°С протягом 15–20 хвилин та розливають у пробірки й охолоджують при 4°С для застигання.

Приготування кров'яного агару. Кров'яний агар готують на основі МПА. До розплавленого та охолодженого до 45°С МПА обережно додають 5–10 % (за об'ємом) стерильної дефібринованої крові (зазвичай баранячої або кінської) й ретельно перемішують та розливають у бактеріологічні чашки чи, за потреби, у пробірки. Після застигання за кімнатної температури кров'яний агар можна використовувати для посіву мікроорганізмів. Кров'яний агар дозволяє виявляти α-, β- та γ-гемоліз і забезпечує ріст більш вимогливих бактерій.

У мікробіології *pH живильного середовища* є одним із ключових факторів, що впливає на ріст і розвиток мікроорганізмів. Кожен вид бактерій має свій оптимальний pH, при якому обмін речовин протікає найефективніше, а ріст найшвидший. Для більшості нейтрофільних бактерій оптимальним вважається середовище з pH близько 7,0, тоді як кислотостійкі (ацидофіли) мікроорганізми можуть рости при pH 4,0–5,0, а лужностійкі (алкалофіли) – при pH 8,0–9,0.

Контроль pH важливий не лише для забезпечення росту, але й для ста більності компонентів середовища. Певні поживні речовини, ферменти та барвники можуть змінювати свої властивості при відхиленні pH від оптимального, що негативно впливає на результати експериментів. Тому перед стерилізацією середовище доводять до необхідного значення pH шляхом додавання невеликих кількостей стерильних розчинів кислоти або лугу, а після стерилізації pH перевіряють, щоб забезпечити точність і відтворюваність досліджень.

У практиці мікробіологічних лабораторій найчастіше використовують pH-метри – прилади, що дозволяють швидко та точно виміряти показник водневих іонів у середовищі. Рідше застосовують індикаторні папірці, проте цей метод вважається менш точним і придатний лише для орієнтовного контролю.

Методика визначення pH живильних середовищ за допомогою pH-метра.

Перед вимірюванням прилад необхідно відкалібрувати. Для цього застосовують стандартні буферні розчини зі значенням pH 7,0 (обов'язковий), а також додатково pH 4,0 і 9,0 (або 10,0). Електрод pH-метра промивають дистильованою водою, обережно підсушують фільтрувальним папером і занурюють у відповідний буфер. Після стабілізації показників проводять калібрування приладу послідовно за всіма точками.

Досліджуване середовище перед вимірюванням охолоджують до кімнатної температури та ретельно перемішують. Електрод знову промивають, підсушують і занурюють у зразок так, щоб діафрагма була повністю занурена. Після стабілізації показників на дисплеї фіксують значення pH.

Якщо одержане значення не відповідає необхідному, проводять корекцію, додаючи невеликі кількості 0,1 н розчинів хлоридної кислоти (HCl) або гідроксиду натрію (NaOH). Після кожного додавання середовище перемішують і повторно вимірюють pH. Слід пам'ятати, що остаточне регулювання показника проводять до стерилізації, оскільки після автоклавування pH може змінюватися.

Після завершення вимірювань електрод промивають дистильованою водою та занурюють у спеціальний розчин для зберігання (зазвичай 3 M KCl). Це запобігає висиханню мембрани та продовжує термін служби приладу.

Під час роботи слід користуватися рукавичками та дотримуватися правил безпеки при роботі з кислотами та лугами.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують живильні середовища відповідно до інструкції на упаковці, визначають pH, фасують для автоклавування; використовуючи асептичну техніку розливають стерильний МПА в чашки Петрі, готують скошений агар в пробірках.*



Питання для самоконтролю

1. *Для чого потрібні живильні середовища?*
2. *Класифікація живильних середовищ.*
3. *Методика приготування простих живильних середовищ.*
4. *Середовище Ендо, призначення та методика приготування.*
5. *Яким чином визначається та регулюється pH середовищ?*

Лабораторне заняття 2.
ТЕХНІКА ПОСІВУ МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА, ВИДІЛЕННЯ ЧИСТИХ КУЛЬТУР

Мета заняття: *ознайомити студентів із основними методами посіву мікроорганізмів на різні живильні середовища, навчити техніці посіву за дотримання асептичних умов та методам отримання чистих культур.*

Матеріали та обладнання. *Живильні середовища у пробірках та чашках Петрі (МПБ, МПА, МПЖ), змішана мікробна культура (стафілокок-сапрофіт та непатогенна кишкова паличка), бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, скляні шпателі, спиртівки, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

У мікробіологічній практиці використовують комплекс правил і прийомів, спрямованих на забезпечення стерильності під час роботи з мікроорганізмами – *асептичну техніку*. Термін «асептичний» буквально означає «без контамінації». Така техніка є однією з основ мікробіологічної практики, оскільки дозволяє уникнути контамінації досліджуваних матеріалів сторонньою мікрофлорою, а також гарантує безпеку персоналу та довкілля. Від здатності фахівця дотримуватись правил асептики під час маніпуляцій з мікроорганізмами залежить достовірність отриманих результатів, успішність проведення експериментів і збереження чистоти мікробних культур.

Асептична техніка використовується практично у всіх напрямах мікробіологічних досліджень. Вона необхідна при пересіві культур для отримання чистих ізолятів, під час приготування мазків, а також при проведенні кількісних підрахунків мікроорганізмів у зразках харчових продуктах, при роботі з біологічним матеріалом та ін.

Асептична техніка ґрунтується на декількох ключових принципах:

1. Використання виключно стерильних інструментів, середовищ та посуду.
2. Створення умов, у яких кількість мікроорганізмів у повітрі мінімальна (робота біля полум’я або у ламінарному боксі).
3. Обмеження доступу повітря до відкритих пробірок і чашок, щоб запобігти осіданню мікробів із повітря.
4. Дезінфекція робочих поверхонь до і після роботи.
5. Використання захисного одягу і суворе дотримання правил гігієни.

Створення стерильного робочого простору є першою умовою успішної асептичної роботи. Завжди необхідно починати з підготовки робочого місця та маркування пробірок і чашок. Традиційно у мікробіологічних лабораторіях використовують спиртівку або газовий пальник. Полум’я створює висхідні конвекційні потоки, які відводять пил та мікроорганізми від робочої зони. У сучасних лабораторіях частіше застосовують ламінарні бокси, що гарантують стерильність робочого простору.

Другим важливим аспектом є використання стерильних матеріалів. Для цього застосовують різні методи стерилізації: автоклавування, сухий жар,

фільтрацію чи хімічні засоби. Металеві інструменти – бактеріологічні петлі, голки, шпателі – прожарюють (фламбують) у полум'ї до почервоніння перед і після кожного використання. Це дозволяє уникнути перенесення мікроорганізмів між культурами. Поживні середовища готують у стерильних умовах і зберігають у закритих ємностях до моменту використання.

Асептична техніка передбачає чітке дотримання правил поводження з лабораторним посудом і культурами. Пробірки та чашки Петрі відкривають лише на мінімальний час і завжди поруч із полум'ям або у стерильній зоні боксу. Кришки тримають під кутом, не залишаючи їх відкритими на столі.

Посів мікроорганізмів на щільне живильне середовище. Посів мікроорганізмів на щільне живильне середовище є одним із найважливіших методів у мікробіологічній практиці, оскільки дозволяє отримати ізольовані колонії, виділити чисті культури та дослідити морфологічні властивості мікроорганізмів.

Посів на скошений агар у пробірці. Пробірки з посівним матеріалом та скошеним агаром беруть у ліву руку так, щоб скошена поверхня агару була зверху. Тримаючи у правій руці бактеріологічну петлю, ретельно її фламбують. Потім мізинцем правої руки відкривають пробірку (пробку утримують мізинцем), знезаражують полум'ям її краї, простерилізованою петлею беруть посівний матеріал й переносять у пробірку із стерильним живильним середовищем. Петлю із матеріалом обережно проводять по поверхні скошеного агару знизу догори, не торкаючись стінок пробірки. Посів виконують плавним рухом, щоб утворилася рівномірна хвиляста смужка на поверхні середовища. Після закінчення інокуляції петлю знову фламбують у полум'ї до почервоніння.

Краї пробірки повторно обпалюють у полум'ї, після чого пробку вставляють назад у горловину пробірки. Посіви розміщують у штативі так, щоб етикетка була добре видима; інкубують у термостаті у вертикальному положенні за оптимальної для мікроорганізму (відомого чи ймовірного) температурі.

Посів на агар у чашці Петрі. Бактеріологічну петлю перед кожним використанням профламбовують у полум'ї до почервоніння та охолоджують протягом кількох секунд. Далі обережно відкривають пробірку з культурою біля полум'я, стерильною петлею відбирають невелику кількість матеріалу, закривають пробірку і наносять його на поверхню агару в чашці Петрі. Нанесений матеріал ретельно розподіляють на поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя або здійснюють посів методом штрихів.

Метод штрихів (штриховий метод) – нанесення матеріалу на поверхню середовища паралельними лініями (штрихами). В результаті такого посіву кожний наступний штрих, у порівнянні з попереднім, містить менше мікроорганізмів, що підвищує ймовірність росту ізольованих колоній.

Після внесення інокулюму чашки Петрі, у перевернутому положенні (щоб уникнути потрапляння конденсату на поверхню середовища) поміщають у термостат для інкубації.

Посів у рідке живильне середовище. Посів у МПБ чи інше рідке середовище здійснюють із використанням бактеріологічної петлі чи піпетки.

Бактеріологічну петлю з набраним матеріалом обережно занурюють у середовище та розподіляють інокулят уздовж стінки пробірки. Пастерівську піпетку також занурюють у середовище і видувають набраний матеріал. Після посіву бактеріологічну петлю стерилізують фламбуванням, а пастерівську піпетку знезаражують і утилізують.

Примітка. Слід мати на увазі, що спори деяких мікроорганізмів, зокрема збудників сибірки, ботулізму й правця не руйнуються при 100°С протягом тривалого часу то ж мікробіолог зобов'язаний аналізувати ймовірність контамінації термофілами досліджувані матеріали та застосовувати ефективні методи їх інактивації. Це ж стосується і патогенних пріонів які не є мікроорганізмами, проте здатні викликати у людини і тварин тяжкі захворювання (спонгіозні енцефалопатії).

Особливості культивування анаеробних мікроорганізмів. Анаеробні мікроорганізми ростуть та розмножуються за відсутності кисню, деякі здатні розвиватись в мікроаерофільному середовищі. Для виділення й культивування анаеробів використовують спеціальні живильні середовища або створюють анаеробні умови іншим шляхом (штучно).

Вирощування на середовищі Кітт–Тароцці

Середовище Кітт–Тароцці являє собою м'ясо-пептонний печінковий бульйон. Перед посівом середовище регенерують: бульйон (в пробірках чи ін.) кип'ятять у водяній бані 10–15 хвилин, після чого швидко охолоджують під струменем води. Під час кип'ятіння з середовища видаляється кисень, а шар вазелінової олії запобігає його повторному проникненню. Матеріал вводять у бульйон бактеріологічною петлею або за допомогою піпетки, обережно проходячи через шар олії.

Методи створення анаеробних умов

Анаеробні умови для мікроорганізмів можна створити різними методами – фізичними, хімічними і біологічним.

Фізичний метод. Використовують вакуумні насоси для відкачування повітря з анаеростата або спеціального ексикатора. Забезпечується прямий контроль над наявністю кисню.

Хімічний метод традиційно реалізують за допомогою хімічних речовин, що поглинають кисень. Наприклад, у ексикатор ставлять чашку з 10 %-м розчином пірогалолу та їдким натром або сумішшю гідросульфіту натрію та соди. Пробірки чи чашки з анаеробами розташовують на фарфоровій підставці, щільно накривають покришкою, краї якої попередньо змащують вазеліном, і поміщають у термостат.

Сучасна модифікація хімічного методу передбачає використання *анаеробних пакетів (air-bag).* Це герметичні пакети, які містять хімічні компоненти, що швидко поглинають кисень, створюючи анаеробне середовище. Пакети оснащені індикаторами, які змінюють колір при досягненні необхідних умов. Метод зручний, швидкий і не вимагає складного обладнання, забезпечує контроль над анаеробними умовами та дозволяє інкубувати проби при оптимальній температурі.

Біологічний метод полягає у взаємодії аеробів і анаеробів на твердому живильному середовищі. Для цього по діаметру чашки вирізують вузьку смужку середовища, отримуючи дві ізольовані частини. На одну частину висівають аероби, на іншу – анаероби. Чашку накривають покришкою, щілину закривають ватою та фіксують пластиром або парафінованим папером. Аероби споживають

Методи отримання (виділення) «чистої культури» бактерій

Вирощені на живильних середовищах мікроорганізми називають мікробною культурою. Вона може бути «чистою», яка містить лише один вид мікроорганізмів, і змішаною, якщо ростуть два та більше видів.

Мікроорганізми зазвичай знаходяться в змішаних культурах. Для того, щоб їх вивчити (перш за все з метою визначення виду), спочатку необхідно одержати чисту культуру.

Розроблені та використовуються різні методи отримання чистих культур мікроорганізмів, зокрема метод Дригальського-Конраді, метод штрихового посіву, метод десятикратних розведень та ін.

Метод Дригальського-Конраді. Беруть кілька (3–5) бактеріологічних чашок з МПА або іншим щільним середовищем. У першу вносять краплю досліджуваного матеріалу та стерильним шпателем рівномірно розподіляють по поверхні середовища, а потім, відразу переносять його у другу чашку, і матеріал, що залишився на шпателі, засівають на поверхні середовища, далі на 3-ю та (за потреби) на 4-у, 5-ту таким же чином. Посіви інкубують у термостаті та з ізольованих колоній здійснюють пересіви на аналогічне середовище (в пробірках чи бактеріологічних чашках).

Метод штрихового посіву розроблений Робертом Кохом наприкінці XIX століття і вважається класичним для виділення чистих культур мікроорганізмів. Суть методу полягає у поступовому зменшенні концентрації мікроорганізмів з кожним наступним штрихом, що дозволяє отримати ріст ізольованих колоній мікроорганізмів.

Нині запропоновано різні схеми нанесення штрихів (модифікації методу Р. Коха), проте їх суть залишається незмінною: після нанесення кожного штриха бактеріологічну петлю не стерилізують, а наступний штрих виконують, злегка торкаючись попереднього, що забезпечує поступове розрідження бактеріальних клітин і отримання ізольованих колоній (рис. 1.25).

Метод серійних (десятикратних) розведень – модифікований метод Пастера. Беруть 7–10 пробірок із стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію або МПБ (по 9–10 мл) (рис. 1.26). У першу пробірку вносять невелику кількість досліджуваного матеріалу (1 мл), перемішують. Таку ж кількість вмісту першої пробірки переносять у другу, а після перемішування – у третю, четверту і т. д.

З кожним наступим розведенням концентрація мікроорганізмів знижується. Далі з кількох пробірок (як правило, з останніх) здійснюють посів на щільне живильне середовище у бактеріологічних чашках. З ізольованих колоній, що виростуть роблять відсіви.

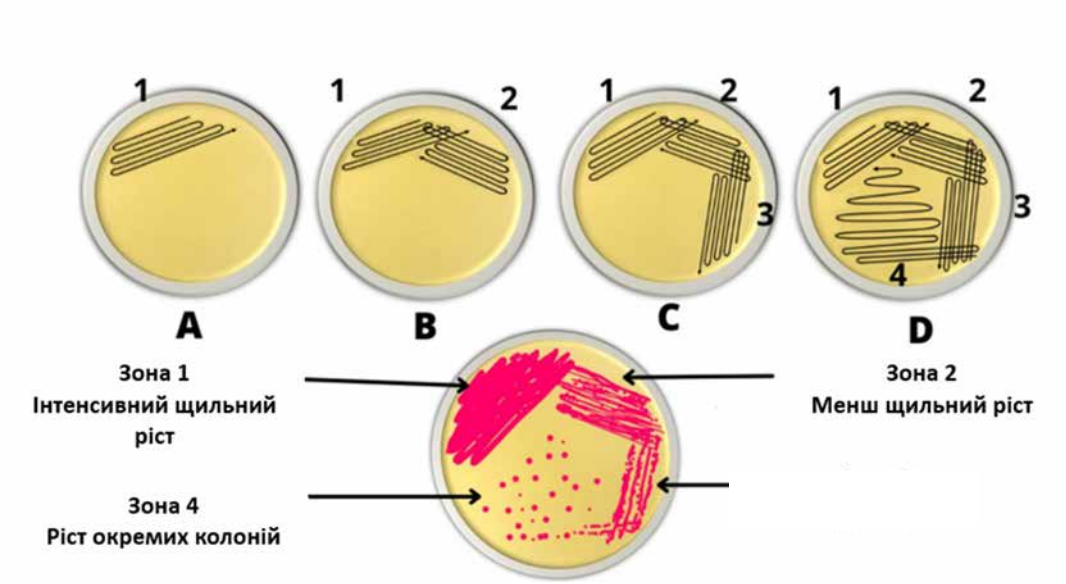


Рис.1.25. Метод штрихового посіву

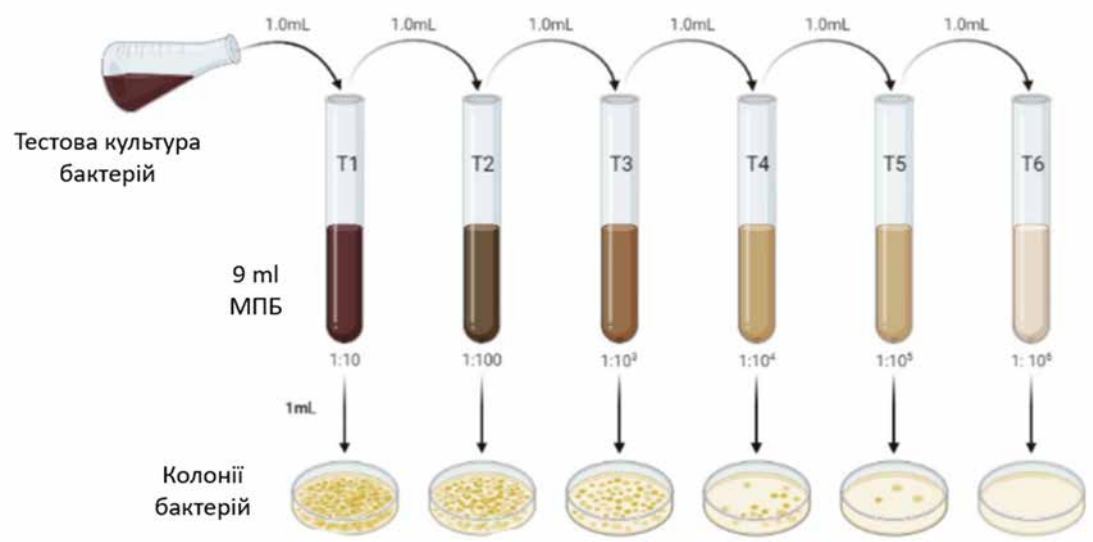


Рис. 1.26. Метод серійних (десятикратних) розведень

Метод виділення чистої культури рухливих бактерій, розроблений В. М. Шукевичем, ґрунтується на використанні скошеного агарового середовища. Досліджуваний матеріал вносять у конденсаційну рідину скошеного МПА у пробірці і ставлять (вертикально) її в термостат для інкубації за оптимальних температурних умов. Рухливі бактерії завдяки своїй здатності активно пересуватися розповсюджуються по поверхні середовища значно швидше, ніж нерухливі види. В результаті цього у верхній частині середовища формуються заселена ними ділянка, пересів з якої забезпечує ріст чистої культури.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти здійснюють посіви на рідкі, напіврідкі та щільні живильні середовища, а також відпрацьовують методи отримання «чистих культур» бактерій.*

Питання для самоконтролю

1. *Охарактеризуйте поняття «асептика» та «антисептика».*
2. *Назвіть методи отримання чистих культур мікроорганізмів.*
3. *Яка мета штрихового посіву в процесі отримання чистої культури мікроорганізму?*
4. *У чому полягає принцип виділення чистої культури бактерій методом Дригальського-Конраді?*

Лабораторне заняття 3.
КУЛЬТУРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів з основними культуральними властивостями мікроорганізмів, навчити правильно характеризувати ознаки їх росту на щільних і рідких живильних середовищах, описувати морфологію колоній та інтерпретувати результати спостережень для подальшої ідентифікації мікроорганізмів.*

Матеріали та обладнання*. Мікробні культури, вирощені на рідких та щільних живильних середовищах, мікроскопи, лупи, маркер, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Під *культуральними властивостями* мікроорганізмів розуміють характеристику (ознаки) їх росту на живильних середовищах.

Ознаки росту мікроорганізмів використовують у процесі їх ідентифікації. У зв'язку з тим, що вони з часом можуть змінюватись, необхідно визначати їх у молодих культурах бактерій, – переважно у 16–18 та 24–28-годинних).

Ознаки росту бактерій на рідких живильних середовищах. Ознаками росту бактерій у МПБ можуть бути помутніння середовища, утворення осаду, плівки.

Ступінь помутніння може бути різним: інтенсивним, помірним, слабким, у вигляді опалесценції. Деякі види бактерій помутніння не викликають.

*Поверхневий ріст б*уває у вигляді плівки і кільця при стінці. Розрізняють тоненькі і грубі, суцільні й сітчасті, складчасті, крихкі й слизькі та різні за кольором (білі, сірі, жовтуваті й ін.) плівки.

Осад може бути значним, незначним, зернистим, пилоподібним, у вигляді шматочків вати, пластівців та різним за кольором – сіруватим, білим, жовтим, зеленуватим. При струшуванні пробірки осад, залежно від його характеру, може обумовлювати рівномірне помутніння середовища, утворення різних за розміром пластівців, крихт тощо. Слизоподібний осад при струшуванні пробірки піднімається угору у вигляді «косички».

У різних видів бактерій ознаки росту можуть бути неоднаковими.

Ріст мікроорганізмів на твердих живильних середовищах. На твердих живильних середовищах мікроорганізми утворюють колонії. Останні у бактерій різних видів різняться між собою (рис. 1.27). Вивчають їх неозброєним оком та за використання лупи чи світлового мікроскопу (об'єктив 8×). Спочатку визначають наявність та характер росту. Він може бути пишним, помірним та бідним. Потім вивчають окремі колонії, звертають увагу на їхні основні ознаки: розмір, форму, колір, консистенцію тощо.

За розміром колонії мікроорганізмів бувають дрібними (1–2 мм), середніми (2–4 мм), крупними (діаметр понад 4 мм), мізерними («колонії-росинки» діаметром до 1 мм); за кольором – безбарвні (напівпрозорі з сіруватим відтінком), білі, жовті та ін. Форма колоній може бути круглою, овальною, нитчастою та ін.

Важливо також визначити профіль колоній, роздивлятись їх краї й поверхню, прозорість та консистенцію. Залежно від виду мікроорганізму, профіль колоній може бути плоским, опуклим, куполоподібним навпаки – з поглибленням у центрі, краї – рівними, хвилястими, зубчастими, бахромчастими та ін., поверхня – блискучою або матовою, вологою чи сухою та ін., прозорість – також різною (прозорі, напівпрозорі та непрозорі колонії), консистенція – слизоподібною, маслянистою, структура – однорідною або зернистою. Визначають також як легко колонія знімається з поверхні середовища (за допомогою бактеріологічної петлі).



Рис. 1.27. Форми колоній бактерій

Колонії, що мають рівні краї та гладку поверхню, відносять до- S-форми, **а** колонії з нерівними краями і шорсткою поверхнею – до R-форми.

Характеристика росту мікроорганізмів на напіврідкому м'ясо-пептонному агарі та МПЖ. При посіві методом уколу більшість

мікроорганізмів утворюють білуватий стержень. Рухливі зумовлюють помутніння середовища різної інтенсивності у вигляді хмаринок. Аероби ростуть ближче до поверхні середовища, анаероби – на дні, факультативні анаероби – по всій товщі стовпчика. Мікроорганізми, які мають протеолітичні ферменти, розріджують желатину. Інтенсивність та форми розрідження можуть бути різними, що залежить від виду мікроорганізмів й інших факторів.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти враховують та описують культуральні властивості різних видів мікроорганізмів, вирощених на рідких та щільних живильних середовищах.*

Питання для самоконтролю

1. З якою метою визначають ознаки росту мікроорганізмів на жильних середовищах?

2. Охарактеризуйте ознаки росту мікроорганізмів на щільних живильних середовищах.

3. Ознаки росту мікроорганізмів на напіврідких живильних середовищах ?

Лабораторне заняття 4.
ВИВЧЕННЯ ФЕРМЕНТАТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів з основними ферментативними властивостями мікроорганізмів, значенням їх визначення в процесі ідентифікації мікроорганізмів та під час діагностики обумовлених ними захворювань у людини і тварин; відпрацювати методи виявлення мікробної каталази, оксидази та уреази.*

Матеріали та обладнання. *Набори середовищ та реактивів для визначення цукролітичних, протеолітичних, оксидазо-каталазних та редукуючих властивостей мікроорганізмів; мікробні культури (бульйонні, агарові): непатогенні ешерихії, стафілококи та ін., бактеріологічні петлі, пастерівські піпетки, спиртівки (газові горілки), контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Ферменти мікроорганізмів, як і ферменти макроорганізмів, є біологічними каталізаторами всіх без винятку процесів їхньої життєдіяльності. Багато мікробних ферментів також виступають факторами патогенності у різних видів.

Залежно від ферментативного профілю (відносно постійного та характерного для певного виду елементу) мікроорганізми здатні розщеплювати (ферментувати) цукри й білки, відновлювати прості сполуки. Визначення протеолітичних, цукролітичних та редукуючих властивостей широко застосо-

вують під час ідентифікації мікроорганізмів та виявлення факторів їхньої патогенності.

Визначення цукролітичних властивостей. Цукролітичні властивості – це здатність мікроорганізмів ферментувати цукри (глюкозу, лактозу, маніт, сахарозу тощо) з утворенням кислоти, газу або спирту. Ці властивості є важливою діагностичною ознакою, що допомагає розрізняти види бактерій, особливо серед ентеробактерій. Їх визначають за допомогою спеціальних середовищ, зокрема середовища Гіса, до якого додають різні види цукрів, так званий «строкатий ряд». Його готують на основі пептонної води, цукру (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза, маніт, дульцит, сорбіт та ін.), додають індикатор Андраде. Якщо досліджуваний мікроорганізм розщеплює певний цукор, утворюються органічні кислоти, що впливає на pH середовища, обумовлює зміну його кольору (у даному випадку на червоний). Для визначення можливого газоутворення у пробірку встановлюють скляний «поплавок» (маленька пробірка, перевернута в середовищі).

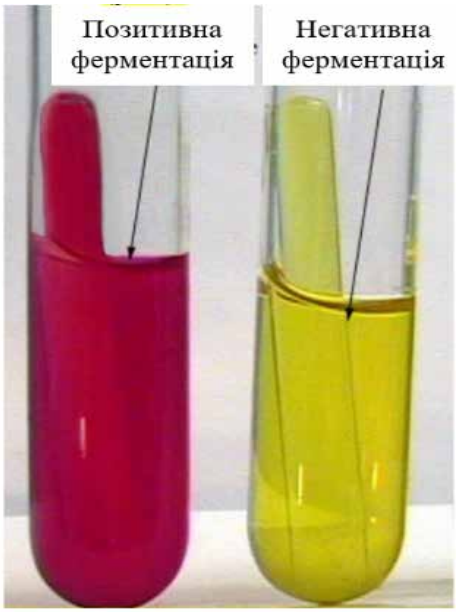


Рис.1.28. Середовище Гіса
(Джерело: https://foodtechnotes.com/wp-content/uploads/2020/07/Durhams-tube.jpg)

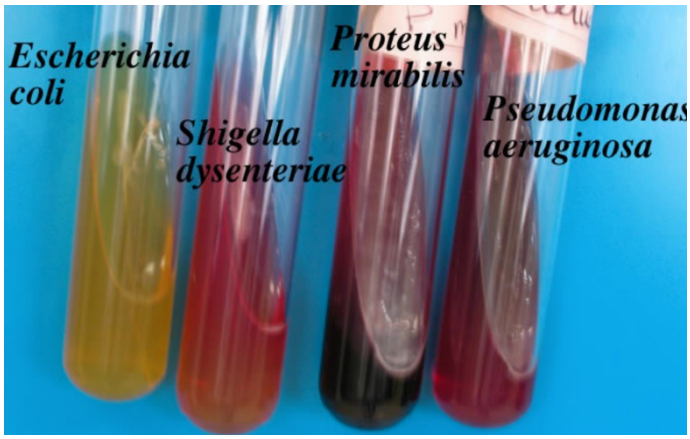


Рис. 1.29. Колекція пробірок з різними видами бактерій (*Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa*) на середовищі Кліглера
(Джерело: https://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab16/Lab16KIA.JPG)

В процесі визначення цукролітичних властивостей бульйонну чи агарову культуру досліджуваного мікроорганізму висівають у пробірки з рідким середовищем Гіса з різними цукрами (інколи використовують напівщильне середовище Гіса, що містить 0,25–0,30 % агар-агару).

Результати враховують після 24–48-годинного інкубування при 35–37 °С. Якщо мікроорганізм не ферментує цукру, який входить до складу середовища Гіса, останнє не змінює свого кольору. Зміна кольору середовища на червоний (при використанні індикатора Андраде), означає, що цукор розкладається з

утворенням кислоти. Якщо при цьому утворюється й газ, його спостерігають у поплавку (витісняє середовище) або у вигляді бульбашок у товщі напівщільного середовища (рис. 1.28).

З метою визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів інколи застосовують і тверді поживні середовища, які дозволяють одночасно оцінити ферментацію вуглеводів, утворення газу, сірководню чи інших продуктів метаболізму. Наприклад, *середовище Кліглера* для визначення здатності бактерій ферментувати глюкозу і лактозу, а також для виявлення утворення сірководню (H_2S) та газу. При ферментації глюкози дно пробірки забарвлюється у жовтий колір; якщо бактерії ферментують і лактозу – жовтіє і скошена частина середовища; утворення газу супроводжується утворенням тріщин або підняттям агару; утворення H_2S спричинює почорніння дна (рис. 1.29).

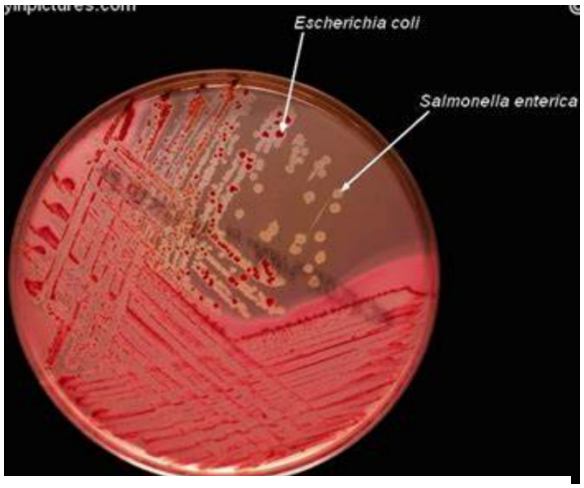


Рис.1.30. Колонії *E. coli* (рожеві) і *Salmonella enterica* (світлі, лактозонегативні колонії) на МакКонкі агарі



Рис. 1.31. Тест-система API 20E

Також використовують *середовище Ендо* або *МакКонкі* для виявлення бактерій, що ферментують лактозу, особливо серед ентеробактерій. В цьому випадку лактозопозитивні бактерії (*E. coli*, *Enterobacter*) утворюють рожеві або червоні колонії, а лактозонегативні (*Salmonella*, *Shigella*) – безбарвні або бліді колонії (рис. 1.30).

Середовище Левіна містить еозин і метиленовий синій як індикатори ферментації лактози. Позитивна реакція (ферментація) – темно-фіолетові або металево-зелені колонії (*E. coli*); негативна – безбарвні або світлі колонії (*Salmonella*, *Proteus*).

У практичній роботі широко застосовують сучасні *тест-системи*, зокрема *API 20E* (рис. 1.31) та *ENTEROtest*. Ці мікробіологічні набори містять мікрокапсули з різними вуглеводними субстратами, у яких за впливу мікробних ферментів відбувається зміна кольору. На основі отриманого ферментативного профілю здійснюють ідентифікацію мікроорганізмів до виду.

Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів

Протеолітичні властивості – здатність мікроорганізмів ферментувати білки, пептони, желатин, казеїн тощо за допомогою протеаз, пептидаз,

декарбоксилаз. З метою визначення протеолітичних властивостей мікробну культуру висівають на МПЖ або на молочний агар. Ступінь протеолізу білка визначають за наявністю індолу, сірководню та ін.

Тест на розрідження желатину. Посів на МПЖ здійснюють уколом за допомогою бактеріологічної голки. Якщо мікроорганізм здатний розвиватись за температури 20–22 °С посів інкубують за кімнатних умов, мікроорганізми-мезофіли – у термостаті (38 °С). Якщо інкубацію здійснювали у термостаті перед оцінкою результату пробірки охолоджують під струменем води. Про наявність протеолітичного ферменту свідчить розрідження желатини. Воно може відрізнятись як за інтенсивністю, так і за формою, що залежить, перш за все, від виду мікроорганізму.

Тест на гідроліз казеїну. Цей тест дозволяє визначити, чи здатні мікроорганізми розщеплювати білок казеїн у молоці.

Для проведення тесту використовують молочний агар, який містить 3–5% пастеризованого молока. Досліджувану культуру висівають на поверхню середовища та інкубують при 35–37 °С протягом 24–48 годин. Після інкубації оцінюють результат: якщо навколо колонії утворилася прозора зона – реакція позитивна, білок казеїн розщеплюється. Якщо колонія росте на непрозорому молочному фоні – реакція негативна, гідроліз білка не відбувся.

Розщеплення білків частіше супроводжується виділенням індолу, сірководню, деяких інших газів, наявність яких свідчить про протеолітичну активність мікробних культур.

Визначення індолу. Індольний тест використовується для визначення наявності ферменту триптофанази у бактерій. Цей фермент розкладає амінокислоту триптофан у середовищі, утворюючи індол, аміак та піровиноградну кислоту.

Для тесту використовують триптофановий бульйон або інші відповідні середовища, що містять амінокислоту триптофан. Досліджувану бактерію вносять у середовище за допомогою асептичної техніки, пробірки інкубують при 35–37 °С протягом 24–48 годин (іноді до 72 годин для повільноростучих культур). Після завершення інкубації у пробірку додають кілька крапель *реактиву Ковача* і оцінюють результат. Поява вишнево-червоного кольору на поверхні середовища вказує на позитивну реакцію, мікроорганізм продукує триптофаназу і утворює індол. Якщо середовище залишилось незабарвленим, роблять висновок, що мікроорганізм не містить ферменту триптофанази.

Визначення сірководню. Деякі бактерії розщеплюють сірковмісні амінокислоти, утворюючи сірководень (H_2S). Для визначення здатності мікроорганізму ферментувати сірковмісні сполуки використовують середовище Кліглера (рис. 1.29). Середовище розливають у стерильні пробірки (по 5–6 мл), стерилізують проточною парою протягом 20 хв, готують косяки. Висівають спочатку на поверхню агару, потім – уколом у нижню частину стовпчика. При наявності сірководню середовище червоніє, а нижня його частина чорніє. H_2S реагує з солями заліза у середовищі і утворює чорний осад.

Визначення редукуючих властивостей. Редукуючі властивості показують здатність мікроорганізмів відновлювати окиснені сполуки, наприклад

нітрати до нітритів, сульфати до сірководню, метиленовий синій – до знебарвлення.

У мікробіологічній практиці для виявлення наявності ферменту редуктази посів здійснюють у молоко з метиленовим синім. У пробірку з 5 мл стерильного знежиреного молока (pH 7,1), яке містить метиленовий синій, вносять досліджувану мікробну культуру. Інкубують при температурі 37 °С протягом 24 годин.

За наявності ферменту редуктази (позитивна реакція) середовище знебарвлюється або набуває кремового чи зеленого кольору, що залежить від концентрації мікробної редуктази. За відсутності редуктази (негативна реакція) колір середовища не змінюється.

Визначення оксидазно-каталазних властивостей у мікроорганізмів

Оксидазно-каталазні властивості характеризують участь мікроорганізмів в окисно-відновних процесах дихання, здатність використовувати кисень як кінцевий акцептор електронів. Для характеристики цих властивостей мікроорганізмів проводять тести на каталазу та оксидазу.

Визначення каталази. Фермент каталаза розщеплює перекис водню (H_2O_2) на воду і кисень. Утворення пухирців газу після внесення перекису водню у рідину (суспензію) з мікроорганізмом свідчить про його здатність синтезувати нейрамідазу. Запропоновано кілька методів виявлення нейрамідазопродукуючих мікроорганізмів.

1. Добову мікробну культуру, вирощену на МПБ, змішують у рівних об'ємах із 10 %-м розчином перекису водню (1 мл культури + 1 мл H_2O_2). За наявності каталази спостерігають інтенсивне газоутворення.

2. На чисте предметне скло наносять краплю 3–10 %-го розчину перекису водню і додають невелику кількість культури з агарової поверхні. Утворення пухирців газу впродовж кількох секунд свідчить про позитивну каталазну реакцію. *На предметному склі (прискорений метод).*

3. На поверхню агарової культури наносять краплю 1 % розчину H_2O_2. Поява пухирців навколо колоній – позитивний результат.

Тест не проводять із культурами, вирощеними на середовищах, що містять кров або її компоненти (каталаза еритроцитів може дати хибнопозитивну реакцію).

Визначення оксидази. Оксидазна активність свідчить про наявність у мікроорганізму ферменту цитохромоксидази, який бере участь у процесах дихання. Фермент каталізує перенесення електронів на кисень з утворенням води. У присутності спеціальних індикаторів (наприклад, тетраметил-р-фенілендіаміну) фермент окислює безбарвну сполуку з утворенням темно-фіолетового або синього продукту.

На чисте предметне скло або фільтрувальний папір наносять 1–2 краплі 1 %-го розчину тетраметил-р-фенілендіаміну або діметил-парафенілендіаміну. Користуючись бактеріологічною петлею, додають невелику кількість агарової культури мікроорганізму, суспендують та спостерігають за зміною кольору суспензії протягом 10–30 секунд. За наявності оксидази суспензія набуває

темно-синього кольору, в інших випадках – зміни її кольору не спостерігають. Важливо пам'ятати, що за більш тривалого ніж 30 секунд спостереження колір суспензії може змінитись і без наявності мікробної оксидази.

Тест використовують в процесі диференціації аеробних і факультативно-анаеробних бактерій, зокрема для диференціації *Pseudomonas* (оксидазо-позитивні) від *Enterobacteriaceae* (оксидазонегативні).

Визначення гемолітичних властивостей. Здатність мікроорганізмів руйнувати еритроцити крові називають гемолітичною активністю. Цю властивість зумовлюють ферменти – гемолізини, які виділяються мікроорганізмами під час росту.

Гемолітичну активність мікроорганізмів визначають зазвичай шляхом культивування їх на кров'яному агарі. Середовище готують безпосередньо перед використанням (*ex tempore)*. У розплавлений та охолоджений до 50–55 °С МПА вносять 5 % (5 мл крові на 100 мл МПА) дефібринованої крові (частіше баранячої інколи кролячої), ретельно перемішують та розливають у бактеріологічні чашки.

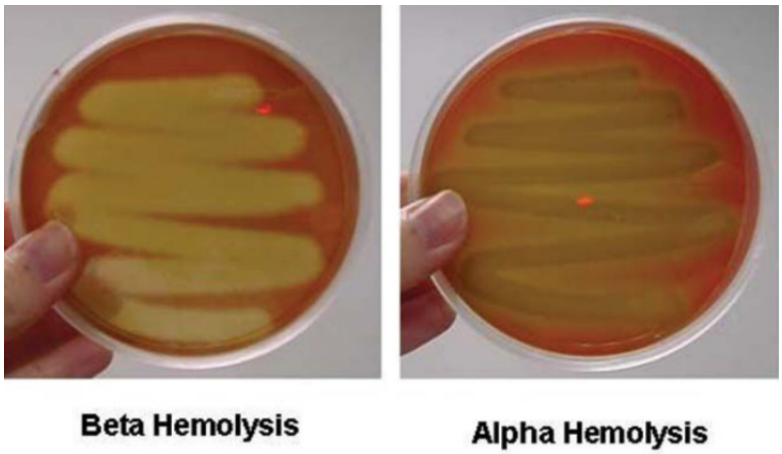


Рис. 1.32.Чашки з кров'яним агаром з ознаками наявності мікробних гемолізинів – *β-гемоліз* та *α-гемоліз*

Посів досліджуваних мікроорганізмів на кров'яний агар здійснюють штриховим методом (з метою отримання росту ізольованих колоній). Інкубують у термостаті при 35–37 °С протягом 24 годин (за певних обставин – до 48 год) та визначають наявність і характер ознак гемолізу навколо ізольованих колоній.

За наявності мікробних гемолізинів відбувається повне (*β-гемоліз)* або часткове (*α-гемоліз)* руйнування еритроцитів. У першому випадку навколо колоній спостерігають чітку прозору зону, в останньому – недостатньо прозору з зелено-бурим відтінком зону (рис.1.32).

Якщо мікроорганізм гемолізинів не продукує, будь-яких змін середовища навколо його колоній не спостерігається.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти здійснюють посів на «строкатий ряд» для вивчення цукролітичних властивостей бактерій, Тест на розрідження желатину для визначення протеолітичних властивостей, визначають здатність індукувати утворення індолу, сірководню, визначають редукуючі та оксидазно-каталазні властивості.*

Питання для самоконтролю

1. Які властивості мікроорганізмів вважають ферментативними?
2. Методика визначення цукролітичних властивостей мікроорганізмів.
3. Як визначають протеолітичні властивості мікроорганізмів?
4. Принципи визначення редуктазної активності мікроорганізмів.
5. Методи визначення гемолітичних властивостей у мікроорганізмів?

Тема 9. ВИЗНАЧЕННЯ ВИДУ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів з основними принципами і методами ідентифікації мікроорганізмів до виду на основі їх морфологічних, культуральних, біохімічних та генетичних характеристик, користуючись посібниками-визначниками.*

Матеріали та обладнання. *Методичні вказівки щодо визначення виду мікроорганізмів та відповідні посібники (визначник бактерій Берджі та ін.). Попередньо складені завдання по визначенню виду мікроорганізмів (умовні результати досліджень різноманітних властивостей мікроорганізму, необхідних для їх ідентифікації).*

Важливим для мікробіолога є питання видової належності об'єкта дослідження. Так, щоб поставити бактеріологічний діагноз інфекційного захворювання, слід ідентифікувати збудника.

У лабораторній практиці ідентифікація мікроорганізмів проводиться послідовно, починаючи з мікроскопічного дослідження. Зазвичай мікроскопують мазки, пофарбовані за методом Грама, отримані з різних матеріалів від хворої тварини або від тварини, що загинула. Результати мікроскопії часто дозволяють поставити попередній діагноз та розпочати превентивні заходи з локалізації ймовірного захворювання.

У будь-якому випадку, навіть якщо під час мікроскопії мікроорганізми не виявлені, здійснюють посіви на живильні середовища (МПБ, МПА та ін.), які інкубують за оптимальних умов для ймовірного збудника хвороби. За появи ознак росту мікроорганізмів у рідкому середовищі (помутніння) або на твердому (поява ізольованих колоній чи ознак суцільного росту) вивчають характер колоній. Особливу увагу звертають на їх розмір, форму, колір, структуру поверхні, консистенцію та інші морфологічні ознаки.

Готують мазки з отриманих культур, фарбують їх за Грамом (а за потреби – іншими методами) та мікроскопують, визначаючи розмір і форму мікроорганізмів, наявність капсул і спор, а також оцінюючи їх тинкторіальні особливості. У випадках, коли спостерігають ріст кількох видів мікроорганізмів, виконують пересіви для отримання чистих культур.

Остаточну ідентифікацію ізолятів здійснюють шляхом вивчення їх ферментативних та інших властивостей. Зокрема, визначають пігментоутворення, здатність до гемолізу еритроцитів крові, а за наявності відповідних можливостей – застосовують специфічні діагностичні сироватки. Наприклад, антисальмонельозні О-сироватки дозволяють не лише ідентифікувати збудника сальмонельозу, а й визначити, до якої серогрупи він належить – A, B, C, D чи E.

З розвитком *молекулярно-генетичних технологій* ідентифікація мікроорганізмів стала більш точною та оперативною. Нині дедалі частіше застосовують *генетичні маркери*, зокрема аналіз послідовностей 16S rRNA-гену, повногеномне секвенування (WGS), *ДНК–ДНК-гібридизацію* або цифровий її аналог ANI (Average Nucleotide Identity), MLST (Multilocus Sequence Typing) тощо. Ці методи дозволяють встановити родову і видову належність мікроорганізмів із високою точністю, без необхідності повного фенотипового тестування.

В процесі розробки методології класифікації та ідентифікації мікроорганізмів були створені посібники-визначники (Bergey, 1923; Ціон; 1948; Красильников,1949). Загальновизнаним й найбільш авторитетним вважається визначник американського мікробіолога Дейвіда Хендрикса Берджі (David Hendricks Bergey) який періодично перевидається з урахуванням новітніх здобутків мікробіології, генетики й молекулярної біології. У популярному, зручному для лабораторної практики, 9-му виданні 1994 р (перевиданому у 2000 р.) за назвою «*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*» усі відомі на той час види бактерій згруповані у 35 груп за фенотиповими ознаками (морфологія, забарвлення за Грамом, відношення до кисню та ін.).

У сучасних виданнях визначника враховані філогенетичні відносини мікроорганізмів. Друге видання *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (виходило частинами з 2001 по 2012 рік) складається з 5 томів, побудованих за філогенетичним принципом (на основі аналізу 16S рРНК):

- *Том 1 (2001): Археї, глибоко розгалужені та фототрофні бактерії.*
- *Том 2 (2005): Протеобактерії (у трьох частинах).*
- *Том 3 (2009): Фірмікути (Firmicutes).*
- *Том 4 (2010): Бактероїди, спірохети, тенерікути та інші групи.*
- *Том 5 (2012): Актинобактерії.*

З 2015 року проект перейшов у цифровий формат із назвою «*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB)*» (офіційна сторінка: *https://www.bergeys.org/publications/?utm_source=chatgpt.com*). Це постійно поновлювана онлайн-енциклопедія, яка є найбільш актуальним джерелом з таксономії прокаріотів.

Як користуватись визначником?

Перед початком роботи рекомендується ознайомитися з передмовою, щоб зрозуміти принципи систематизації, які застосували автори. У вступних розділах детально описано послідовність етапів ідентифікації мікроорганізму, яка включає:

1. Ознайомлення зі схемами ідентифікації.

2. Визначення, чи належить мікроорганізм до прокаріотів або еукаріотів.
3. Встановлення, до якої групи належить прокаріот:
   - грамнегативні бактерії зі стінкою,
   - грампозитивні бактерії зі стінкою,
   - бактерії без клітинної стінки,
   - археї.
4. Уточнення належності до відповідної таксономічної групи.
5. Визначення роду.
6. Визначення виду.

Завершальним етапом є порівняння отриманих результатів із діагностичними таблицями або сучасними тест-системами (наприклад, API, ENTEROtest), які дозволяють точно визначити вид мікроорганізму за сукупністю його ознак.

Під час остаточної ідентифікації мікроорганізмів часто використовують *типові (референтні) штами* з колекцій культур (ATCC, DSMZ, NCYC). Порівняння із ними за молекулярними, фенотиповими та культуральними ознаками дозволяє підтвердити видову приналежність ізоляту.

Завдання для самостійної роботи студентів. С*туденти вирішують завдання по визначенню виду мікроорганізму з заданими морфологічними, культуральними та біохімічними характеристиками, користуючись посібником-визначником Берджі.*



Питання для самоконтролю

1. *Що означають поняття «вид» та «рід» у мікробіології?*
2. *Охарактеризуйте етапи бактеріологічного дослідження в процесі ідентифікації збудників інфекційних захворювань.*
3. *Назвіть відомі визначники мікроорганізмів.*
4. *Охарактеризуйте структуру останнього видання визначника Берджі.*

Тема 10. ВПЛИВ БІОЛОГІЧНИХ ФАКТОРІВ НА БАКТЕРІЇ

Мета заняття: *ознайомити студентів з біологічними факторами що впливають на мікроорганізми – бактеріофагами, антибіотичними речовинами.*

Матеріали та обладнання. *Бактеріологічні чашки з МПА, шпателі, пастерівські піпетки, набір дисків з різними антибіотичними препаратами, суспензія бактеріофагу (коліфаг чи ін.), контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Бактеріофаги (фаги) – це віруси, що паразитують у бактеріях, зумовлюють їх лізис, який називають *бактеріофагією*. Бактеріофаги мають надзвичайно малі розміри та здатні проходити крізь бактеріальні фільтри. Форма фагів переважно булавоподібна. У них розрізнюють гексагональну голівку діаметром близько 100 нм й хвостовий відросток, який закінчується особливими шипами, або виростами. В середині голівки знаходиться молекула ДНК й лише у деяких фагів – РНК.

Явище бактеріофагії високоспецифічне, тобто конкретний фаг здатний зумовити літичну дію відносно певного виду бактерій. Наприклад, сибірковий фаг паразитує лише в клітинах збудника сибірки і не може проникнути у клітини будь-якого іншого мікроба.

У природі фаги виявляють скрізь, де є відповідні бактерії, тому вони є індикатором їх присутності в досліджуваному середовищі. Фаги використовують у ветеринарії і медицині при лікуванні деяких хвороб (колібактеріоз, сальмонельоз телят і поросят, пулороз і тиф курей, дизентерія, холера, черевний тиф людини). Враховуючи високу специфічність явища бактеріофагії, фаги використовують також з метою визначення виду мікробних культур, під час діагностики ряду інфекційних хвороб, як санітарно-показові об'єкти. Наприклад, виявлення коліфагу у питній воді свідчить про наявність в ній кишкової палички.

Виділення бактеріофагів. Декілька грамів (чи мл) досліджуваного матеріалу вносять у колбу з МПБ або іншим живильним середовищем й поміщають на 12–24 год у термостат, інкубують за оптимальної температури для росту «чутливого» до нього мікроорганізму. У живильному середовищі бактерії розмножуються, а за наявності бактеріофагу розмножується і він (в клітинах). Далі мікробну суспензію фільтрують через бактеріальні фільтри. Одержаний фільтрат досліджують на наявність у ньому фага, користуючись одним із описаних нижче методів.

1. У кілька пробірок з МПБ висівають тест-культуру, після чого в них вносять фільтрат у різних кількостях (0,1; 0,5 та 1,0 мл). В контрольну пробірку фільтрат не вносять. Посіви поміщають у термостат і через 6–12–24 год враховують результат досліду. Якщо у фільтраті знаходиться відповідний фаг, то в пробірках ознаки росту культури будуть відсутні. В контрольній пробірці спостерігатиметься помутніння й інші ознаки росту культури.

2. Тест-культуру засівають суцільним газоном на МПА у бактеріологічній чашці. На край чашки наносять велику краплю фільтрату й дають змогу їй стекти по поверхні МПА. Після 18–24-годинної інкубації у термостаті чашку розглядають проти джерела світла. При наявності у фільтраті фага утворюється так звана «фагова доріжка» (за ходом краплі (стікання по поверхні середовища) ріст мікробної культури відсутній).

Бактеріофаги використовуються в мікробіологічній діагностиці як високоспецифічний інструмент для виявлення збудників бактеріальних інфекцій. Завдяки здатності фагів вибірково інфікувати лише певні види або навіть штами бактерій, їх застосовують для фаготипування – визначення чутливості бактерій до специфічних фагів. Це дозволяє ідентифікувати збудника інфекції

та простежити джерело зараження під час епідеміологічного (епізоотологічного) аналізу. Використання бактеріофагів у діагностиці захворювань інфекційної природи забезпечує високу точність, дозволяє отримувати результати більш оперативно ніж за використання традиційного методу виділення й ідентифікації збудника хвороби.

Фаготипування. Методика фаготипування для діагностики бактеріальних інфекцій базується на визначенні чутливості ізольованої культури бактерій до певних бактеріофагів. Спочатку досліджувану бактеріальну культуру висівають тонким шаром на поверхню щільного поживного середовища у чашці Петрі. Після цього на поверхню посіву наносять краплі суспензій різних фагів та інкубують за оптимальної для ізоляту температури, зазвичай протягом 18–24 годин. У місцях, де бактерії чутливі до певного фага, утворюються прозорі ділянки – зони лізису (рис. 1.33). За наявністю чітких ознак лізису мікробної культури визначають її фаготип (ідентифікують до виду).

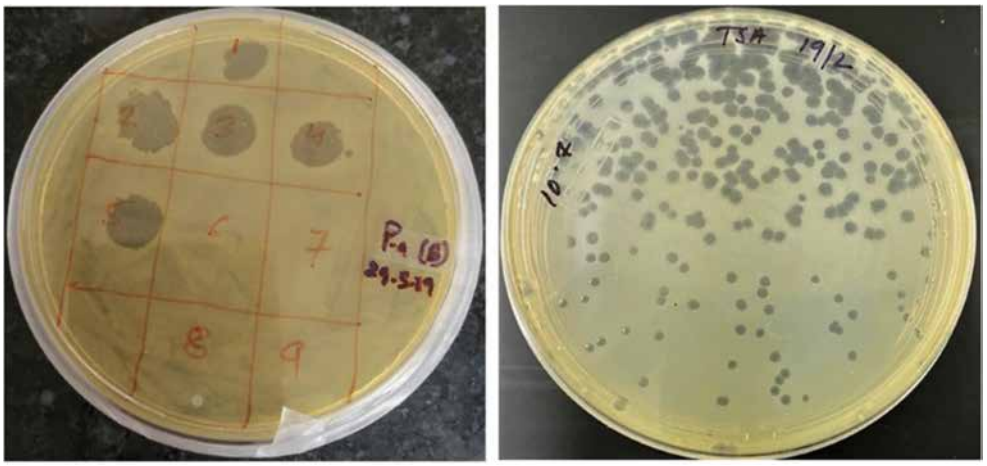


Рис. 1.33. Фаготипування *Pseudomonas aeruginosa*
(Джерело: https://media.springernature.com/lw1200/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fs41598-021-98457-z/MediaObjects/41598_2021_98457_Fig1_HTML.jpg)

Методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків

Антибіотики – це сполуки, переважно біологічного походження, здатні пригнічувати або знищувати мікроорганізми, тобто діяти бактерицидно чи бактеріостатично. Вони можуть бути отримані з мікроорганізмів, грибів, рослин, тварин або синтезовані штучно. Надзвичайно антибіотикопродуктивні деякі види (штами) актиноміцетів та грибів: наприклад, *Penicillium notatum* і *Penicillium crustosum* інтенсивно продукують пеніцилін, *Streptomyces rimosus* – окситетрациклін, *Streptomyces fradiae* – неоміцин, *Bacillus polymyxa* – поліміксин тощо. В Україні промислово виготовляють десятки антибіотиків, які широко застосовують у медицині та ветеринарії. Деякі з них характеризуються вузьким спектром антимікробної дії (наприклад, пеніцилін, стрептоміцин), інші, зокрема тетрациклін, – широким.

Механізми дії антибіотиків різноманітні: пеніциліни порушують синтез клітинної стінки бактерій, стрептоміцин змінює проникність мембран, впливає на транскрипцію, інші – порушують білковий чи нуклеїновий обмін.

Активність антибіотиків контролюють через одиниці дії «ОД» (ОД/мл або ОД/мг). ОД – мінімальна кількість препарату, що пригнічує ріст стандартного тест-мікроорганізму. Наприклад, при визначенні антимікробної активності пеніциліну як тест-мікроорганізм використовують стафілокок (штам 209-Р). Антимікробну активність стрептоміцину визначають за використання у якості тест-мікроорганізму *Bacillus subtilis.*

В практичній мікробіології чутливість мікроорганізмів до антибіотиків визначають методом дифузії в агар об методом серійних розведень.

Метод дифузії в агар. Готують суспензію досліджуваного штаму бактерій, стандартизовану за щільністю зазвичай до $1{,}5–2\times10^8$ колонієутворюючих одиниць (КУО) на мл (0,5 стандарту МакФарланда). На стерильний Мюллер–Хінтон агар (або МПА) наносять суспензію бактерій за допомогою стерильного тампона, створюючи рівномірний «газон» росту. Після підсихання поверхні агару за допомогою пінцета розміщують просочені антибіотиками диски (на відстані приблизно 2 см від краю чашки та 1–2 см один від одного). Рис. 1.34. Чашку перевертають вверх дном, інкубують за оптимальної температури для досліджуваного мікроорганізму (зазвичай 35–37 °С) протягом 16–18 годин.

У разі утворення навколо дисків прозорих зон, що свідчать про антимікробну дію антибіотика, їхній діаметр вимірюють за допомогою лінійки або міліметрового паперу. На підставі отриманих значень оцінюють чутливість штаму до кожного антибіотика, користуючись стандартизованими таблицями інтерпретації (наприклад, CLSI або EUCAST).

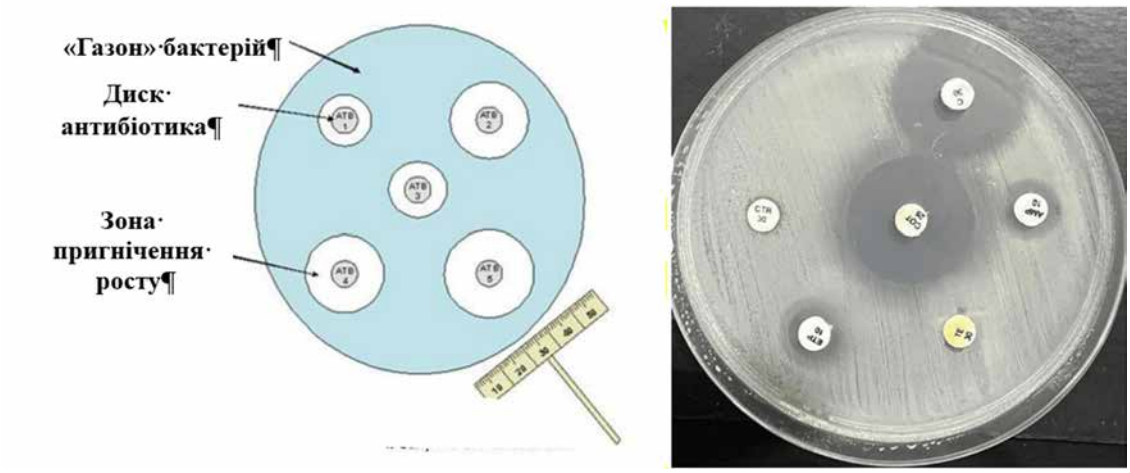


Рис. 1.34. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків методом дисків

(Джерело: researchgate.net/publication/383057685_Effect_of_Antibiotics_on_Pathogenic_Bacteria_in_Biological_Specimens_from_Patients_at_Al_Safwa_Clinic_in_Tripoli/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic)

Метод серійних розведень. Це метод визначення *мінімальної інгібуючої концентрації (МІК)* антибіотика, тобто мінімальної його концентрації, яка здатна повністю пригнічувати ріст мікроорганізму. Розроблено дві модифікації цього методу: у рідкому та щільному (агаровому) середовищах.

Таблиця 1.6. Узагальнена таблиця оцінки чутливості мікроорганізмів до антибіотиків за діаметром зони пригнічення

Діаметр зони пригнічення, мм	Категорія чутливості
До 15	Слабкочутливий
15–24	Чутливий
25 і більше	Високочутливий
Зона пригнічення відсутня	Нечутливий

Пояснення:

- **Слабкочутливий** – мікроорганізм реагує на антибіотик, але ефективність може бути обмеженою або потребує підвищеної дози.
- **Чутливий** – стандартна терапевтична доза антибіотика ефективна.
- **Високочутливий** – антибіотик діє дуже ефективно, з великою зоною пригнічення.
- **Нечутливий** – штам стійкий, антибіотик не пригнічує ріст бактерій.

Визначення МІК в рідкому середовищі. Готують серію послідовних розведень антибіотика у поживному бульйоні (МПБ). Зазвичай використовують дворазові розведення. У кожну пробірку додають однакову кількість суспензії бактерій, стандартизованої за щільністю (наприклад, 1,5–2×10^8 КУО/мл (або 0,5 стандарту МакФарланда). Інкубують при оптимальній температурі для збудника (зазвичай 35–37 °С) протягом 16–20 годин. Після інкубації візуально визначають наявність ознак росту та, за необхідності, готують препарат і мікроскопують.

МІК визначають як найнижчу концентрацію антибіотика, при якій відсутній ріст бактерій (рис.1.35).



Рис. 1.35. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків методом серійних розведень в рідкому середовищі

Визначення МІК на щільному середовищі. Готують чашки з м'ясо-пептонним агаром (МПА), що містять різні концентрації антибіотика. На поверхню кожної чашки наносять 0,1 мл бактеріальної суспензії, стандартизованої до 0,5 за Мак-Фарландом (1,5–2×10^8 КУО/мл), після чого рівномірно

розподіляють її по поверхні агару стерильним шпателем для отримання суцільного «газону». Після інкубації визначають найменшу концентрацію антибіотика, яка повністю пригнічує розмноження мікроорганізму.

Цей метод використовується для точного визначення ефективності антибіотиків, підбору оптимальної дози та контролю розвитку антибіотикорезистентності.

У сучасній мікробіологічній практиці для визначення чутливості бактерій до антибіотиків поряд із класичними методами активно впроваджують новітні технології, що забезпечують високу точність, стандартизованість та швидкість отримання результатів. Одним із таких рішень є ***автоматизовані системи мікробіологічного тестування*** – *Vitek 2, Phoenix, MicroScan* та інші. Вони функціонують за принципом мікродилюції: у спеціальних касетах із різними концентраціями антибіотиків система автоматично відстежує ріст бактерій за допомогою оптичних або турбідиметричних сенсорів. Програмне забезпечення обчислює мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) і надає інтерпретацію відповідно до стандартів CLSI або EUCAST. Такі системи значно скорочують термін діагностики, ліквідують можливий вплив «людського» фактору, забезпечують належну достовірність результатів дослідження.

Широкого застосування набув також ***градієнтний метод (E-test***), у якому поєднуються механізм дифузії антибіотика в агарі та серійне розведення антибіотика. На агар із висіяною культурою кладуть смужку з нанесеним градієнтом концентрацій антибіотика. Інкубують згідно з інструкції виробника засобу. Навколо смужки формується еліптична зона пригнічення росту, а точка її перетину зі шкалою на смужці показує значення МІК (рис.1.36). Метод відзначається простотою виконання, точністю й універсальністю щодо різних видів мікроорганізмів.



Рис. 1.36. Визначення чутливості бактерій до антибіотиків градієнтним методом

Нині значну увагу приділяють розробці та впровадженню у мікробіологічну практику ***генетичним*** і ***молекулярним методам***, які дозволяють виявляти гени або мутації генів, що зумовлюють резистентність бактерій до певних антибіотиків. До таких належать полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР),

секвенування геному, а також сучасні платформи для аналізу мутацій у генах β-лактамаз, карбапенемаз тощо. За допомогою названих методів не лише визначають резистентність збудників інфекційних захворювань у людини і тварин та розкривають її механізми, а й налагоджують ефективний епідеміологічний (епізоотологічний) моніторинг щодо циркуляції небезпечних патогенів в природі.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти здійснюють фаготипування непатогенного штаму кишкової палички, визначають чутливість до різних антибіотиків у грамнегативного та грампозитивного сапрофіта. Результати досліджень описують в робочому зошиті.*

Питання для самоконтролю

1. Яка будова і властивості бактеріофагів?
2. Розповсюдженість бактеріофагів в природі.
3. Охарактеризуйте методики визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.
4. Значення новітніх методів в налагодженні ефективного моніторингу за циркуляцією небезпечних патогенів в природі.

Тема 11. САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ОБ'ЄКТІВ ДОВКІЛЛЯ

Мета заняття: *ознайомити студентів з методиками мікробіологічного дослідження води, повітря, ґрунту.*

Матеріали та обладнання. *Стерильні флакони об'ємом 500 см³ для відбору проб води, стерильні пробірки, піпетки, бактеріологічні петлі, чашки Петрі, штативи; живильні середовища – Ендо, лактозо-пептонна вода, МПА, глюкозо-пептонне середовище; мембранні фільтри або апарат для фільтрації води, термостати (на 22 ± 1 °С і 37 ± 1 °С); аспіраційний прилад для відбору проб повітря; стерильні шпателі; спиртівки, маркери, контейнер для відходів.*

Санітарно-мікробіологічні дослідження ґрунту, води та повітря проводять з метою оцінки санітарного стану довкілля, уточнення та прогнозування епізоотичної (епідемічної) ситуації. Виявлення збудників інфекційних захворювань людини і тварин у названих об'єктах має важливе значення в процесі визначення шляхів їх розповсюдження.

Санітарно-мікробіологічне дослідження води

Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води передбачають визначення загальної кількості мікроорганізмів в 1 мл води й ідентифікацію

патогенів, зокрема сальмонел, вібріонів холери, лептоспір, шигел, ентеровірусів, ротавірусів та ін. Через те, що пряме виявлення патогенів досить громіздке, потребує використання кількох живильних середовищ, нерідко проводять не санітарно-мікробіологічне, а санітарно-бактеріологічне дослідження (непрямий варіант тестування ймовірного забруднення води патогенами), в основі якого – виявлення ознак фекального забруднення – БГКП, *Escherichia coli*, ентерококів, стафілококів тощо.

Санітарно-мікробіологічному контролю підлягає вода централізованого водопостачання, колодязів, свердловин, відкритих водойм, плавальних басейнів, а також стічні води.

Мікробіологічні показники, які регламентують безпеку питної води, призначеної для споживання людиною (табл.1.7), регулюються законодавчо (ДСанПіН 2.2.4-171-10).

Таблиця 1.7. Мікробіологічні показники безпечності питної води

№	Показники	Одиниці виміру	Нормативи для питної води		
			водопровідної, з бюветів	з колодязів та каптажів джерел	фасованої
1	Загальне мікробне число при t 37^0 С – 24 год *	КУО/$см^3$	<= 100 (<= 50**)	не визначається	<= 20
2	Загальне мікробне число при t 22^0 С – 72 год	КУО/$см^3$	не визначається	не визначається	<= 100
3	Загальні коліформи***	КУО/100 $см^3$	відсутність	<= 1	відсутність
4	*E. coli***	КУО/100 $см^3$	відсутність	відсутність	відсутність
5	Ентерококи***	КУО/100 $см^3$	відсутність	не визначається	відсутність
6	Синьогнійна паличка (*Pseudomonas aeruginosa*)	КУО/100 $см^3$	не визначається	не визначається	відсутність
7	Патогенні ентеробактерії	наявність в 1 $дм^3$	відсутність	відсутність	відсутність
8	Коліфаги***	БУО/ $дм^3$	відсутність	відсутність	відсутність
9	Ентеровіруси, аденовіруси, антигени ротавірусу, реовірусу, вірусу гепатиту А та ін.	наявність в 10 $дм^3$	відсутність	відсутність	відсутність

Примітки:

КУО – колонієутворюючі одиниці (мікроорганізмів).

БУО – бляшкоутворюючі одиниці.

* Для 95 % проб води, відібраних з водопровідної мережі, що досліджувались протягом року.

** Через 10 років з часу набрання чинності Санітарними нормами.

*** Для 98 % проб води, відібраних з водопровідної мережі, що досліджувались протягом року.

Відбір та дослідження проб води. Відбір проб води проводить фахівець, який володіє методикою відбору та знає вимоги до транспортування проб. Воду відбирають у стерильні скляні флакони місткістю не менше ніж 500 см³ та герметично закривають пробками з захисними ковпачками. Пробки мають бути виготовлені з матеріалу, стійкого до стерилізації сухим жаром або автоклавуванням.

Під час відбору проб суворо дотримуються правил асептики: ковпачок і пробка знімаються безпосередньо перед набором води; горлечко флакона та його пробка не повинні стикатися з будь-якими поверхнями.

Перед відбором водопровідної води кран знезаражують тампоном, змоченим у спирті, після чого воду спускають протягом 10–15 хв при повністю відкритому крані. Пробу відбирають безпосередньо з крану, без використання гумових шлангів, насадок чи сіток.

Проби хлорованої води відбирають у стерильні флакони, у які попередньо вносять натрій сірчистокислий (10 мг у вигляді кристалів або 2 см³ 1,5 %-го розчину, з розрахунку на 500 см³ води) для нейтралізації залишкового хлору. Відібрані проби маркують та супроводжують актом відбору.

Проби відкритих водойм відбирають із глибини 10–15 см від поверхні та з близького до дна шару, у стерильні флакони за допомогою батометра.

Проби з криниць відбирають до початку користування або через 10–12 год після останнього забору води. Загальний об’єм проби, що надсилається до лабораторії, має бути не менше 500 мл.

Доставку здійснюють у продезінфікованих термоконтейнерах за температури 6±2 °С. Бактеріологічне дослідження необхідно провести якнайшвидше, не пізніше ніж через 2 год після відбору проби. За необхідності термін зберігання може бути продовжено до 6 год за температури 4 – 5 °С. Якщо ці умови не дотримано, проведення аналізу вважається недоцільним.

Санітарно-показові мікроорганізми

Основним індикатором фекального забруднення води є *бактерії групи кишкових паличок (БГКП).* Ця група не є таксономічною одиницею, а включає грамнегативні неспороутворювальні бактерії, які не мають ферменту оксидази та ферментують глюкозу з утворенням кислоти й газу.

Ступінь забруднення води БГКП оцінюють за двома показниками:

- *«колі-індекс»* – кількість бактерій групи кишкових паличок у 1 л води;
- *«колі-титр»* – мінімальний об’єм води (у мл), у якому виявляють одну бактерію з групи БГКП.

Розроблено ряд методів визначення БГКП у воді, зокрема: титраційний (бродильний), метод прямого визначення *E. coli*, метод виявлення *E. coli* шляхом індикації коліфагів (опосередкований метод), метод мембранних фільтрів. Найбільшої популярності набув останній.

Метод мембранних фільтрів

Найбільш поширеним методом визначення колі-титру води є *метод мембранної фільтрації.* Через стерильні нітроцелюлозні фільтри №3

пропускають 300–500 см³ води з джерела централізованого водопостачання (або 100, 10, 1 або 0,1 мл – з відкритих водойм, залежно від ймовірної концентрації мікроорганізмів). Після фільтрації фільтр стерильно переносять за допомогою пінцета і, не перевертаючи, укладають на поверхню середовища Ендо в чашках Петрі. Зразки інкубують при 37 °С протягом 24 годин. Після інкубації підраховують колонії, характерні для *E. coli*, що виросли на мембрані або в чашці Петрі, і використовують це число для розрахунку колі-індексу. Для підтвердження достовірності отриманих результатів готують мазки, фарбують їх за методом Грама та мікроскопують. З цією ж метою здійснюють пересів на глюкозо-пептонне середовище, інкубують при 37 °С протягом 24 годин. Зміна кольору середовища та поява пухирців газу свідчать про ріст БГКП.

При дослідженні проб з ознаками інтенсивного забруднення попередньо готують 10-кратні розведення досліджуваного зразка.

Колі-індекс розраховують за формулою:

$$\text{КІ} = \frac{\text{кількість колоній} \times 1000}{\text{об'єм профільтрованої води (мл)}}$$

Для питної води колі-індекс не повинен перевищувати 3 КУО/дм³ (згідно з ДСанПіН 2.2.4-171-10).

Метод мембранних фільтрів використовують також для виявлення у зразках досліджуваної води ентерококів, стафілококів, псевдомонад та інших мікроорганізмів.

Метод бродильної проби

Визначення колі-титру методом бродильної проби проводять шляхом серійного розведення досліджуваної води та внесення її у спеціальні поживні середовища (глюкозо-пептонне або лактозо-пептонне з індикатором і бродильною трубкою). Проби інкубують при 37 °С протягом 24–48 годин. Присутність *E. coli* визначають за зміною кольору індикатора або утворенням газу в трубках, що свідчить про бродильну активність. Колі-титр розраховують як максимальне розведення води, при якому ще спостерігається бродильна реакція, і використовують цей показник для оцінки мікробіологічної чистоти та безпечності води для споживання.

Методика визначення загального мікробного числа (ЗМЧ)

Якщо якість води не відповідає нормативам за органолептичними показниками, визначають *загальне мікробне число* – кількість колоній, що виросли при інкубації:

- при (36 ± 1) °С – 24 год;
- при (22 ± 1) °С – 48 год.

Підвищення ЗМЧ при 36 °С свідчить про можливе антропогенне забруднення, а при 22 °С – про порушення санітарно-гігієнічного стану систем водопідготовки або водопостачання. Різке зростання показника може вказувати на появу нового джерела контамінації або вторинного розмноження мікроорганізмів.

Оцінка ЗМЧ на різних етапах підготовки води є важливим критерієм ефективності її очищення та знезараження.

Для визначення загальної кількості бактерій із загальної проби води об'ємом 500 см³ у стерильних умовах відбирають 1 см³ і отримують серійні розведення у пробірках з 9 см³ фізіологічного розчину (від 1:10 до 1:100). По 1 см³ розведення вносять у стерильні чашки Петрі, заливають 10–12 см³ розплавленого і остудженого до 45 °С МПА, закривають чашки і обережно перемішують середовище з посівним матеріалом. Після затвердіння агару, чашки поміщають у різні термостати (посіви інкубують за різних температур - при 36 ± 1 ^{0}С протягом 24 год та при 22 ± 1 ^{0}С протягом 48 год).

Через 24–48 годин враховують результат. Оцінюють лише ті розведення, при посіві яких на чашці виросло від 30 до 300 колоній. При посіві 1 см^3 нерозведеної проби враховують будь-які кількості колоній, але не більше 300. Результат підрахунку колоній у кожній чашці виражають у кількості бактерій на 1 см^3 води з урахуванням посіяного об'єму. За кінцеву кількість бактерій приймають середнє арифметичне результату підрахунку на чашках різних розведень.

Питна вода безпечна в епідемічному плані, якщо мікробне число не перевищує 100 КУО/см^3.

Окрім згаданих, за певних обставин (епідеміологічна ситуація тощо) здійснюють й інші дослідження, зокрема цілеспрямоване виявлення конкретних патогенів – збудників захворювань у людини і тварин.

Санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту

Серед усіх об'єктів довкілля ґрунт характеризується найвищою концентрацією мікроорганізмів, оскільки створює оптимальні умови для існування багатьох їх видів: захищає їх від згубної дії ультрафіолетових променів, забезпечує поживними речовинами та водою, аеробів – повітрям. Ґрунт не лише середовище існування для мікроорганізмів, а в багатьох випадках як і продукт їх життєдіяльності. З цього приводу варто ознайомитись з засновниками ґрунтової мікробіології, зокрема з роботами українського мікробіолога (еколога, ґрунтознавця) С. Виноградського.

Поряд із переважною більшістю корисних мікроорганізмів у ґрунті за певних умов можуть тривалий час зберігатися життєздатними (у тому числі у вигляді спор) окремі патогенні види, зокрема збудники правця, ботулізму, сибірки тощо.

Проведення мікробіологічних досліджень ґрунту є важливим під час вибору ділянок для будівництва різних об'єктів, зокрема житлових будинків, тваринницьких ферм та ін., а також для оцінки впливу хімічних речовин (гербіцидів, пестицидів, мінеральних добрив тощо) на природну (корисну) мікрофлору. Мікробіологічні дослідження ґрунту здійснюють також за епідеміологічними показниками, з метою виявлення збудників захворювань у людини, тварин чи рослин.

Методика відбору проб ґрунту для мікробіологічних досліджень

Відбір проб ґрунту для мікробіологічного аналізу проводять з метою визначення кількісного і якісного складу мікрофлори, оцінки санітарного стану ґрунту, виявлення збудників інфекційних хвороб або оцінювання впливу антропогенних факторів. Роботи виконують відповідно до вимог стандарту ДСТУ ISO 10381-6:2015 «Якість ґрунту. Відбирання проб. Частина 6. Настанови з відбирання, оброблення та зберігання ґрунту в аеробних умовах для лабораторного оцінювання мікробіологічних процесів, біомаси та різноманіття».

Перед початком робіт розробляють план відбору проб, у якому зазначають мету дослідження, кількість точок відбору, глибину та схему розміщення пунктів на ділянці. Проби мають бути репрезентативними, тобто відображати реальний мікробіологічний стан ґрунту на об’єкті. Для цього ділянку умовно поділяють на сектори, в кожному з яких вибирають декілька точок для відбору матеріалу.

Відбір проб здійснюють стерильними інструментами – металевими бурами, шпателями або лопатками, які попередньо знезаражують автоклавуванням чи прожарюванням. Під час відбору уникають доторкання з нестерильними предметами або руками. З поверхні ґрунту спочатку видаляють шар завтовшки 1–2 см, після чого відбирають зразок із заданої глибини (зазвичай 0–10 см або 10–20 см залежно від мети дослідження).

У кожній точці беруть «точкову пробу», масою 10–20 г, які потім об’єднують у «композитну (змішану) пробу» масою близько 300–400 г. Таке поєднання дає змогу усереднити результати та зменшити похибку. Для окремих досліджень (наприклад, санітарно-бактеріологічних або епізоотологічних) допускається відбір індивідуальних проб із конкретних підозрілих місць (місця загибелі тварини, накопичення гною тощо).

Відібрані проби поміщають у стерильні герметичні контейнери або поліетиленові пакети, маркують етикеткою із зазначенням номера проби, місця відбору, глибини, дати та прізвища виконавця. Обов’язково складають протокол відбору проб, де фіксують усі супровідні дані: погодні умови, характер ґрунту, особливості ділянки.

До початку лабораторного аналізу проби зберігають за температурі від +4 °С до +10 °С у темному місці, щоб запобігти активному розвитку або загибелі мікроорганізмів. Доставка в лабораторію повинна здійснюватися не пізніше 24 годин після відбору. Якщо транспортування триває довше, проби розміщують у холодильних контейнерах.

У лабораторії проби ґрунту піддають механічній підготовці: обережно подрібнюють, видаляють сторонні домішки (камінці, коріння, сміття) та ретельно перемішують. З підготовленого матеріалу відбирають навіску для подальшого мікробіологічного аналізу – визначення загальної кількості мікроорганізмів, санітарно-показових їх видів, а за потреби – конкретних патогенів – збудників захворювань людини чи тварин.

Визначення загального мікробного числа (ЗМЧ) у ґрунті

Загальне мікробне число ґрунту характеризує кількість життєздатних мікроорганізмів, здатних до росту та утворення колоній у стандартних лабораторних умовах. Цей показник використовується під час оцінки біологічної активності ґрунту та визначення санітарного стану території.

Досліджуваний зразок ґрунту готують описаним вище методом – видаляють сторонні домішки, подрібнюють та перемішують до однорідної маси. Невелику кількість ґрунту (зазвичай 1–10 г) поміщають у стерильний посуд із 100 мл стерильного фізіологічного розчину для одержання суспензії. Останню ретельно перемішують та розбавляють – готують 3–6 серійних десяткових розведень: 1:10, 1:100, 1:1000….1:1000000. Високі розведення дозволяють отримати ріст ізольованих колоній, що гарантує можливість належного вирахування ЗМЧ.

Посів на поживне середовище. Для посіву використовують тверді поживні середовища (наприклад, м’ясо-пептонний агар). У стерильні чашки Петрі вносять 0,1–1 мл кожного розведення, заливають розплавленим і охолодженим до 45–50 °С МПА, після чого круговими рухами ретельно перемішують вміст. Після затвердіння агару чашки перевертають догори дном і поміщають у термостат. Інкубують за температури (36 ± 1) °С протягом 24 годин для виявлення бактерій, характерних для антропогенного забруднення, або за (22 ± 1) °С протягом 48 годин для оцінки сапрофітної мікрофлори. Після інкубації підраховують кількість колоній, що утворилися, і розраховують ЗМЧ.

Розрахунок загального мікробного числа.

ЗМЧ визначають за формулою:

$$\text{ЗМЧ} = \frac{\text{К} \times \text{Р}}{V}$$

де:

- **К** – число колоній на чашці,
- **Р** – коефіцієнт розведення,
- **V** – об’єм посіяної суспензії (мл).

Результат виражають у КУО/г ґрунту. Дотримання стерильності, правильного розведення та точного підрахунку колоній є обов’язковими для отримання достовірних даних.

Визначення титру *Cl. perfringens.* Десяткові розведення ґрунтової суспензії готують за описаною вище методикою. Для знищення неспороутворюючих мікроорганізмів пробірки з розведеним матеріалом прогрівають за температури 80 °С протягом 15 хв, висівають в середовище Вільсона-Блер та інкубують у термостаті протягом 24 год за температури 44^0С. *Cl. perfringens* виявляють за наявністю чорних колоній. За титр цього мікроорганізму приймають найменшу масу ґрунту, в якій з'являється характерний ріст з почорнінням середовища.

При підозрі на наявність патогенних мікроорганізмів (збудники сибірки, туберкульозу, бруцельозу тощо) ґрунт досліджують відповідно до методів індикації конкретних видів.

Таблиця 1.8. Показники санітарно-бактеріологічної оцінки ґрунту

Показник	Одиниця вимірювання	Метод визначення	Санітарне значення	Норматив (ДСанПіН 2.2.7.029-99)
Загальне мікробне число (ЗМЧ)	КУО/г	Посів на МПА, 37 °C, 24 год	Характеризує загальну чисельність мікрофлори	≤10^6 КУО/г для земель населених місць
Бактерії групи кишкових паличок (БГКП)	КУО/г	Метод мембранних фільтрів або серійних розведень	Санітарно-показовий індикатор фекального забруднення	Не допускаються для територій загального користування
Колі-титр	г	Бродильна проба або фільтрація	Найменша кількість ґрунту, де виявляється одна клітина кишкової палички	Не більше 0,1–1 г (залежно від типу ґрунту та призначення території)
Колі-індекс	КУО/г	Підрахунок колоній після мембранної фільтрації	Кількісна оцінка фекального забруднення	≤3 КУО/г для чистих ділянок
Clostridium perfringens	КУО/г	Посів на селективне середовище, анаеробна інкубація	Показник давнього фекального забруднення	Не більше 10^2 КУО/г
Ентерококи (фекальні стрептококи)	КУО/г	Посів на селективне середовище	Додатковий показник свіжого фекального забруднення	Не допускаються для територій загального користування
Патогенні бактерії (сальмонели, шигели, лептоспіри)	КУО/г	Селективні середовища, специфічні методи ідентифікації	Вказує на епідемічну небезпеку	Не допускаються
Бактеріофаги	КУО/г	Метод залучення індикаторних бактерій	Додатковий індикатор наявності певних бактерій	Встановлюється за конкретними методичними рекомендаціями
Санітарно-показові сапрофітні бактерії	КУО/г	Посів на поживні середовища	Оцінка біологічної активності та самоочисної здатності ґрунту	Орієнтовна норма 10^4–10^6 КУО/г залежно від типу ґрунту

Санітарно-мікробіологічне дослідження повітря

У повітря мікроорганізми потрапляють з ґрунтовим пилом, з організму тварин і людини, поверхні рослин, з води тощо. Тут вони перебувають тимчасово через несприятливі умови для існування (відсутність поживних речовин, недостатня кількість вологи, згубна дія ультрафіолетових променів сонця).

Для контролю загального санітарного стану повітряного середовища, враховуючи, що повітряно-крапельним шляхом передаються збудники багатьох інфекційних захворювань (туберкульозу, перипневмонії великої рогатої худоби, бруцельозу, сибірки, злоякісного набряку тощо), періодично проводять бактеріологічне дослідження повітря не лише в помешканнях для людей, а й на фермах, де утримують тварин.

Критеріями санітарно-гігієнічної оцінки повітря приміщень є його загальна мікробна забрудненість, наявність *а*- і β-гемолітичних стрептококів, гемолітичних стафілококів і ін.

З метою дослідження мікрофлори повітря використовують зазвичай седиментаційний або аспіраційний методи. Запропоновані понад десять їх модифікацій стосуються переважно техніки відбору (посіву) повітря на живильне середовище.

Принцип ***седиментаційного методу*** полягає в тому, що бактеріологічні чашки з щільним живильним середовищем залишають відкритими в місцях проведення досліджень на 5–10 хв при визначенні загального мікробного забруднення та до 40 хв – при індикації кокової флори. Після цього чашки закривають і переносять у термостат. Посіви інкубують протягом 24 годин при температурі 37 °С, а потім ще 24 години при 25 °С. Після інкубації підраховують кількість мікробних колоній і розраховують концентрацію мікроорганізмів у 1 м³ повітря. Орієнтовно вважають, що на поверхню живильного середовища бактеріологічної чашки площею 100 см² протягом 5 хв осідає така кількість мікроорганізмів, яка міститься в 10 л повітря.

Аспіраційний метод забезпечує посів заданого об’єму повітря на живильне середовище. З цією метою використовують сучасні мікробіологічні пробовідбірники повітря імпакційного типу (наприклад, SAS Super або TRIO.BAS – аналоги апарату Кротова) (рис.1.37). За допомогою таких приладів здійснюють відбір визначеного об’єму повітря та осадження мікроорганізмів на поверхню живильного середовища. Прилади оснащені цифровими системами контролю потоку повітря (ротаметрами) та таймерами, що дає змогу точно регулювати об’єм і час відбору.

При визначенні загальної кількості мікроорганізмів аспірацію зазвичай налаштовують на 25 л повітря за хвилину з експозицією 4–5 хв, що забезпечує посів 100–125 л повітря. За необхідності визначення наявності гемолітичних коків об’єм повітря збільшують до 250–300 л.

Для визначення ***загальної мікробної забрудненості*** відбирають дві проби повітря (по 100 л кожна) на дві чашки з МПА, які витримують у термостаті протягом 48 год при температурі 37 °С. Після підрахування сумарної кількості колоній в обох чашках роблять перерахунок загальної кількості мікробів в 1 $м^3$ повітря.



Рис. 1.37. Аспіраційний пробовідбірник повітря

При дослідженні повітря лабораторій, приміщень, де утримували хворих на інфекційні хвороби тварин, за інших епізоотичних показників з повітря виділяють патогенні мікроорганізми. В таких випадках використовують спеціальні живильні середовища, розраховані на культивування конкретних збудників.

Дослідження повітря на наявність гемолітичних стрептококів. Через апарат пропускають не менше 250 л повітря з використанням двох бактеріологічних чашок з кров'яним агаром. Чашки кладуть у термостат. Посіви інкубують за температури 37 °С, протягом 24 год та протягом 2–3 діб за кімнатної температури.

Утворені гемолітичним стрептококом колонії дрібні за розміром, сіруватозеленого кольору, оточені прозорою або зеленуватою зоною гемолізу. При мікроскопії пофарбованих препаратів, виявляють грампозитивні, розміщені поодиноко, парами чи короткими ланцюжками коки. Інколи виявляються диплококи, стрептококоподібні ланцюжки.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти здійснюють мікробіологічне дослідження води (колі-титр, колі-індекс), ґрунту (показник ЗМЧ) та повітря (аспіраційним та седиментаційним методами).*

Питання для самоконтролю

1. Які мікроби називаються санітарно-показовими?
2. Мікробне число ґрунту, методика його визначення.
3. Основні етапи визначення титру-перфрінгенс ґрунту.
4. Методика відбору проби води для санітарно-мікробіологічного дослідження.
5 Колі-титр та колі-індекс води, визначення.
6. Методи дослідження мікрофлори повітря.

Тема 12. СЕРОЛОГІЧНІ (ІМУНОЛОГІЧНІ) МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МІКРОБІОЛОГІЇ

Мета заняття: *ознайомити студентів із суттю та технікою постановки серологічних реакцій, які використовуються у мікробіології; вивчити препарати, що застосовуються при серологічній ідентифікації збудників інфекційних захворювань.*

Серед лабораторних досліджень фігурують бактеріологічні, вірусологічні, паразитологічні, серологічні та інші методи дослідження.

Серологія (лат. *Serum* – сироватка) – наукове дослідження властивостей сироватки та їх змін під час хвороби.

Серологічні дослідження – це лабораторні методи, що дозволяють виявити та ідентифікувати антитіла або антигени у сироватці крові. Вони використовуються для діагностики інфекційних захворювань, а також для виявлення та контролю імунних процесів в організмі.

Серологічні реакції у мікробіології – це методи, що використовують реакцію між антигенами (мікроорганізмами або їхніми частинками) та антитілами (специфічними білками імунної системи) для діагностики та дослідження бактеріальних захворювань. Ці реакції дозволяють виявляти як антитіла у крові, так і антигени, які викликають імунну відповідь. Для виявлення антитіл (АТ), необхідно мати специфічний антиген (АГ), і навпаки, для виявлення антигену (АГ) – необхідні специфічні антитіла (АТ). Для постановки реакцій біофабрики випускають діагностичні антигени та імунні сироватки (АТ) відомої специфічної спрямованості.

Взаємодія мікробного антигену (АГ) і антитіл (АТ) носить специфічний характер і направлена у тваринному організмі на нейтралізацію збудника та його токсинів.

Антигенами називають генетично чужорідні речовини, які після введення у організм тварини (людини) викликають специфічну реакцію (перебудову лімфоретикулярної тканини), що супроводжується утворенням специфічних антитіл. Розрізняють антигени корпускулярні, або клітинні (бактерії, еритроцити) і розчинні (молекулярно-дисперсні). Крім цього, антигени полівалентні – мають по декілька детермінантних рецепторів, за допомогою яких можуть вступати в реакцію з відповідними антитілами, як в організмі тварин, так і за його межами – у пробірці *(in vitro).*

Антитіла – високомолекулярні білки глобулінової фракції сироватки крові (імуноглобуліни), входять до імунних сироваток, тому останні є постійними компонентами серологічних реакцій. За проявом феномену взаємодії між антигеном і антитілом *in vitro* розрізняють: ***реакції осадження (прямі) реакції, лізуючі і нейтралізуючі.***

Антитіла, які беруть участь в реакціях осадження отримали відповідну назву за своєю взаємодією з антигеном, а саме: *аглютиніни* – спричиняють склеювання корпускулярного антигену – *аглютиногену* і осадження комплексу антиген-антитіло *(аглютинату); преципітини* – утворюють преципітат з розчинним антигеном – *преципітиногеном*.

В реакціях лізису беруть участь антитіла *бактеріолізини і гемолізини.*, які обумовлюють розпад корпускулярного антигену. *Нейтралізуючі антитіла* знезаражують токсичну дію антигену (токсину).

Реакції осадження (прямі) серологічні реакції проходять у дві фази:

- *перша фаза* – специфічна, невидима простим оком, при якій відбувається утворення комплексу антиген-антитіло;
- *друга фаза* – неспецифічна (фізико-хімічна), при якій проявляється кінцевий ефект (видимий результат) – осадження аглютинату (поява пластівців, крупинок).

Серологічні реакції ставлять на фізіологічному розчині NaCl, тому, що друга фаза їх проходить у слабо електролітному середовищі.

Серологічні методи діагностики інфекційних захворювань у ветеринарній і медичній практиці використовуються з метою:

1) серологічної діагностики інфекційної хвороби – визначення, виявлення (якісне і кількісне) антитіл у сироватці крові тварин за допомогою відомого антигену (стандартних антигенів-діагностикумів);

2) серологічної ідентифікації збудників – визначення специфічного антигену з використанням завідомо відомих специфічних стандартних гіперімунних сироваток (сибіркова, сальмонельозна, бруцельозна тощо), встановлення видової приналежності збудника хвороби, виділеного із досліджуваного матеріалу;

3) оцінки природного і штучно набутого організмом тварини імунітету.

Кожна окрема серологічна реакція має свої особливості, тому у практику запроваджено перелік основних термінів, параметрів та їх характеристики, які студент повинен засвоїти на занятті (табл. 1.9).

Таблиця 1.9. Перелік основних термінів, характеристик СР, які повинен засвоїти студент на занятті

Термін	Визначення
Серологічна реакція	Реакція специфічної взаємодії антигенів та антитіл in vitro
Реакція аглютинації	*Аглютинація* – це спосіб виявлення та кількісного визначення АГ або АТ, заснований на їх здатності до формування видимих конгломератів. *Аглютинація* являє собою процес склеювання корпускулярних антигенів (бактерії, еритроцити) при дії на них специфічних антитіл у присутності електроліту з утворенням аглютинату.
Реакція преципітації	*Преципітація* – це осадження дрібно-дисперсного або розчинного молекулярного АГ під впливом специфічної сироватки.
Серологічна ідентифікація	*Серологічна ідентифікація* – це визначення (ідентифікація) невідомого антигену за допомогою відомих антитіл з використанням серологічних реакцій.
Імунна діагностична сироватка	*Імунна діагностична сироватка (ІДС)* – це стандартний препарат, що містить антитіла до певної групи мікроорганізмів і використовується для постановки серологічної реакції.

В мікробіологічній практиці широкого застосування набули серологічні реакції: аглютинації, зв'язування комплементу, преципітації та ін. Усі імунологічні реакції поділяють на моно- й полі системні (рис. 1.38).

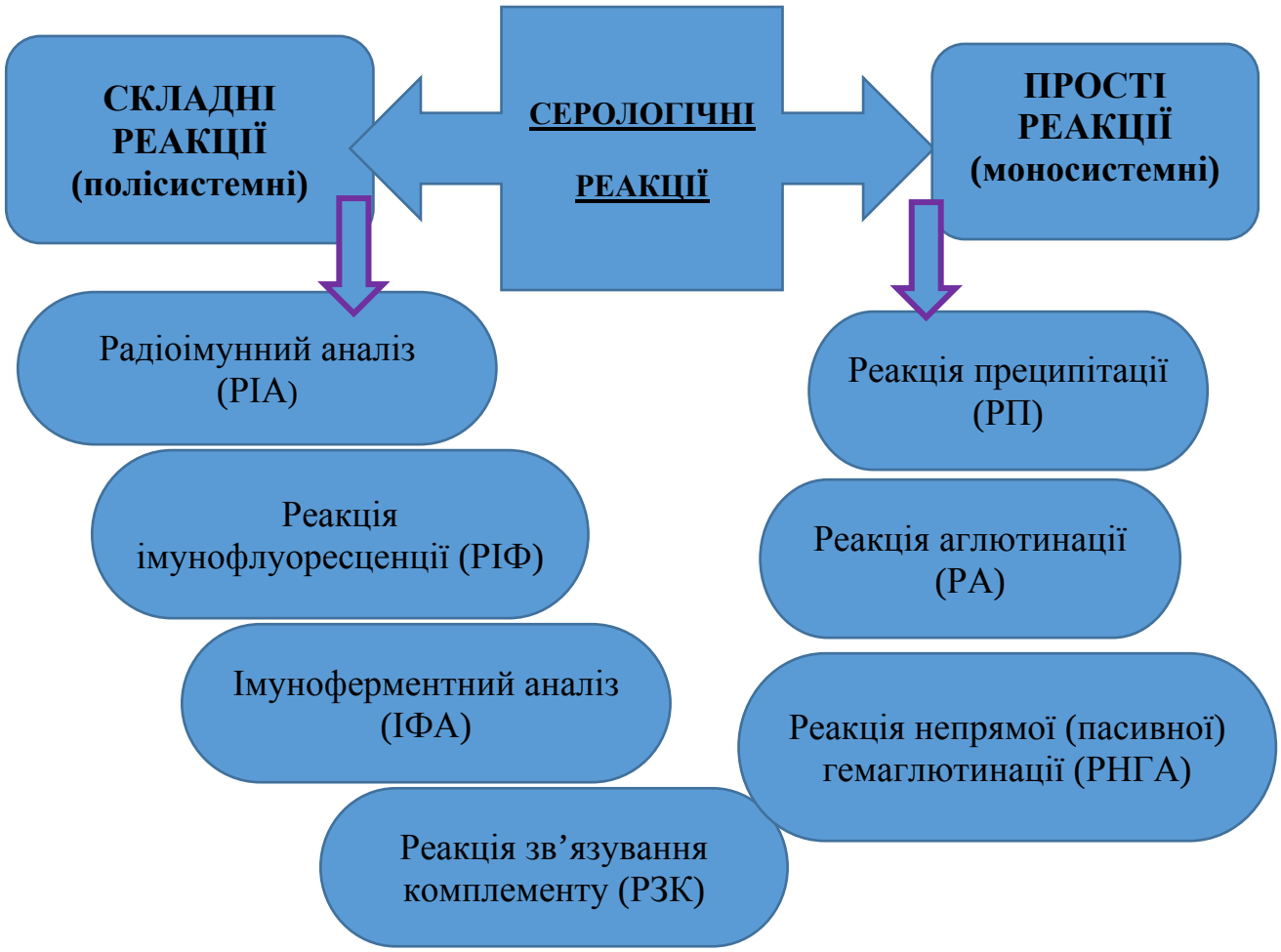


Рис. 1.38. Типи серологічних (імунологічних) реакцій

Лабораторне заняття №1.
РЕАКЦІЯ ГЛЮТИНАЦІЇ

Мета заняття: *ознайомити студентів з технікою постановки реакції аглютинації, застосуванням її у ветеринарній практиці, отриманням і підготовкою компонентів; оволодіти методикою постановки реакції аглютинації (РА) класичним об'ємним (пробірковим) і крапельним методами.*

Матеріали та обладнання. *Кювети плексигласова панель із лунками, гумові груші, піпетки градуйовані на 1 і 5 мл, фізіологічний розчин; культура сальмонел вирощена на МПА (вакцинний штам ТС 177); діагностичні сальмонельозні аглютинуючі сироватки; сироватка великої рогатої худоби позитивна (бруцельозна), сироватка нормальна (здорової) великої рогатої худоби – негативна; антиген бруцельозний для РА; контейнер для відходів.*

Для демонстрації необхідні таблиці (схеми) постановки РА, пробірки з позитивною і негативною РА, пробірки з кільцевою позитивною і негативною реакцією з молоком.

У 1896 році Грубер і Дурхем встановили феномен склеювання, скупчення бактерій при їх внесенні в імунну сироватку, специфічну щодо цих бактерій з утворенням пластівців або зерняток і просвітленням рідини. Цей феномен вони назвали реакцією аглютинації. Невдовзі, на основі цього феномену були запропоновані методи ряду діагностики інфекційних захворювань – черевного тифу (реакція Відаля), бруцельозу (реакція Райта), висипного тифу (реакція Вейль-Фелікса) та ін.

Аглютинація (лат. *agglutinatio* – склеювання) – це процес склеювання та випадання в осад бактерій, еритроцитів, сперматозоїдів або інших клітин, зважених у рідині, під дією специфічних антитіл (аглютинінів). Цей біологічний механізм використовується для лабораторної діагностики інфекцій та визначення груп крові.

Реакція аглютинації (РА) – це важлива серологічна реакція, яка проявляється в тому, що при додаванні сироватки крові, яка містить специфічні антигену антитіла, до рівномірної суміші клітин антигену (наприклад, бактерій) відбувається їх склеювання, утворення грудочок, пластівців, які поступово осідають на дно пробірки (реакція осадження), формуючи характерний осад *(аглютинат)*, а рідина над осадом просвітлюється.

В реакції аглютинації (моносистемній, прямій, двокомпонентній) *беруть участь антитіло (аглютинін) і корпускулярний антиген (аглютиноген)*. Вони взаємодіють у певних кількісних співвідношеннях і при наявності електроліту (0,85 %-й розчин натрію хлориду). В РА антитіла називають *аглютинінами*, антиген – *аглютиногеном,* а їх комплекс – *аглютинатом*. РА, як і інші серологічні реакції відбувається в присутності електроліту, тобто, коли і сироватку і бактерії розбавляють ізотонічним розчином кухонної солі. Максимальне розбавлення аглютинуючої сироватки, при якому вона ще викликає реакцію аглютинації, називається *титром сироватки.*

Аглютиніни – антитіла, що мають властивість спричиняти склеювання відповідних бактерій, еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, клітин тканин, корпускулярних хімічних часточок з адсорбованими на них антигенами або антитілами з утворенням конгломератів (аглютинатів), видимих неозброєним оком.

Антиген в РА корпускулярний*, тобто є суспензією бактерій.* Якщо бактерії мають джгутики, то аглютинат (осад) утворюється крупнозернистий, якщо бактерії без джгутиків – дрібнозернистий.

Застосування РА. У ветеринарній практиці РА застосовують з метою діагностики бруцельозу, сальмонельозу, лістеріозу, кампілобактеріозу, вібріозу, лептоспірозу, типізації збудника колібактеріозу та інших захворювань.

Розроблено декілька варіантів реакції аглютинації, що різняться за методичним виконанням і метою дослідження. На практиці реакцію аглютинації ставлять кількома методами: класичний метод РА (пробірковий

метод), реакція мікроаглютинації (РМА), прискорена (пластинчаста) РА, кров'яно-крапельна РА (ККРА), реакція непрямої гемаглютинації (РНГА).

Основні компоненти для постановки РА:

1. досліджувана кров'яна сироватка;

2. антиген (антигеном в РА, як правило, є суспензія живих або інактивованих мікроорганізмів, яку готують із живих мікроорганізмів шляхом змиванням фізіологічним розчином з поверхні МПА однодобової мікробної культури);

3. електроліт – фізіологічний розчин (0,85%-й розчин NaCl на дистильованій воді) .

Інактивовані антигени готують в умовах біологічної фабрики. Антигени повинні мати необхідну концентрацію мікробних тіл, яку встановлюють за допомогою бактерійних стандартів. Специфічні антигени виготовляють у вигляді суспензії із стандартних штамів патогенних бактерій, а діагностичні сироватки – методом імунізації кролів відповідними антигенами.

Кров'яна сироватка повинна бути прозорою й свіжою, її одержують з крові методом відстоювання. Кров у великих тварин (корови, коні, верблюди) беруть з яремної вени, у свиней – з судин хвоста чи вушної раковини, птиці – з підкрильцевих судин у стерильні пробірки і залишають у теплі. Після утворення згустку роблять «обводку». Для цього профламбованим металевим стержнем верхню частину згустку відокремлюють від стінки пробірки і ставлять їх у холодильник (+4 °С). З появою достатньої кількості сироватку, її відбирають у стерильні пробірки.

Для ідентифікації мікроорганізмів, ізольованих з патологічного матеріалу, застосовують стандартні діагностичні сироватки, одержані на біофабриках шляхом гіперімунізації тварин (кролів) відповідними антигенами.

КЛАСИЧНА РОЗГОРНУТА РЕАКЦІЯ АГЛЮТИНАЦІЇ (пробірковий метод)

Компоненти реакції:

1. сироватка хворої тварини (антитіла)
2. антигенний діагностикум (бактерійний або еритроцитарний)
3. фізіологічний розчин (електроліт)

Механізм аглютинації полягає в тому, що під впливом електроліту зменшується негативний поверхневий заряд бактеріальний клітин, і вони можуть зблизитись на таку відстань, при якій виникає склеювання бактерій.

Схема реакції:

1. Готують двократні розведення монорецепторної сироватки (1 : 100 до титру вказаного на ампулі),
2. Додають досліджувану культуру бактерій.
3. Пробірки, що містять суміш бактерій з розведеннями діагностичної сироватки, струшують і витримують при температурі 37 °С – 2 год, а далі ще при кімнатній температурі протягом 18 – 20 год.

Оцінка результатів реакції (рис. 1.39). Якщо при оцінюванні результатів, аглютинація спостерігається у пробірках, які містять діагностичну сироватку

розведену до титру (чи до половини титру), таку реакцію аглютинації *вважають достовірно позитивною*.

Позитивний результат – осад на дні пробірки, розчин прозорий зверху.

Негативний результат – помутніння.

Значення. Розгорнута РА застосовується з діагностичною метою при деяких інфекційних захворюваннях, для визначення в сироватці крові хворих тварин титру антитіл до антигенів – збудників, які виявляються за допомогою відповідних відомих діагностикумів.

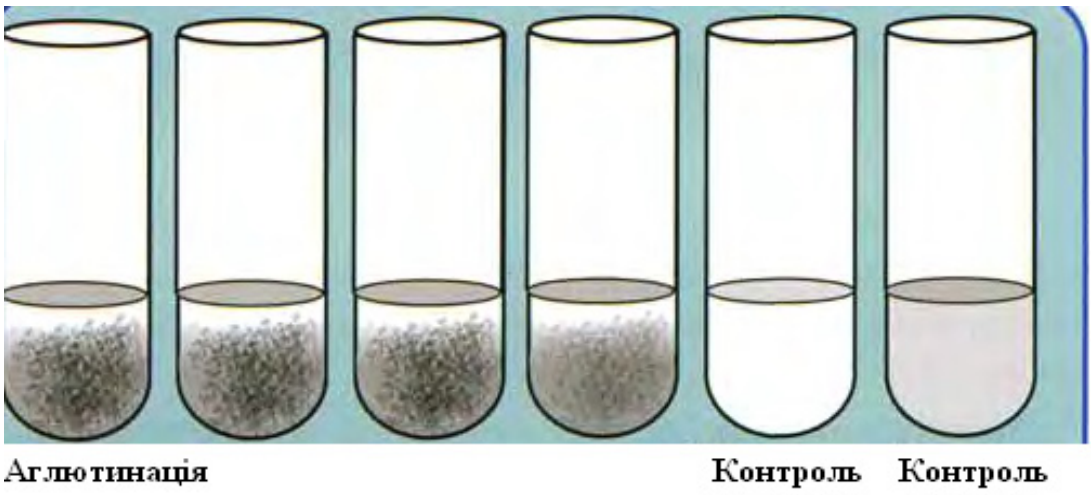


Рис. 1.39. Розгорнута реакція аглютинації

(Джерело: https://studfile.net/preview/5602954/page:39/)

Техніка постановки РА класичним (пробірковим) методом при діагностиці бруцельозу (реакція Райта)

Реакцію ставлять за класичною схемою в пробірках методом однакових об’ємів.

Досліджувані сироватки розводять у пробірках відповідно до інструкції: сироватку крові великої рогатої худоби розводять у концентрації 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, овець, кіз, свиней і собак – 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100 та 1 : 200 (табл. 1.10).

Таблиця 1.10. Розливання сироватки мікропіпеткою

Доза сироватки	Антиген, розведений до 500 млн мікробних тіл в 1 мл	Розведення сироватки
0,04	1	1: 25
0,02	1	1: 50
0,01	1	1: 100
0,005	1	1:200

Розведення зручно здійснювати таким чином. Спочатку готують основне розведення (1 : 50 сироватки крові великих тварин і 1 : 25 – дрібних). Щоб

одержати розведення 1 : 50, беруть 0,1 мл сироватки і змішують її з 4,9 мл фізіологічного розчину.

У штатив ставлять чотири пробірки (для кожної досліджуваної сироватки). У три пробірки (крім першої) вносять по 0,5 мл фізіологічного розчину. Потім у першу і другу пробірки вносять по 0,5 мл основного розведення досліджуваної сироватки. З другої пробірки 0,5 мл переносять у третю, з третьої – у четверту, з четвертої 0,5 мл розчину видаляють. Таким чином одержують розведення 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200 та 1 : 400.

Після цього в усі пробірки вносять по 0,5 мл стандартного бруцельозного антигену, доводять фізіологічним розчином до робочого титру. Вміст пробірок змішують і залишають протягом 4 – 6 год в умовах термостату при температурі 37 °С, а потім, ще на 14 – 16 год при кімнатній температурі (рис. 1.40).

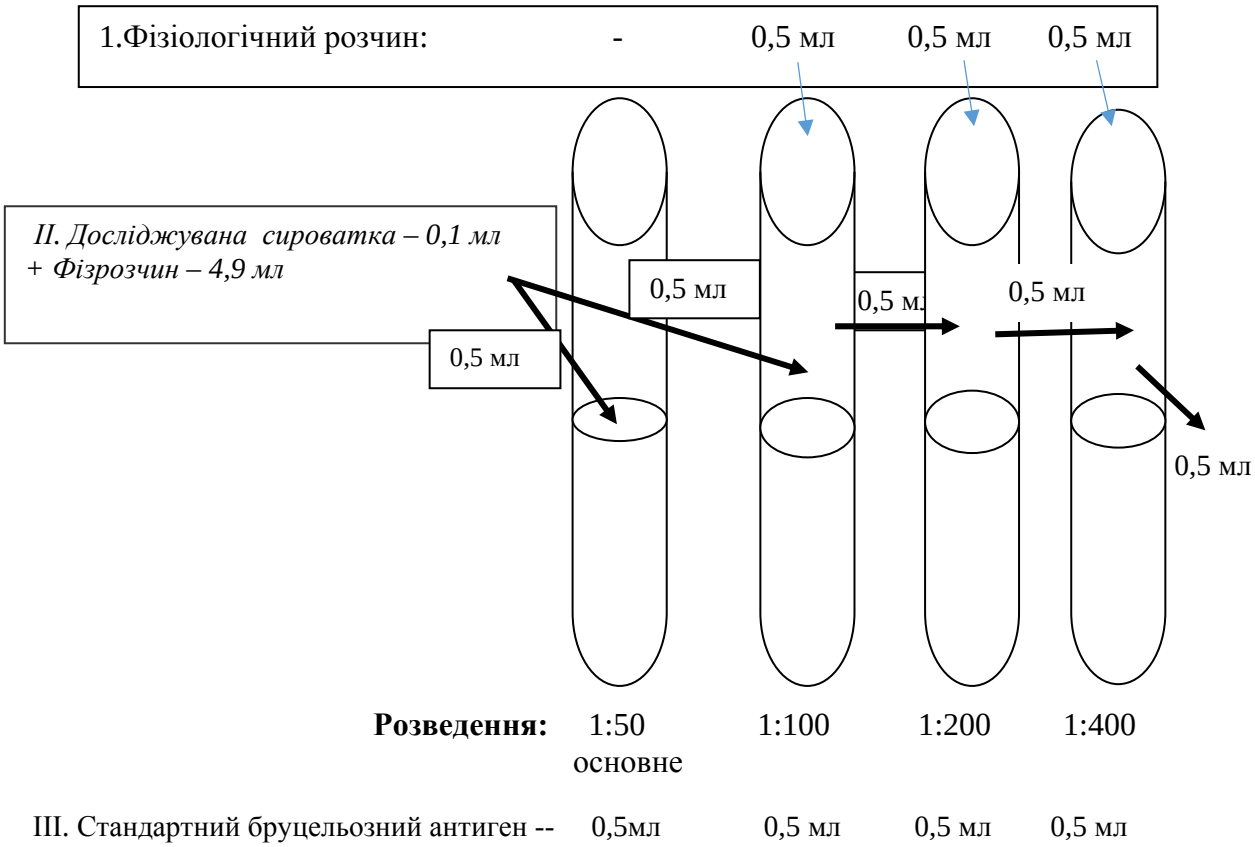


Рис. 1.40. Схема постановки РА пробірковим методом при бруцельозі

При масових дослідженнях сироваток крові свиней, овець, кіз і собак допускається постановка реакції у двох перших розведеннях, тобто 1 : 25 і 1 : 50. При дослідженні сироваток крові великої рогатої худоби і верблюдів – 1 : 50 та 1 : 100.

При постановці реакції аглютинації обов'язково ставлять такі контролі:

1) *контроль антигену*: 0,5 мл фізіологічного розчину + 0,5 мл антигену – для виключення самоаглютинації;

2) к*онтроль сироватки крові*, яка не містить антитіл проти збудника бруцельозу;

3) к*онтроль сироватки*, яка містить антитіла проти збудника бруцельозу.

Контрольні сироватки досліджують у тих же розведеннях, що й основні. Дози антигену при цьому аналогічні.

Облік реакції. Спочатку розглядають контрольні пробірки. Реакція оцінюється візуально (неозброєним оком або користуються аглютиніноскопом).

Результати РА записують за допомогою умовних позначень (+) та (-).

(+ + + +) – повне просвітлення вмісту пробірки, парасолька сформована чітко. При струшуванні пробірки осад розбивається на пластівці;

(+ + +) – неповне просвітлення вмісту пробірки. Осад такий же, як і в першому випадку;

(+ +) – просвітлення вмісту пробірки слабке, парасолька сформована недостатньо;

(+) – рідина каламутна, на дні пробірки пластівці;

(–) – рідина каламутна, осад у вигляді ґудзика. При легкому струшуванні пробірки він зумовлює рівномірне помутніння всього вмісту пробірки.

Висновок. *Досліджувану сироватку вважають позитивною, якщо вона зумовлює аглютинацію з оцінкою не менше двох хрестів у розведенні 1 : 100 і вище (велика рогата худоба, коні, верблюди) й 1 : 50 і вище (собаки, вівці, свині, кози).*

При отриманні сумнівних результатів, у тварин, через 3 – 4 тижні, беруть кров і здійснюють повторне дослідження.

Крапельний* (пластинчастий) *метод РА (РА на склі для серологічної ідентифікації невідомого мікроорганізму) застосовують, переважно, з метою швидкого (орієнтовного) визначення виду мікроорганізму, його ідентифікації (типізації) чи антитіл у кров'яній сироватці із застосуванням відомих діагностичних аглютинуючих сироваток.

При ідентифікації невідомого збудника реакцію ставлять таким чином:

1) у центр знежиреного предметного скла наносять краплю (відомої) стандартної аглютинуючої діагностичної сироватки у розведенні 1 : 50;

2) на лівий край – краплю сироватки у розведенні 1 : 20;

3) на правий – краплю фізіологічного розчину (контроль);

4) у кожну краплю бактеріологічною петлею додають невелику кількість досліджуваної (агарової) культури і рівномірно розмішують.

Облік реакції. Результат спостерігають через 2 – 4 хв (реакцію краще роздивлятись на темному фоні).

При позитивній реакції у краплі з аглютинуючою сироваткою з'являються пластівці, крупинки. Рідина стає прозорою (при відповідності культури бактерій антитілам сироватки).

Негативний результат – спостерігається помутніння.

У контрольних краплях рідина залишається каламутною, а пластівці й крупинки не утворюються. (рис. 1.41).

В разі відсутності феномену аглютинації, роблять висновок, що досліджувана культура бактерій не відповідає даній імунній сироватці.

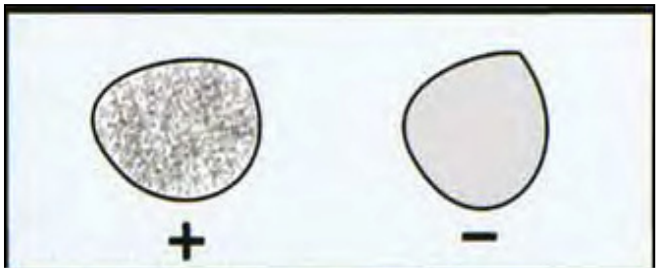


Рис. 1.41. РА на склі
(Джерело (https://studfile.net/preview/5602954/page:39/)

Кров'яно-крапельний метод РА (ККРА) найчастіше застосовують з метою діагностики пулорозу (сальмонельозу) птиці і респіраторного мікоплазмозу птиці.

Для діагностики респіраторного мікоплазмозу птиці на знежирене предметне скло наносять краплю крові (з гребеня чи сережки), до неї добавляють краплю стандартного антигену і змішують скляною паличкою. Щоб краще спостерігати феномен аглютинації, користуються пофарбованим антигеном *(мікоплазменний антиген).*

Для діагностики сальмонельозу птиці за допомогою кров'яно-крапельної реакції непрямої гемаглютинації (ККРНГА) – *пулорозний еритроцитарний антиген*.

Облік реакції. У позитивних випадках РА (коли у крові є специфічні антигену антитіла) через 30 – 60 с у краплі суміші з'являються пластівці та крупинки склеєного антигену (аглютинат*).*

Позитивний результат – утворення пластівців, *негативний* – помутніння.

Кільцева реакція (проба) з молоком. Частіше цю реакцію використовують при обстеженні великої рогатої худоби на бруцельоз і при контролі збірного молока.

В аглютинаційні пробірки наливають по 2 – 3 мл свіжого досліджуваного молока і добавляють по 0,2 мл (2 краплі) антигену (забарвленого гематоксиліном). Пробірки струшують до рівномірного забарвлення молока і витримують на водяній бані (або залишають у термостаті) протягом 45 – 60 хв при температурі 37 °С.

Облік реакції. Якщо, у молоці є антитіла, специфічні до бруцельозного антигену, утворюється комплекс антиген – антитіло, який адсорбується на краплинах жиру. Останні при відстоюванні спливають угору, утворюючи синє кільце у нижньому шарі вершків. Стовпчик молока знебарвлюється – **реакція позитивна** (рис. 1.42).

Негативна реакція *характеризується синім забарвленням всієї проби молока та жовтуватим кольором вершків.*

Серологічна діагностика включає ще й інші варіанти постановки РА – **реакція мікроаглютинації,** при якій результат враховується в роздавленій краплі рідини на предметному склі під мікроскопом.

Каплю рідини беруть піпеткою із пробірки, де були змішані досліджувана сироватка й антиген. Практичне застосування ця реакція знайшла при діагностиці лептоспірозу, де і буде описана.

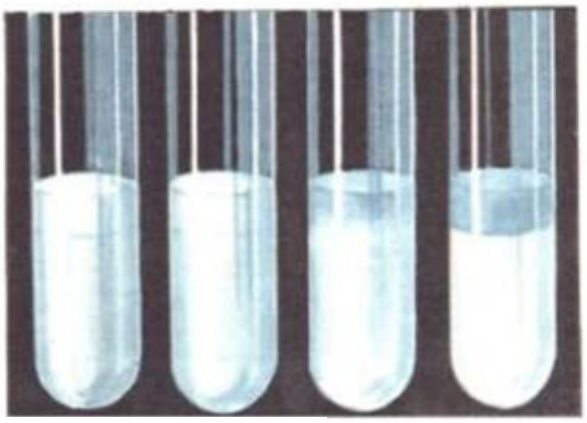


Рис. 1.42. Кільцева реакція з молоком
(Джерело: htmlconvd-bdSX6u_html_42ca12cb94797a80.jpg)

Завдання для самостійної роботи студентів

1. Студенти знайомляться з основними поняттями серологічних реакції (СР), визначають мету постановки, компоненти СР та особливості постановки реакцій аглютинації. Вивчають зразки імунних діагностичних сироваток.

2. Студенти ставлять реакцію аглютинації на склі із адсорбованими сироватками, здійснюють облік та розгорнуту РА з метою серологічної ідентифікації культури бактерій, аналізують особливості обліку розгорнутої реакції аглютинації.

3. Виконані завдання занотовують в протокол та підписують його у викладача.

Питання для самоконтролю

1. Яке призначення серологічних реакцій?
2. Реакція аглютинації – визначення, практичне застосування.
3. Імунні діагностичні сироватки, використання та етапи їх отримання.
4. Які компоненти потрібні для постановки РА?
5. Постановка РА пробірковим та пластинчастим методами.

РЕАКЦІЯ ПРЕЦИПІТАЦІЇ

Мета заняття: *ознайомити студентів з реакцією преципітації, її практичним застосуванням, методами і технікою постановки реакції преципітації у рідкому середовищі (кільцепреципітація (РКП)), реакції флокуляції, у щільному середовищі – дифузна преципітація (РДП), імуноелектрофорез з проведенням обліку та оцінюванням результатів реакції.*

Матеріали та обладнання. *Позитивна преципітуюча сироватка проти сибірки, стандартний (позитивний) сибірковий антиген, фізіологічний розчин, тонкі пастерівські піпетки, пробірки Уленгута і штативи до них, стерильні чашки Петрі, простерилізовані шматочки досліджуваних шкір, ножиці, звичайні пробірки, карболізований фізіологічний розчин, лійки з азбестовою ватою, спиртівки, пінцети, контейнер для відходів.*

Преципітація (від лат. *praecipitatio* – стрімке падіння вниз, осадження) – реакція осадження комплексу антигену з антитілом. Це одна з імунологічних реакцій, що дозволяють визначити вміст антитіл в сироватці крові хворих або вакцинованих людей, а також імунізованих тварин. Вперше, дослідив цей феномен Урдрен Саудре Чіназ, однак через хворобу його дослідження продовжили учні.

Суть реакції преципітації. Реакція преципітації (термопреципітації) основана на тому, що при взаємодії антигену *(преципітиноген*) із специфічним антитілом *(преципітин)* утворюється *преципітат (осад*).

Реакція преципітації (РП) відноситься до моносистемних прямих (реакцій осадження), проста у виконанні, високочутлива і специфічна.

На відміну від РА, в РП застосовують розчинні антигени у вигляді прозорих чи злегка опалесціюючих розчинів. Крім того, на відміну від реакції аглютинації, де антигеном (преципітиногеном) слугує цільна клітина, в реакції преципітації антигеном є продукти розпаду мікробних клітин – лізати, фільтрати, екстракти культур чи білків вібріонів.

В реакції преципітації використовують антигени бактеріального і вірусного походження чи екстракти із органів, тканин, патологічного матеріалу (гній, мокрота), а також спинномозкову рідину, ексудати, сечу тощо. Антигени – преципітиногени отримують шляхом екстрагування із зруйнованих бактерій або тканин. Антигени резистентні до нагрівання (кип'ятіння, автоклавування) і гниття.

Застосування РП. Реакцію преципітації застосовують для діагностики ряду інфекційних хвороб тварин і людини (сибірки, чуми, туляремії тощо), а також в судово-експертній медицині (для встановлення належності крові тієї чи іншої людини або тварини), при санітарно-гігієнічному контролі й ін.

В санітарній мікробіології преципітацію застосовують для визначення домішок у молоці, для виявлення фальсифікації м'ясних та рибних виробів. Може використовуватись реакція преципітації і при визначенні ступеня спорідненості живих істот за складом їх білків. За її допомогою можна виявити специфічний антиген у патологічному матеріалі, відібраному від трупів, а також у шкіряній сировині.

У ветеринарній практиці РП застосовують, переважно, при дослідженні ураженої шкіряної сировини сибіркою чи патологічного матеріалу, відібраного від трупів.

Типи реакцій.

Існує декілька варіантів постановки реакції преципітації:

1) реакція в рідкому середовищі – реакція флокуляції і кільцепреципітації (РП за Асколі);

2) реакція у щільному середовищі – преципітація в гелі (імунодифузія);

3) *імуноелектрофорез (поєднання імунодифузії з електрофорезом*).

Дослідження шкіряної сировини та будь-якого патологічного матеріалу на сибірку за допомогою РП в рідкому середовищі (РП за Асколі).

У лабораторію надсилають зразки шкіри будь-якої характеристики, у вигляді невеликих (4 х 4 см) квадратиків або кружечків. Якщо зразків багато, їх нанизують на тонкий дріт, нумерують у порядку, що відповідає порядку сировини на складі.

Зразки шкір від парної чи мороженої сировини витримують для нагромадження антигену протягом 2-х діб при температурі не нижче 20 °С. Решту зразків досліджують відразу після надходження в лабораторію.

І. Підготовка зразків шкіри.

1. Стерилізація зразків в автоклаві з метою знищення збудника (1,5 атм протягом 30 хв або 1 атм протягом 1 години).

2. Подрібнення зразків шкіри здійснюють ручним (ножиці) або механічним способом, невеликими шматочками масою 1 г і кладуть у скляні банки ємкістю 50 мл. Від кожного зразка мокро соленої сировини нарізають по 2 г і поміщають в окремі банки.

3. Екстракція зразків (для визначення наявності антигену). При дослідженні парної, мороженої, прісно-сухої та сухосоленої сировини використовують карболізований 0,85%-й розчин NaCl, при дослідженні мокросоленої сировини – дистильовану воду з додаванням 0,3%-го розчину карболової кислоти.

Мокросолені зразки заливають 7 – 8 мл екстрагуючої рідини, решту зразків – 10 мл. Вміст банок ретельно розмішують й екстрагують холодним способом (16 – 20 годин при кімнатній температурі). Зразки свинячих шкір екстрагують гарячим способом.

Приготування екстракту із іншого дослідного матеріалу. Свіжий матеріал, витримавши протягом 18 – 20 год у термостаті при температурі 37°С, а несвіжий – відразу після доставки у лабораторію, екстрагують гарячим чи холодним способами. При цьому слід враховувати, що екстракти, отримані гарячим методом, містять менше преципітинів.

При гарячому способі шматочки досліджуваного матеріалу (1 – 2 г) кладуть у пробірку або колбу, заливають ізотонічним розчином натрію хлориду у співвідношенні 1 : 10 й кип'ятять протягом 30 хв на водяній бані.

При холодному способі шматочки матеріалу масою 1 – 2 г розтирають у ступці з піском, кладуть у колбу, заливають 0,3%-м карболізованим ізотонічним розчином у співвідношенні 1 : 10 й залишають на 16 – 18 год при кімнатній температурі.

4. Фільтрування екстракту. Одержані екстракти фільтрують через азбестову вату (перші краплі фільтрату видаляють). Азбестову вату попередньо перевіряють на pH (нейтральний). (*Екстракт повинен бути абсолютно прозорим*!)

ІІ. Техніка постановки реакції преципітації за Асколі

Компоненти реакції:

1. екстракт дослідного матеріалу (антиген) – *прозора рідина (обов'язково!);*

2. стандартна специфічна проти сибіркова преципітуюча сироватка *(виготовлена на біофабриці);*

3. стандартний сибірковий антиген *(для контролю*);

фізіологічний розчин *(для контролю**).***

Постановку реакції здійснюють у вузьких пробірках Уленгута (діаметр 4 мм). Реакцію можна ставити двома способами: ***нашаруванням*** *антигену на сироватку або* ***підшаруванням*** *сироватки під антиген.*

1). нашарування: в уленгутівську пробірку наливають 0,2–0,3 мл стандартної преципітуючої сибіркової сироватки (виготовленою біофабрикою) й пастерівською піпеткою нашаровують таку ж кількість одержаного екстракту.

2). *при підшаруванні* спочатку вносять екстракт (антиген), а потім другою піпеткою – специфічну сироватку (*обережно підшаровують під антиген щоб не було змішування, оскільки сироватка важча антигену!).*

Одночасно ставлять 3 контрольні проби:

1) преципітуюча сибіркова сироватка з стандартним сибірковим антигеном;

2) преципітуюча сибіркова сироватка з екстрактом шкіри клінічно здорової тварини або стандартний антиген із антракоїдів;

3) нормальна сироватка з стандартним сибірковим антигеном.

III. Облік реакції. Пробірки продивляються на темному фоні при достатньому боковому освітленні. (рис. 1.43).

- ***позитивна реакція*** – протягом 5–15 хв (при кімнатній температурі) на межі екстракту і сироватки з'явиться сірувато-біле кільце (преципітат);
- ***сумнівна реакція*** – утворення кільця спостерігають пізніше, ніж за 15 хв;
- ***негативна реакція*** – кільце відсутнє.

При дослідженні мороженої та прісно сухої сировини (шкіри) результат реакції фіксують в період з 10-ї по 15-у хв від моменту постановки реакції, при дослідженні сухо соленої – через 30 хв, мокросоленої – через 1 годину.

Реакція преципітації дозволяє виявити різні речовини білкової природи. У даній реакції можна виявити білок у розведенні до 1 : 100000, а за допомогою хімічних реакцій визначають розведення білка не вище 1 : 1000.

Реакцію преципітації за Асколі можна використовувати як експрес-метод для виявлення специфічних сибіркових антигенів у досліджуваних культур. Для цього, в 0,25 – 0,5 $см^3$ 0,85%-го розчину натрію хлориду ресус-пендують бактеріологічну петлю добової агарової культури. Екст-рагування проводять гарячим методом, а постановку реакції – як описано вище. Облік резуль-татів реакції враховують протягом 3 хв

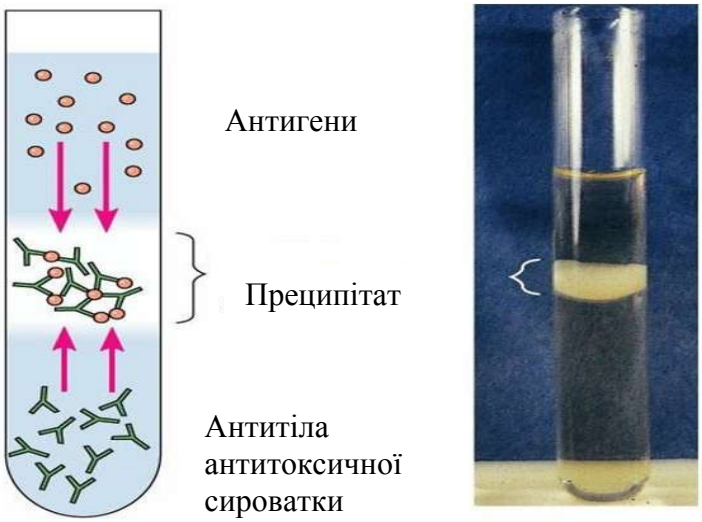


Рис. 1.43. Реакція кільце преципітації

(Джерело: htmlconvd-bdSX6u_html_b2124f3aff6f3b59.jpg)

Самостійна робота студентів. *Студенти ставлять реакцію преципітації в рідкій фазі двома способами: нашаруванням та підшаруванням, здійснюють облік. Виконані завдання, заносять в протокол та підписують його у викладача.*

Реакція преципітації в агаровому гелі (реакція дифузійної преципітації (РДП))

Реакція преципітації в агарі – це імунологічна реакція, при якій антигени (також відомі як преципітиногени) і антитіла (також відомі як преципітини) взаємодіють, утворюючи нерозчинний осад (преципітат) в агарі (гелі). Це є метод, який використовується в діагностиці інфекційних хвороб для виявлення та ідентифікації антигенів і антитіл, а також для визначення специфічності антитіл, для визначення токсинів

Існують декілька варіантів постановки ***реакції дифузійної преципітації*** **(РДП):**

1. *Метод простої дифузії за Оуденом* застосовують шляхом нашаровування антигена на поверхню щільного агару, який містить специфічну сироватку.

2. *Метод подвійної дифузії (метод Оухтерлоні)* – застосовують найчастіше. Ставлячи реакцію за методом *Оухтерлоні,* сироватку вносять у спеціальні лунки, зроблені в агарі, що містить антиген.

Метод подвійної дифузії – це метод імунопреципітації, який використовується для виявлення антигенів і антитіл. Він полягає в тому, що антиген та відповідне антитіло дифундують в агаровому гелі, що містить електроліт, утворюючи видимі лінії преципітації (осадження) в зонах, де їх концентрації є відповідними, що дозволяє ідентифікувати ці молекули.

У бактеріологічні чашки наливають розплавлений агар. Після його застигання вирізають кілька лунок, користуючись спеціальним пристосуванням. У центральну лунку вносять сироватку, що містить відповідні антитіла, в решту лунок – досліджувані антигени або один і той же антиген у різних розведеннях. Чашки ставлять в ексикатор і термостат.

Результат враховують через добу, аналізуючи стан агарової пластинки між лунками з сироваткою й антигеном. У *позитивних випадках* на місці контакту антигенів та антитіл утворюється молочно-біла лінія преципітату. Якщо антигени ідентичні, зони їх дифузії з'єднуються і при контакті з зоною дифузії антитіла утворюють загальну дугоподібну лінію преципітації (рис. 1.44). Щоб запобігти утворенню псевдопреципітатів, необхідно використовувати очищені антигени.

Недоліком цих методик є тривалість реакції, недосконалість кількісного аналізу (особливо при дослідженні токсинів) і слабка чутливість у відношенні деяких бактерійних токсинів.

Для виявлення токсинів і визначення активності антитоксичних сироваток слугують: метод Рамона (1922) – **реакція осадження: реакція флокуляції** і метод Ерліха – **реакція нейтралізації** токсину (з включенням біопроби).

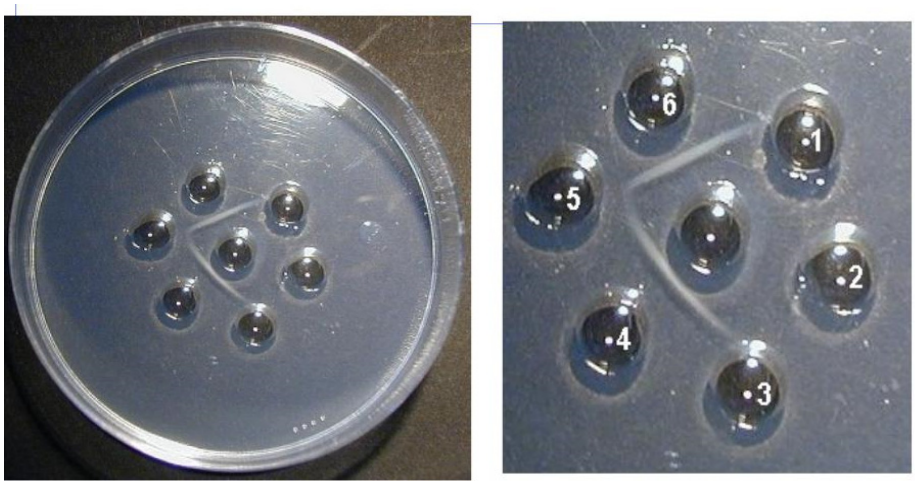


Рис.1.44. РДП в агаровому гелі

(Джерело: https://studfile.net/preview/6367912/page:3/)

Існує кілька модифікацій постановки РДП. Крім описаного, часто застосовують *капілярний мікрометод*, що характеризується високою чутливістю, економічною ефективністю, а також значним скороченням часу дослідження.

Реакція флокуляції дає змогу визначити токсичність досліджуваних бактерій за допомогою антитоксичних сироваток. У пробірки, що містять по 10 мл певного токсину, вносять специфічну сироватку у різних кількостях (1,0; 0,9; 0,8...0,3 і т. д.). Пробірки струшують, залишають при кімнатній температурі, а через певний час у них спостерігають опалесценцію, яка переходить у виразне помутніння. До кінця реакції утворюються пластівці й випадає осад.

Флокуляція спочатку з'являється в декількох пробірках, потім – у решті, будучи показником еквівалентності антигену (токсину) й антитіла (антитоксину), при якому відбувається взаємодія антигену з антитілом (токсину з антитоксином), повна нейтралізація токсину. У пробірках, де не досягнуто повного насичення, флокуляція настає пізніше.

Реакцію нейтралізації (РН) (за Ерліхом з біопробою) широко використовують для визначення видової належності бактерійних токсинів у досліджуваному матеріалі та активності антитоксичної сироватки. У вірусології її використовують для ідентифікації (типізації) деяких видів вірусів або відповідних антитіл.

В практичних діагностичних бактеріологічних лабораторіях, цю реакцію застосовують для визначення виду мікроба (анаероба) або типу мікробного токсину (збудники злоякісного набряку, дизентерії ягнят, ентеротоксемії овець).

Техніка постановки реакції нейтралізації (за Ерліхом) та оцінка результату.

1. У пробірки з однаковою кількістю антигену в 1 мл (наприклад, 1000 смертельних доз токсину збудника правця) вносять такий же об'єм специфічної протиправцевої гіперімунної антитоксичної сироватки, поступово зменшуючи її концентрацію.

2. Суміш токсин – антитоксин струшують у пробірках і поміщають у термостат при температурі 37° С на 1–2 год, потім вміст кожної пробірки вводять лабораторним тваринам (з розрахунку одне розведення на дві тварини, частіше морським свинкам).

3. *Облік реакції.* Тварини, яким вводили суміш, де відбулась нейтралізація токсину, залишаються живими, решта – гинуть. Найменшу кількість сироватки (найбільше її розведення), яка нейтралізує токсин, приймають за *одиницю активності антитоксичної сироватки (АО)*. Чим менша ця кількість, тим активніша сироватка.

Імуноелектрофорез. Дослідження за цим методом проводять у два етапи:

І етап – електрофоретичне розділення досліджуваного матеріалу в агарі;

ІІ етап – імунологічний аналіз.

В агарі паралельно із віссю міграції електрофоретичних функцій роблять невеликі траншеї, куди вносять імунну сироватку, що містить антитіла до досліджуваних антигенів. В позитивному випадку, в разі реакції між антигенами й антитілами формується преципітат у вигляді дискретних дуг, що відповідають індивідуальним системам антиген – антитіло.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти ставлять реакцію дифузійної преципітації методом подвійної дифузії (метод Оухтерлоні), здійснюють облік. Виконані завдання студенти заносять в протокол та підписують його у викладача.*

Питання для самоконтролю

1. Реакція преципітації - визначення, її практичне застосування.
2. Які компоненти потрібні для постановки реакції преципітації в рідкій фазі?
3. Відмінність антигенів двох моно- системних прямих (осадкових) реакцій – РП та РА.
4. Методи постановки дифузійної преципітації
5. Які компоненти потрібні для постановки реакції преципітації в агаровому гелі (РДП)?
6. Методика постановки реакції флокуляції, її практичне значення.

Лабораторне заняття №2.
МЕТОД ФЛУОРЕСЦІЮЮЧИХ АНТИТІЛ АБО РЕАКЦІЯ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

Мета заняття*: ознайомлення студентів із суттю та методикою постановки реакції імунофлуоресценції.*

Матеріали та обладнання. *Таблиця-схема МФА, флуоресціююча сироватка, досліджуваний матеріал (бактеріальна культура), чашки Петрі, фільтрувальний папір, знежирені предметні скельця, люмінесцентний мікроскоп.*

Індикація бактеріальних і вірусних антигенів в інфікованих матеріалах, тканинах тварин та клітинних культурах за допомогою флуоресціюючих антитіл набула значного поширення в діагностичній практиці.

Метод флуоресціюючих антитіл (МФА) – це один із методів експрес-діагностики, який представляє собою комплексний підхід. РІФ включає в себе:

А) *серологічну реакцію*, при якій відбувається специфічна взаємодія антигену і антитіла з утворенням імунного комплексу;

Б) *мікроскопічне дослідження*, яке дозволяє виявити цей комплекс на предметному склі на рівні навіть однієї мікробної клітини.

Комплексним дослідженням визначається висока чутливість і достовірність методу. За чутливістю і специфічністю він не поступається іншим серологічним реакціям.

У реакції імунофлуоресценції використовують антитіла, до яких спеціальним методом приєднано флуорохром (частіше флуоресцеїн – ізотіоціанат). Такі антитіла зберігають здатність специфічно реагувати з антигеном і завдяки наявності флуорохрому світитись під дією ультрафіолетових променів.

Суть реакції. Принцип методу визначення антигенів за допомогою флуоресціюючих антигенів полягає в тому, що мічені флуорохромом антитіла адсорбуються на поверхні відповідних антигенів й міцно з ними зв'язуються (якщо вони гомологічні). Якщо антиген (гетерологічний) не відповідає міченим антитілам, що знаходяться у сироватці, то останні легко видаляються на етапі промивання препарату.

Приготування препаратів. Об'єктами дослідження можуть бути мазки-відбитки, гістозрізи з уражених тканин, а також препарати з інфікованих курячих ембріонів, клітинних культур (КК).

Предметні скельця повинні бути чистими, знежиреними, без подряпин та інших пошкоджень. Препарат із нанесеним досліджуваним матеріалом (бактеріальна суспензія, мазок-відбиток) підсушують на повітрі і фіксують ацетоном (5 хв) або ж етанолом (10–15 хв), чи метанолом (5–10 хв).

Фіксацію здійснюють також шляхом нагрівання препарату над полум'ям спиртівки (як і при звичайній мікроскопії). Мазки-відбитки із органів і тканин краще обробляти охолодженим ацетоном до мінус 20°С. Зафіксовані препарати зберігаються досить довго.

Фарбування готових препаратів люмінесцентними сироватками можна здійснювати різними способами (варіантами) РІФ, залежно від конкретної мети.

Є кілька методів реакції імунофлуоресценції: *прямий, непрямий (двохступеневий), антикомплементарний (трьохступеневий)* (рис.1.45).

Прямий метод РІФ розроблений Кунсом із авторами (1950).

На предметне скло з фіксованим мікробним антигеном наносять краплю люмінесціюючої імунної сироватки, яка містить антитіла проти відповідного антигену. Препарати поміщають у вологу камеру (бактеріологічні чашки із змоченим ватним тампоном чи фільтрувальним папером) й витримують у термостаті при температурі 37 – 38°С протягом 15 – 30 хв. Потім протягом 5 – 10 хв їх промивають у проточній воді, щоб видалити надлишки люмінесцентної

сироватки або 0,15 М розчином хлористого натрію у фосфатному 0,01 М буфері.

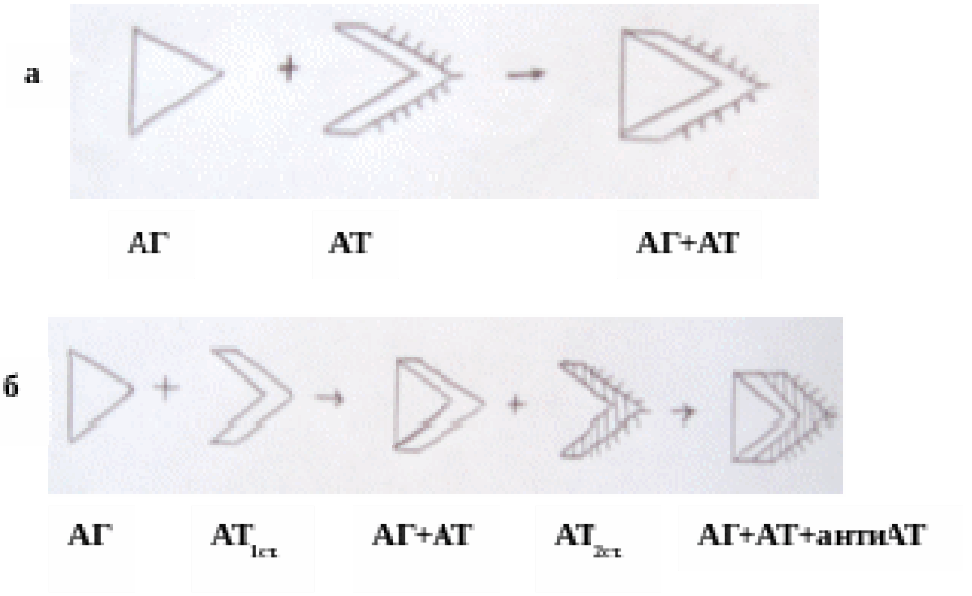


Рис.1.45. Схема варіантів прямої(а) та непрямої (б) реакції імунофлуоресценції
АГ – антиген; АТ – антитіло; $АТ_{1ст}$ – імунна сироватка; $АТ_{2ст}$ – люмінесціююча антивидова сироватка

Промитий препарат висушують фільтрувальним папером і проглядають під люмінесцентним мікроскопом. *Якщо антитіла відповідають антигену (гомологічні), то вони щільно приєднуються до нього, і в кінцевому результаті при люмінесцентній мікроскопії у препараті, темному полі зору мікроскопа, виявляють мікробні клітини, які світяться.*

Цим методом користуються лише для ідентифікації невідомого антигену. *Основним недоліком* його, є необхідність приготування люмінесціюючої сироватки для кожного виду ідентифікованого мікроорганізму.

Переваги прямого методу РІФ, як діагностичного методу – можливість провести дослідження протягом 2–3 год (експрес-метод), а також серологічно ідентифікувати мікроб безпосередньо у патологічному матеріалі без виділення його в чистій культурі. Як й інші серологічні реакції, РІФ можна використовувати і для виявлення антитіл в крові тварин. Особливістю даного методу є те, що взаємодія антигену і антитіла відбувається на предметному склі, на якому зафіксований антиген.

Непрямий (двохступеневий) метод РІФ запропонований Weller I Coons (1954), вважається більш універсальний, порівняно з описаним вище методом, тому що за допомогою однієї універсальної сироватки можна виявити різні види мікроорганізмів. Реакція ставиться послідовно, у два етапи.

На першому етапі на фіксований препарат наносять краплю імунної, не міченої імунної сироватки (сироватка першого ступеня), специфічної до передбачуваного антигену, і ставлять у термостат на 15–20 хв (в умовах вологої камери). Потім промивають водою або буферним розчином, висушують (як

описано вище). Якщо антитіла сироватки першого ступеня відповідають антигену, то вони фіксуються на ньому і не видаляються після промивання.

На другому етапі – на підсушений препарат наносять краплю люмінесцентної антивидової сироватки, що містить антитіла проти глобулінів першої сироватки і знову поміщають у термостат в умовах вологої камери на 15 – 20 хв. Після цього препарат знову промивають, висушують й мікроскопують.

Антивидова сироватка (другого ступеня) – це мічені флуорохромом антитіла проти глобулінів крові того виду тварин, від яких одержано імунну сироватку до передбачуваного антигену (сироватку першого ступеня). Таким чином, антитіла першої (не міченої) сироватки є антигеном для мічених антитіл антивидової сироватки. *В результаті, до комплексу антиген – антитіло, що утворився на першому етапі реакції, приєднуються антитіла антивидові другого ступеня, тобто утворюється подвійний комплекс, який можна виявити за допомогою люмінесцентного мікроскопа.*

Переваги. Універсальність непрямого варіанту забезпечується тим, що, використовуючи на першому етапі імунні сироватки, отримані на тваринах одного виду (наприклад, на конях) проти різних мікроорганізмів, можна за допомогою однієї антивидової сироватки ідентифікувати необмежену кількість збудників інфекційних захворювань.

Іноді використовують ***антикомплементарний* (трьохступеневий) *варіант РІФ,*** який представляє собою своєрідний варіант РЗК на склі. У даному випадку в імунному комплексі на склі. Використовуючи люмінесцентну сироватку виявляють зв'язаний комплемент. За допомогою двох- або трьохступеневого варіанту МФА, за участі відомого антигену, можна виявити антитіла в крові тварини.

На предметне скло з досліджуваним матеріалом наносять краплю імунної не міченої сироватки першого ступеня. Препарат ставлять у термостат, підсушують і на мазок наносять краплю комплементу. Після цього препарат знову ставлять у термостат на 15 – 20 хв, промивають і наносять люмінесцентну антикомплементарну сироватку. Описані процедури аналогічні тим, які виконують при прямому (одноступеневому) варіанті.

Контролі для РІФ. Для підтвердження специфічності результатів необхідно ставити такі контролі: *для прямого варіанту* люмінесцентною сироваткою забарвлюють гомологічні й гетерологічні в антигенному відношенні мікроорганізми. Світитись бактерії повинні лише у першому випадку і бути відсутніми у другому.

Для непрямого варіанту необхідно мати оброблені три контрольних препарати:

1. препарат оброблений нормальною сироваткою;
2. препарат оброблений люмінесцентною антивидовою сироваткою (без імунної, не міченої сироватки);
3. препарат оброблений люмінесціюючою антивидовою сироваткою і завчасно відомою імунною сироваткою першого етапу.

Специфічне світіння бактерій повинно бути лише у третьому контролі.

Для непрямого варіанту з комплементом обов'язковими контрольними препаратами є ті, у яких імунну сироватку замінено нормальною сироваткою того ж виду тварини й у тих же розведеннях, а також препарати, оброблені усіма інгредієнтами, крім імунної сироватки

Оцінка результатів РІФ. При оцінці результатів реакції необхідно враховувати яскравість і колір, локалізацію й структуру об'єкта, що світиться. Бактерії, забарвлені люмінесцентною сироваткою, міченою ізотіоціанатом флуоресцеїну, яскраво світяться зеленим кольором по периферії у вигляді кайми чи ореолу. Центральна частина бактерій освітлена слабко. Таке світіння називають специфічним (на відміну від неспецифічного, коли уся мікробна клітина світиться рівномірно). Пластичні бактерії (лептоспіри, вібріони) світяться рівномірно.

Інтенсивність світіння оцінюють в плюсах, за чотирьох бальною системою:

(++++) – дуже яскрава флуоресценція по периферії мікробної клітини, яка чітко контрастує з темним тілом клітини;

(+ + +) – яскрава флуоресценція по периферії клітини;

(+ +) – слабке світіння по периферії клітини;

(+) – ледь помітне світіння по периферії;

(–) – світіння по периферії клітини відсутнє (видно тільки тінь мікробної клітини).

При ідентифікації різних збудників позитивним результатом вважають специфічне світіння бактерійних клітин за умови не нижче (+ + +) чи (++++).

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти самостійно готують препарати – фіксують, обробляють флуоресціюючою сироваткою, досліджують під люмінесцентним мікроскопом, мікроскопічну картину замальовують у зошиті.*

Питання для самоконтролю

1. Суть методу флуоресціюючих антитіл.
2. Варіанти РІФ, їх принципова різниця, недоліки і переваги.
3. Умови постановки МФА, у всіх модифікаціях (варіантах), переваги і недоліки.
4. Обов'язкові контролі при постановці РІФ.
5. Облік і оцінка результату постановки РІФ.

Лабораторне заняття №3.
РЕАКЦІЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ

Мета заняття: *ознайомити студентів із суттю РЗК, технікою постановки РЗК, методикою визначення титрування компонентів, із використанням РЗК у ветеринарній практиці.*

Матеріали та обладнання. 1. *Для титрування гемолізину і комплементу: чисті, сухі пробірки, штативи, градуйовані піпетки резинові груші, фізрозчин, водяна баня (37-38º С) з термометром, гемолізин в ампулах і окремо в розведенні 1:100, 2,5 %-а суспензія еритроцитів барана, таблиці (схеми) титрування гемолізину і комплементу.*

2. Для постановки основного досліду РЗК: фізіологічний розчин, 2,5% -ва суспензія еритроцитів барана у розведенні 1:40, бруцельозний антиген, позитивна бруцельозна сироватка, нормальна сироватка великої рогатої худоби, комплемент морської свинки, гемолізин, мірні піпетки на 1-2 мл, водяна баня. Таблиця-схема постановки РЗК.

Реакцію зв'язування комплементу (РЗК) вперше описано Борде і Жангу у 1901 році. На відміну від РА і РП при РЗК поєднання антигену з антитілом відбувається тільки в присутності третього компоненту – комплементу. Якщо антиген і антитіло не відповідають один одному (не гомологічні), комплемент не зв'язується і залишається вільним у системі.

РЗК застосовують для визначення наявності у сироватці крові хворої тварини специфічних антитіл (діагностика бруцельозу, сапу, лептоспірозу тощо), а також для виявлення у досліджуваному матеріалі специфічного антигену (бактеріальний, вірусний) у різних матеріалах за допомогою специфічних імуносироваток.

Як працює реакція зв'язування комплементу:

1. Перша стадія:

Якщо у зразку крові присутні антитіла до певного антигену (або антиген до антитіл), вони утворюють комплекс антиген-антитіло.

2. Зв'язування комплементу:

Цей комплекс здатний зв'язувати білки комплементу з сироватки крові.

3. Інактивація комплементу:

У результаті зв'язування комплемент споживається і стає неактивним (інактивується).

4. Виявлення результату:

Реакція утворення *комплексу антиген – антитіло – комплемент* невидима. Щоб виявити взаємодію компонентів, використовують додаткову індикаторну систему, яка відображає результат взаємодії комплементу у першій системі.

Раніше в якості антигену використовували суміш бактерій, і у позитивних випадках відбувався їх лізис (бактеріолізис), тому перша система отримала назву бактеріолітичної.

Індикаторна система, складається з еритроцитів крові тварин і антитіл до цих еритроцитів. Якщо комплемент зв'язався з першим комплексом, він не

може зв'язати еритроцити, і гемолізу (руйнування еритроцитів) не відбувається. Якщо ж комплемент залишився вільним, він зв'яже еритроцити, спричинивши гемоліз. Відповідно, до цих процесів, в основу РЗК покладено два явища – бактеріоліз і гемоліз, тобто, в РЗК беруть участь дві системи: *1) бактеріолітична (діагностична) і 2) гемолітична (допоміжна-індикаторна),* яка дозволяє встановити чи відбулося зв'язування комплементу у першій системі. Для специфічної реакції в кожній системі необхідні певні компоненти (табл. 1.11).

Реакція ставиться у декілька етапів: 1) титрування гемолізину;

2) титрування комплементу; 3) основний дослід.

Підготовка компонентів для постановки РЗК:

1. Усі сироватки досліджувані та контрольні (позитивні і нормальні), перед постановкою реакції розводять фізрозчином 1:5 або 1:10. З метою руйнування власного комплементу (щоб не відбулось коагуляції білка), сироватки інактивують (прогрівають) у водяній бані 30 хв:

- при 63°С – кролів та собак;
- 56–58°С – великої рогатої худоби;
- 58–60°С – коней та овець;
- 63–65°С – ослів та мулів.

Таблиця 1.11. Основні системи реакції зв'язування комплементу

Системи РЗК	Компоненти РЗК
1. Бактеріолітична система (основна – діагностична)	1. досліджувана сироватка хворої тварини
	2. специфічний антиген
	3. комплемент *(сироватка морської свинки)*
2. Гемолітична система (допоміжна, індикаторна) відображає, що відбувається у бактеріолітичній системі)	1. гемолізин- антитіла до еритроцитів
	2. еритроцити барана (*2,5%-а суспензія)* – антиген для гемолізинів

2. Антиген для РЗК готують на біофабриках. Як правило, це екстракти із зруйнованих бактерій або інфікованих ними тканин, завись убитих бактерій, що не мають гемолізуючої дії. Остання контролюється під час постановки реакції (у пробірку вносять 1 – 2 робочі дози антигену + 0,5 мл суспензії еритроцитів).

На ампулі антигену біофабрика вказує його спеціальне призначення – для РЗК (сапний, бруцельозний чи інший). На упаковці антигену зазначено номер серії, контроль, дату виготовлення, термін придатності та активність, тобто у якому розведенні його слід використовувати при постановці реакції – 1 : 100, 1 : 150 і т. д. При тривалому зберіганні антигенів їх знову титрують (встановлюють робочий титр) в лабораторії за спеціальною схемою.

3. Еритроцити барана отримують із дефібринованої крові барана. Вони є антигеном в гемолітичній системі. Кров беруть у дорослих баранів з яремної вени у колбу (флакон) із скляними намистинами (кульками) і невеликою кількістю фізрозчину. Колбочки із кров'ю струшують обережними круговими рухами, фібрин осідає на кульках, а кров стає дефібринованою.

Рідку частину крові центрифугують, надосадову рідину відбирають піпеткою, осад (еритроцити) – ресуспендують фізрозчином. Таке відмивання еритроцитів повторюють декілька разів (3 – 4) шляхом центрифугування, допоки рідина над осадом еритроцитів не стане зовсім прозорою і безколірною, потім її видаляють, а осад розводять фізрозчином 1:40.

4. Гемолізин це антитіло по відношенню до еритроцитів барана, готують на біофабриках шляхом гіперімунізації кролів відмитими еритроцитами крові барана. Для цього, кролям внутрішньовенно 5 – 6 разів вводять 40 – 50 %-у суспензію відмитих еритроцитів, з інтервалом 2 – 3 доби. Через тиждень після останньої ін'єкції у тварин беруть кров. Після утворення та ретракції згустку асептично піпеткою відбирають сироватку, інактивують її, консервують гліцерином (1:1) або 0,5 %-м фенолом, титрують і розливають в ампули.

Перед постановкою РЗК, у лабораторії гемолізин знову титрують, оскільки його активність з часом знижується, тобто визначають найменшу кількість гемолізину, або найбільше розведення, яке у присутності комплементу викликає повний гемоліз еритроцитів.

Для титрування гемолізину, необхідно попередньо підготувати такі компоненти: гемолізин у розведеннях, комплемент – 1:20; суспензією еритроцитів крові барана – 1 :40; фізіологічний розчин NaCl.

Схема титрування гемолізину. У штативі розміщують два ряди пробірок: один (допоміжний) – для приготування розведень гемолізину, другий – для титрування останнього.

Біофабрики іноді виробляють гемолізин, консервований гліцерином 1 : 1, тому, для титрування готують гемолізин у розведенні 1 : 100 (2 мл гемолізину + 9,8 мл фізіологічного розчину). Далі, із цього розведення, готують *основне - 1 : 1000* (1 мл гемолізину 1 : 100 + 9 мл фізіологічного розчину). Із основного розведення (1 : 1000) готують усі наступні. Отримавши необхідні розведення гемолізину, проводять його титрування за схемою, вказаною на рис. 1.46.

Розведення гемолізину. У першу пробірку допоміжного (першого) ряду вносять вихідне розведення 1:100, потім проводять послідовні розведення як показано, на рисунку 1.42 (верхній ряд).

Титрування гемолізину. З кожної пробірки відповідного розведення гемолізину в окрему пробірку переносять по 0,5 мл. В усі пробірки другого ряду додають комплемент (1:20) та 2,5%-у суспензію еритроцитів барана по 0,5 мл кожного, і по 1 мл фізрозчину, щоб загальний об'єм рідини досягав 2,5 мл. Усі пробірки легенько струшують і ставлять на водяну баню при температурі 37 – 38 °С на 10 – 15 хв.

Результати титрування оцінюють в плюсах (після осідання еритроцитів). Врахування результатів розпочинають з пробірок із найбільшою кількістю гемолізину, де перш, за все, повинен бути гемоліз (1:500, 1:1000…). У пробірці з найменшою кількістю гемолізину (найбільшим його розведенням), де відбудеться повний гемоліз (лізис еритроцитів), рідина стане червоною, прозорою. Ця кількість і буде ***граничним (фактичним) титром гемолізину.*** В даному випадку фактичний титр гемолізину становить 1 : 2000.

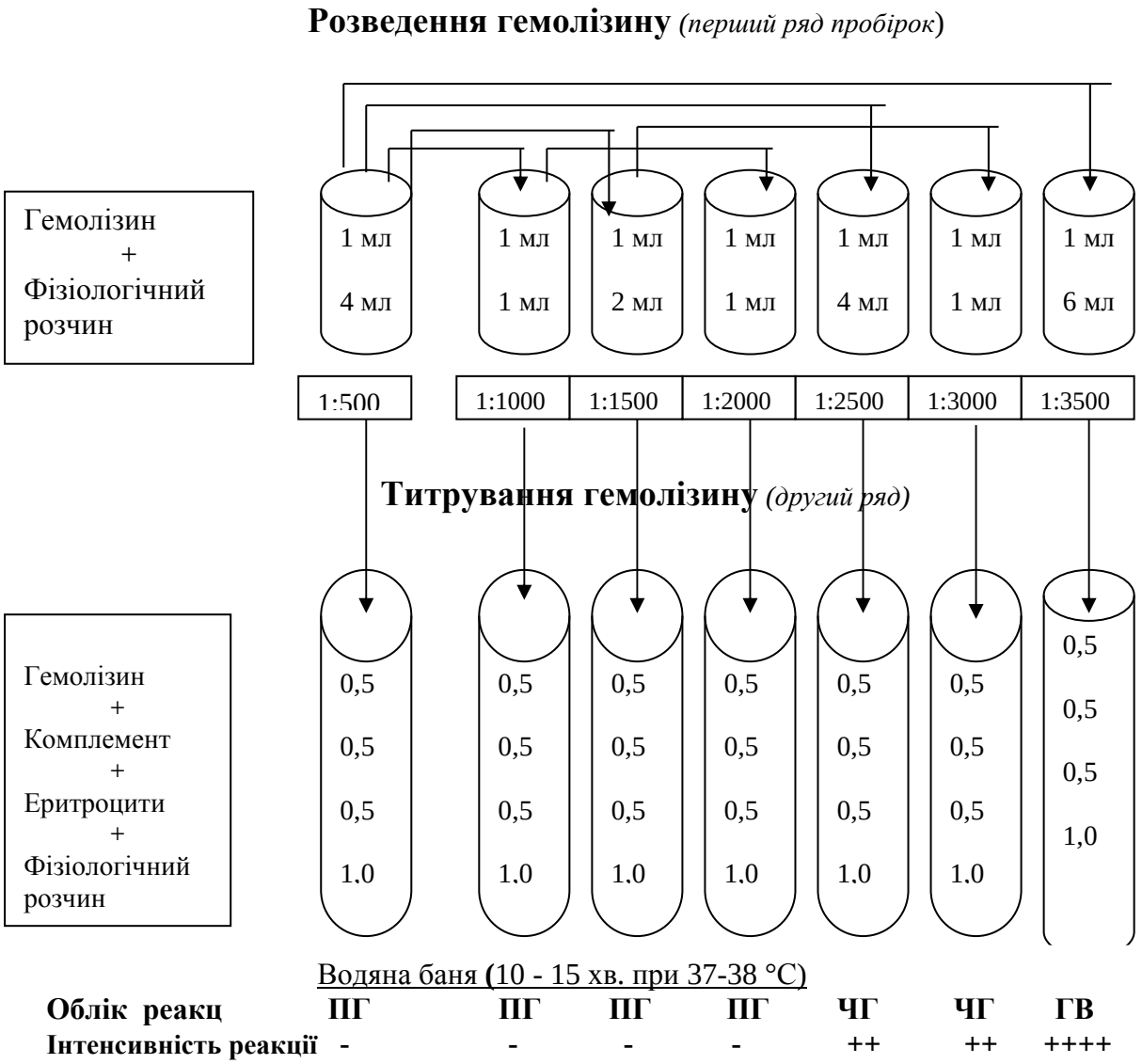


Рис. 1.46. Схема розведення і титрування гемолізину

Для подальшої роботи (титрування комплементу, постановка головного досліду РЗК) гемолізин використовують у 2 рази більш концентрованішим (у подвійному титрі), який називають ***робочим титром гемолізину.*** *Наприклад*, якщо фактичний титр гемолізину становить 1 : 2000 (як у даному випадку за схемою), або 1:1250, то для отримання робочого титру, гемолізин розводять фізіологічним розчином, відповідно 1:1000 (1 мл відтитрованого гемолізину + 1000 мл фізіологічного розчину) або (1:1250) – 1 мл відтитрованого гемолізину + 1250 мл фізіологічного розчину. При постановці основного досліду РЗК використовують гемолізин у робочому титрі.

При титруванні гемолізину ставлять два контролі:

1) 0,5 мл гемолізину у робочому титрі + 0,5 мл суспензії еритроцитів + 1,5 мл фізіологічного розчину;

2) 0,5 мл комплементу (1:20) + 0,5 мл еритроцитів + 1,5 мл фізіологічного розчину. Пробірки струшують і ставлять у водяну баню. У контрольних пробірках гемолізу не повинно бути.

5. Комплемент складова частина свіжої сироватки крові, лімфи, тканинних рідин теплокровних тварин і людини. Це група білків, що є важливою частиною гуморального імунітету хребетних тварин, і вони діють як «доповнення» до імунної відповіді на патогени. Система комплементу включає протеази та їх активатори, які беруть участь у захисті організму від інфекцій.

Для постановки РЗК в якості комплементу використовують свіжу або ліофілізовану сироватку крові морських (гвінейських) свинок, які відрізняються найбільш стабільною продукцією компонентів комплементу – найбільш чутливий комплемент.

Комплемент відкрито Бухнером (1889). Має білкову природу, інактивується при нагріванні до температури 56 °С протягом 30 хв, тривалому зберіганні, під дією ультрафіолетових променів, хімічних речовин (кислоти, луги, ацетон, хлороформ тощо), сильному струшуванні тощо.

Біологічна промисловість випускає комплемент, консервований висушуванням в умовах вакууму при низьких температурах (ліофілізація). Ліофілізований комплемент в ампулах зберігається два роки. Перед постановкою РЗК комплемент обов'язково титрують, тобто *визначають його робочу дозу* – найменшу кількість, яка зумовлює повний гемоліз еритроцитів крові барана в стандартних умовах постановки РЗК. Титрування проводять *у гемолітичній системі*, а потім – *у бактеріолітичній*.

Титр комплементу – це найменша його кількість, при якій спостерігається повний гемоліз 2,5-3%-ї суміші еритроцитів протягом 30 хв.

Робоча доза комплементу, завжди буде більша, ніж титр на 25% і практично вона буде міститися у наступній пробірці.

Титрування комплементу у гемолітичні системі. Для титрування комплементу у гемолітичній системі готують такі компоненти:

- комплемент у розведенні 1:20 (1 мл комплементу+19 мл фізіологічного розчину),
- гемолізин, розведений відповідно до робочого титру,
- суспензію відмитих еритроцитів крові барана (1 : 40),
- фізіологічний розчин.

У пробірки, поставлені в один ряд у штатив, градуйованою піпеткою розливають різну кількість комплементу, збільшуючи дозу на 0,03 мл (0,13; 0,16; 0,19; від 0,22 до 0,43). Потім у ці ж пробірки вносять фізіологічний розчин у кількості, що становить разом з комплементом 0,5 мл, тобто у першу – 0,37, у наступні – 0,34; 0,31; 0,28 і т. д.

Після цього в усі пробірки вносять по 0,5 мл гемолізину та еритроцитів крові барана і по 1 мл фізіологічного розчину. Пробірки струшують, ставлять у водяну баню на 10 – 15 хв при температурі 37–38 °С, після чого враховують результат.

При титруванні комплементу у гемолітичній системі, необхідно ставити два контролі *(кожний компонент у окремій пробірці):*

1) 0,5 мл гемолізину у робочому титрі + 0,5 мл суспензії еритроцитів + 1,5 мл фізіологічного розчину;

2) 0,5 мл комплементу (1:20) + 0,5 мл еритроцитів + 1,5 мл фізіологічного розчину. Пробірки струшують і ставлять у водяну баню. У контрольних пробірках гемолізу не повинно бути (табл. 1.12).

Таблиця 1.12. Схема титрування комплементу в гемолітичній системі

Компоненти, мл	**Пробірки**											**контроль**	
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12 КС**	**13 КГС**
1. Комплемент у розведенні 1:20	0,1	0,13	0,16	0,19	0,22	0.25	0.28	0.31	0.34	0,37	0,40	0,5	-
2. Фізрозчин	0,4	0,37	0,34	0,31	0,28	0,25	0,22	0,19	0,16	0,13	0,10	1,0	1,5
3. Гемолізин (гемолітична сироватка)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
4. Еритроцити барана	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5. Фізрозчин	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-
	Термостат 37–38 °С – 30 хв												
Результат	НГ	НГ	НГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	-	-

Примітка: **КС** – контроль сироватки; **КГС** – контроль гемолітичної системи;
НГ – відсутній гемоліз; ЧГ –частковий гемоліз; ПГ – повний гемоліз

Титрування комплементу у бактеріолітичній системі. *Інгредієнти для титрування комплементу:*

1.Комплемент (1 :20);

2. Суспензія еритроцитів крові барана (1 : 40);

3. Гемолізин у робочому титрі;

4. Два зразки позитивних сироваток;

5. Два зразки нормальних сироваток;

6. Специфічний антиген (у титрі, зазначеному на етикетці).

Послідовність титрування. Кожний зразок сироватки (у розведенні 1 : 10) інактивують при температурі 56 – 58 °С протягом 30 хв і розливають у два ряди пробірок по 0,5 мл. Далі, в усі пробірки додають комплемент у зростаючій кількості, починаючи з дози його титру в гемолітичній системі. У наступні пробірки вносять комплемент, щоразу збільшуючи його дозу на 0,03 мл (як і при титруванні комплементу у гемолітичній системі). Для вирівнювання об'єму вмісту кожної пробірки до 0,5 мл, додають необхідну кількість фізіологічного розчину.

У пробірки першого ряду кожної проби сироватки (позитивні й нормальні) додають по 0,5 мл антигену, другого ряду – по 0,5 мл фізрозчину. Усі пробірки злегка струшують, поміщають у водяну баню при 37– 38 °С на 30 – 40 хв, після чого в кожну з них вносять по 0,5 мл гемолізину і суспензії еритроцитів, струшують і повторно ставлять у водяну баню на 10 – 15 хв.

Результат. Огляд пробірок починають із другого ряду кожної сироватки (без антигену) і нормальних сироваток з антигеном (перший ряд).

У цих пробірках слід очікувати повного гемолізу, враховуючи лише найменшу кількість комплементу, що зумовив цей гемоліз за умови, що у перших рядах пробірок з позитивними сироватками й антигеном з тією ж дозою комплементу буде повна затримка (відсутність) гемолізу.

Найменшу кількість комплементу, що забезпечує повний гемоліз в нормальній сироватці з антигеном і без нього, при повній затримці його в позитивній сироватці з антигеном, називають *титром комплементу у бактеріолітичній системі.* У цьому титрі використовують комплемент при постановці основного досліду РЗК (з діагностичною метою).

Усю роботу по титруванню комплементу, гемолізину та постановку основного досліду РЗК здійснюють протягом одного дня.

ІІІ. Постановка основного досліду РЗК (діагностичне дослідження).

Компоненти РЗК:

Для основного досліду:

1. зразки сироваток крові тварин, направлених на дослідження,
2. антиген у розведенні відповідно до титру (позначеному біофабрикою на упаковці);
3. комплемент (сироватка крові морської свинки) у розведенні відповідно до встановленого титру (при титруванні);
4. гемолізин у робочому титрі;
5. суспензія еритроцитів крові барана у розведенні 1 : 40;
6. фізіологічний розчин.

Для контролю:

- два зразки сироваток крові – специфічні (стандартні, гіперімунні), які містять антитіла до антигену, *забезпечують позитивний результат)*;
- два зразки сироваток крові здорових тварин (нормальна, негативна сироватка).

Відповідно до класичної методики постановки РЗК, яку запропонували Ж. Борде і О. Жангу, відтитровані інгредієнти (антиген, комплемент і гемолітична сироватка) розбавляють фізіологічним розчином, так, щоб робоча доза кожного із них була в об’ємі 0,5 мл. Основну РЗК ставлять в загальному об’ємі 2,5 мл.

РЗК здійснюють у два етапи.

І етап РЗК. *Спочатку готують бактеріологічну систему*. Для цього, у пробірки, наливають розведену, інактивовану досліджувану сироватку тварини, до якої додають рівні об’єми антигену і комплементу в робочій дозі (по 0,5 мл). Пробірки ретельно струшують і ставлять у термостат (або водяну баню) при 37-38 °С на 20 – 40 хв. За цей час з’єднується антиген з антитілом, і на цьому комплексі фіксується комплемент.

Результат взаємодії компонентів у пробірці невидимий, рідина залишається прозорою і безбарвною. Щоб визначити, зв'язався комплемент у бактеріолітичній системі чи ні, необхідно поставити другий етап реакції.

ІІ етап РЗК. Після термостату, в усі пробірки основного досліду, вносять компоненти гемолітичної системи *(відмиті еритроцити крові барана та інактивовану гемолітичну сироватку 0,5 + 0,5 мл, відповідно)*, пробірки струшують, й знову поміщають у водяну баню (термостат) на 20 – 40 хв. Після цього, враховують попередній результат (наявність чи відсутність гемолізу). Для кінцевого обліку результату реакції, пробірки залишають ще при кімнатній температурі на 18 – 20 год і враховують остаточний результат (рис. 1.47).

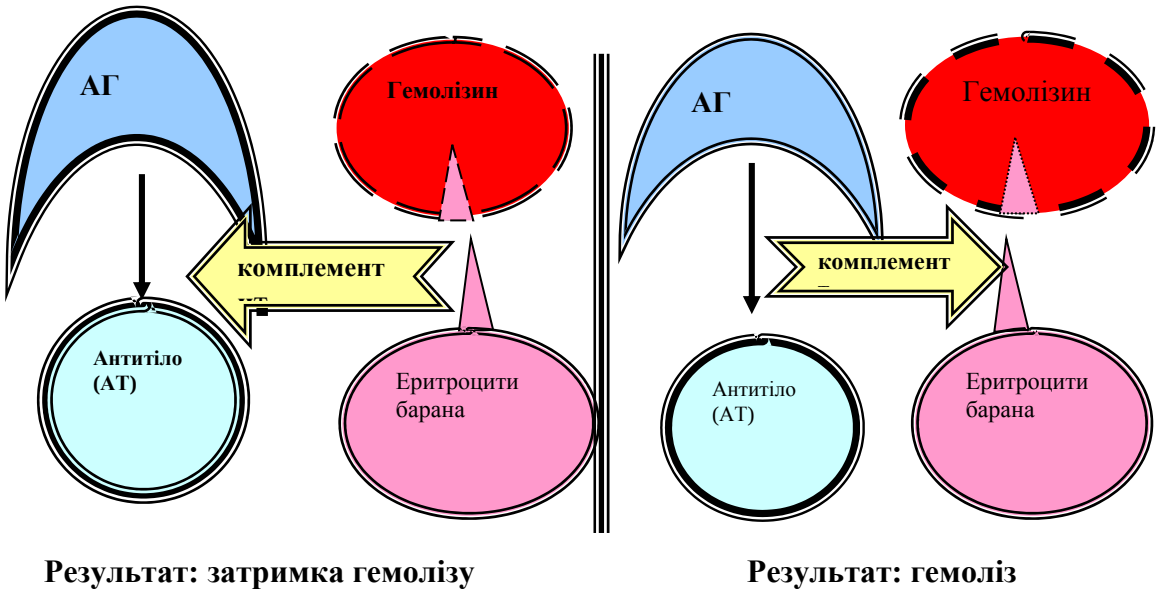


Рис. 1.47. Схема постановки й облік результату РЗК

При постановці основного досліду РЗК ставлять контролі нормальної і позитивної сироватки у розведенні 1:5 та 1:10 з антигеном і без нього.

Контролі:

1). комплементу *(0,5 мл комплементу +1,5 мл фізрозчину + 0,5 мл 2,5%-ї суспензії еритроцитів);*

2). гемолітичної системи *(0,5 мл комплементу + 1 мл фізрозчину + 1 мл гемолітичної системи);*

3). антигену у робочій дозі *(0,5 мл комплемент + 0,5 мл антигену + 0,5 мл фізрозчину + 1 мл гемолітичної системи).*

Об'єм вмісту кожної пробірки доводять фізіологічним розчином до 2,5 мл. Пробірки струшують, ставлять у водяну баню при температурі 37 °С на 20 хв. *В усіх контрольних пробірках гемолізу не повинно бути.*

Облік РЗК. Результати досліду оцінюють після другої фази реакції, при наявності повного гемолізу в контрольних пробірках: антигену і сироватки.

1. *Якщо сироватку одержано з крові хворої тварини*, то в ній є антитіла, які з'єднуються з відповідним антигеном. Із цим комплексом антиген – антитіло зв'язується комплемент. Відсутність останнього не призведе до гемолізу

еритроцитів в індикаторній системі (затримка гемолізу), що свідчить про *позитивний результат постановки реакції* (рис. 1.48).

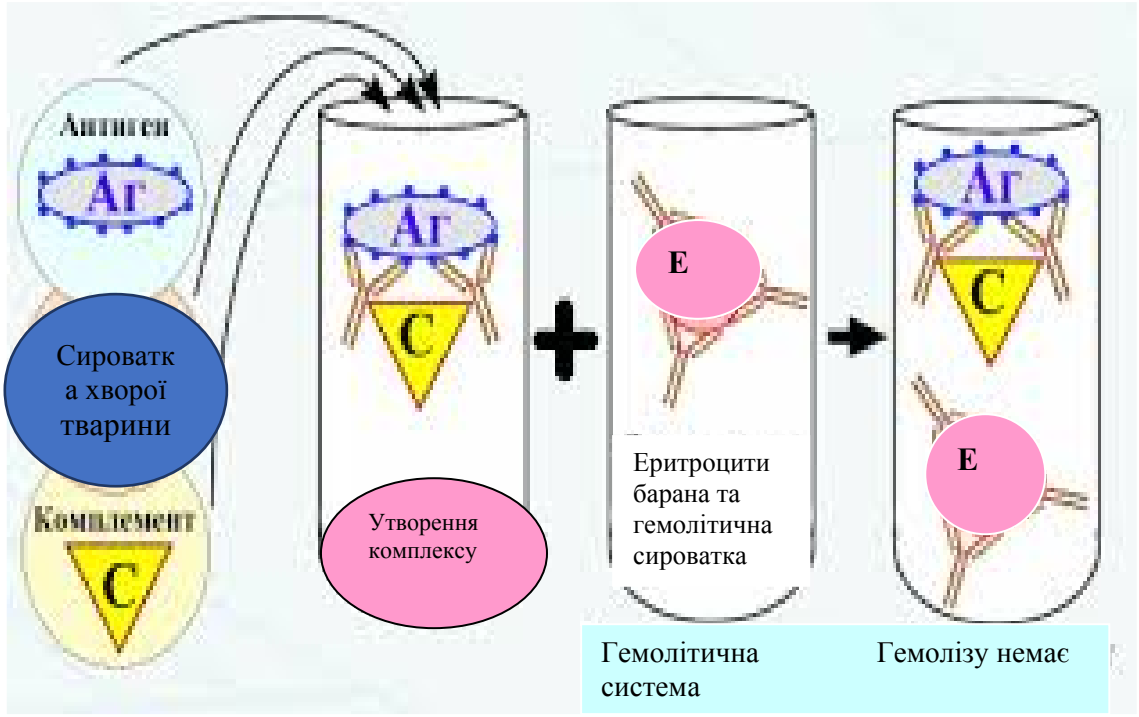


Рис. 1.48. РЗК (затримка гемолізу – позитивний результат)
(Джерело:https://edubiotech.ru/images/vetfac/images/ebooks/microbiology/stu/immun/rsk.htm)

2. *Якщо сироватку одержано з крові здорової тварини*, то вона не містить антитіл, тому комплекс антиген-антитіло не утворюється, комплемент у бактеріологічній системі не зв'язується. При внесенні у пробірку еритроцитів та гемолізину відбудеться гемоліз. *Результат постановки реакції в такому випадку вважають негативним.*

Інтенсивність РЗК оцінюється в плюсах (+), за чотирибальною системою (після осідання еритроцитів):

1. (++++) - 100%-ва повна затримка гемолізу (рідина безколірна, еритроцити осідають на дно - **реакція позитивна;**

2. (+++) - 75%-ва затримка гемолізу (рідина блідо-рожева, значний осад еритроцитів – **реакція позитивна;**

3. (++) - 50%-ва часткова затримка гемолізу (рідина рожевого кольору, компактний осад еритроцитів) – **реакція позитивна;**

4. (+) – незначна (25%-ва), затримка гемолізу (на дні ледь помітний осад еритроцитів, рідина рожевого кольору) – **сумнівна реакція.**

5. (-) – повний гемоліз (осад відсутній, рідина прозора червоного кольору («лакова кров») **- реакція негативна.**

Реакцію тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) запропоновано Якобшином (1910), як більш ефективну по чутливості порівняно з класичною методикою РЗК.

Суть реакції полягає у тому, що бактеріологічну систему, послідовно витримують при трьох різних температурних режимах:

І-й – після змішування компонентів, пробірки витримують при кімнатній температурі протягом 15 хв,

ІІ-й – пробірки витримують при низькій температурі 4 °С у холодильнику (рефрижераторі) протягом 18-20 год,

ІІІ-й – пробірки підігрівають у водяній бані (37 °С) протягом 15 хв.

Після таких маніпуляцій, у пробірки добавляють компоненти гемолітичної системи, злегка струшують, знову поміщають у водяну баню і враховують результати реакції, як і при РЗК.

Ця модифікація РЗК рекомендована для діагностики туберкульозу, кампілобактеріозу, бруцельозу та ін.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Для виконання поставлених завдань студенти працюють групами – по два. Проводять титрування комплементу, ставлять основний дослід РЗК та враховують результати реакції. Схему постановки основного досліду РЗК і облік результатів, занотовують у зошит.*

Питання для самоконтролю

1. Суть реакції зв'язування комплементу.
2. Призначення компонентів РЗК та їх отримання.
3. Принципи одержання гемолізину. Методика титрування.
4. Що означає робочий титр гемолізину?
5. Призначення гемолітичної системи.
6. Призначення в РЗК комплементу.
7. З якою метою досліджувані сироватки прогрівають перед постановкою РЗК?
8. Суть методики РТЗК.

РОЗДІЛ 2.
ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БАКТЕРІОЗІВ, МІКОПЛАЗМОЗІВ, РИКЕТСІОЗІВ, ХЛАМІДІОЗІВ, МІКОЗІВ ТА МІКОТОКСИКОЗІВ У ТВАРИН

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СТАФІЛОКОКОЗУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника стафілококозу та з методами лабораторної діагностики стафілококозу.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі, бактеріологічні петлі, поживні середовища МПА, МПБ, Беард-Паркера агар, кров'яний агар, сольовий агар.*

Стафілококоз (стафілококова інфекція) – захворювання бактеріальної етіології багатьох видів ссавців (гризуни, собаки, кішки, кролики, птиця, сільськогосподарські тварини, людина та ін.). Стафілококова інфекція може перебігати як самостійне захворювання та як вторинна інфекція.

Збудником стафілококової інфекції є бактерії з родини *Staphylococcaceae* роду *Staphylococcus*. Відповідно до міжнародної класифікації на даний час до роду *Staphylococcus* належать 34 види стафілококів, серед яких *S. aureus* (стафілокок золотистий, володіє найбільшим патогенним потенціалом), *S. epidermidis* (стафілокок епідермальний), *S. saprophyticus* (стафілокок сапрофітний), *S. haemolyticus* (стафілокок гемолітичний), *S. hyicus*. Представники роду *Staphylococcus* поширені в природі, більшість з них непатогенні, є компонентами нормальної мікрофлори шкіри і слизових оболонок людини і тварин, компонентами ґрунтової мікрофлори. Метицилін-резистентні (MRSA) *S. aureus* стійкі до бета-лактамних антибіотиків (пеніциліни та цефалоспорини). Захворювання, спричинені MRSA, особливо важко піддаються лікуванню.

Морфологія. *Staphylococcus spp.* кулястої форми (коки), діаметром 0,8–1,0 мкм, у чистих культурах розміщуються скупченнями які морфологічно нагадують виноградне гроно; в мазках із патологічного матеріалу також зустрічаються моно- і диплококи.

Тинкторіальні властивості. *Staphylococcus spp.* грампозитивні, не рухливі, не утворюють спор та капсул.

Культуральні властивості. Факультативні анаероби, мезофіли. Невибагливі до поживних середовищ. Оптимальна температура культивування 35–40 °С, термін культивування – 24–48 годин, оптимальна концентрація водневих іонів у середовищі культивування – у діапазоні pH 7,0-7,5. Додавання до складу поживних середовищ глюкози, крові стимулює ріст стафілококів (реєструють прискорення росту та підвищення рівню накопичення живих мікробних клітин у культурі). Для представників роду *Staphylococcus spp.* характерна здатність рости в присутності 15 % хлориду натрію або 40 % жовчі.

На твердих поживних середовищах утворюють колонії S-форми: на МПА, колонії правильної круглої форми діаметром 1-3 мм, опуклі, непрозорі, з гладкою блискучою поверхнею. Залежно від кольору пігменту що продукують *Staphylococcus spp.* різних видів забарвлені в золотистий, палевий, білий, лимонно-жовтий колір. На кров'яному агарі *Staphylococcus spp.*, що володіють гемолітичною активністю (викликають β-гемоліз) (*S. aureus, S. haemolyticus*) утворюють оточені зоною гемолізу колонії (рис. 2.1).

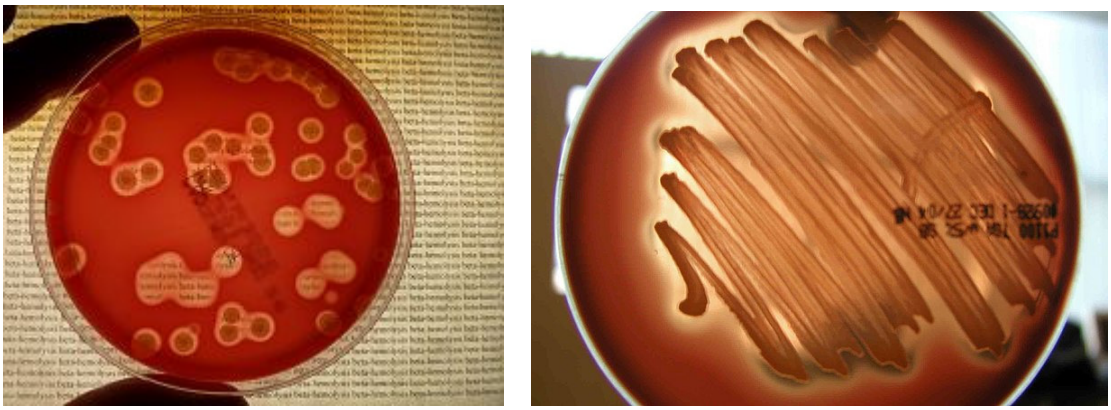


Рис. 2.1. *S. aureus*, ріст та β-гемоліз на кров'яному агарі
(Джерело: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/staphylococcus-aureus-photos/s_aureus_hemolysis.html)

На середовищі Беард-Паркера агар *S. aureus* ростуть у вигляді чорних блискучих опуклих колоній розміром 1–1,5 мм, оточених зоною просвітлення середовища шириною 1–3 мм (лецитиназна активність) (рис.2.2).

В рідких поживних середовищах (МПБ, ПБ, ГРМБ) на 24–48 годину культивування викликають помутніння й білий аморфний осад на дні.



Рис. 2.2. Беард-Паркера агар, ріст колоній *S. aureus* з лецитиназною активністю *(Джерело: https://microbiologyclass.net/baird-parker-agar/)*

Додавання до середовища культивування 7-10 % хлориду натрію створює селективні умови для виділення *Staphylococcus spp.*, оскільки бактерії інших родин такої високої концентрації хлориду натрію не витримують.

Патогенність. *Staphylococcus spp.* відносяться до умовно-патогенних мікроорганізмів, які вражають різні органи й тканини. У зв'язку з продукуванням ентеротоксину у людини і тварин *Staphylococcus spp.* (*S. aureus*) здатні зумовлювати харчові отруєння. За патогенністю виділяють: *Staphylococcus spp.* коагулазопозитивні – *S. aureus, S. intermedius. S. aureus* – вид стафілококів, патогенний для людини і тварин; *S. intermedius* – на даний час ідентифікується як патогенний лише для тварин (здатний викликати враження шкіри собак і котів).

Staphylococcus spp. коагулазонегативні – *S. epidermidis, S. saprophyticus. S. epidermidis* – є коменсалом шкіри, але може викликати гострі інфекції при пригніченні імунітету. *S. saprophyticus* патогенний лише для людини.

Фактори патогенності стафілококів:

Мікрокапсула – захищає бактеріальні клітини від фагоцитозу; сприяє адгезії та поширенню *Staphylococcus spp.* по тканинах макроорганізму, забезпечує стійкість до фагів.

Компоненти клітинної стінки:

-тейхоєві кислоти – індукують активність каскад комплементу за альтернативним шляхом, забезпечують адгезію до епітеліальних поверхонь;

- білок А – неспецифічно зв'язує Fc-фрагмент молекул IgG через блокаду їх опсонізаційної активності.

Фрагменти адгезії:

- каталаза – захищає від дії киснево-залежного фагоцитозу;
- β-лактамаза – руйнує молекули β-лактамних антибіотиків;
- ліпази – сприяють адгезії та проникненню в тканини;
- плазмокоагулаза – захищає бактеріальні клітини від фагоцитозу;
- фібринолізин – розсмоктує фібринозну плівку, лізис фібрину призводить до інвазії мікробів по макроорганізму, що викликає генералізовану інфекцію;
- гіалуронідаза –порушує проникненість тканин, що сприяє поширенню стафілококів по макроорганізму;
- лецитиназа – руйнує лецитин клітинних мембран лейкоцитів та інших клітин, що призводить до лейкопенії.

Крім перерахованих вище факторів відомі інші продукти секреторної діяльності стафілококів, що здатні призводити до інактивації імунного захисту господаря; це обумовлює персистенцію стафілококів у клітинах і тканинах макроорганізму:

- антилізоцимна активність (АЛА) – здатність інактивувати лізоцим клітин і тканин;
- антиінтерферонова активність (АІА) – здатність пригнічувати антибактеріальну дію інтерферону;
- антикомплементарна активність (АКЛ) – специфічна інактивація системи комплементу;
- антикарнозинова активність (АКрА) – здатність інактивувати карнозин – регулятор регенераційних та імунних реакцій;
- антилактоферинова активність (АЛфА) – інактивація лактоферину – регулятора метаболізму заліза в організмі;
- антигемоглобінова активність (АНbА) – інактивація функції гемоглобіну зв'язувати кисень.

Чутливість до антимікробних препаратів. Терапію антимікробними засобами при стафілококових інфекціях доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів груп пеніцилінів, цефалоспоринів, карбапенемів, азтреонаму, тетрациклінів, аміноглікозидів, макролідів, фторхінолонів.

Лабораторна діагностика стафілококових інфекцій

Для бактеріологічної діагностики стафілококозів у лабораторію надсилають: проби молока з ураженої частини вим'я при маститах, гній з абсцесів, ексудат з ран, кров (при сепсисі), маткові виділення при ендометритах; зразки корму, харчової сировини тваринного та рослинного походження, води питної; змиви з поверхонь приміщень де утримується тварини, виготовляються корми для тварин, перероблюється та виготовляється харчова сировина.

Бактеріологічне дослідження зразків біологічного матеріалу від хворих та підозрілих на захворювання тварин здійснюють відповідно до схеми (таблиця 2.1).

Визначення каталазної активності дає змогу диференціювати *Staphylococcus spp.* від *Streptococcus spp.* та *Enterococcus spp.;* при цьому *Staphylococcus spp.* є каталаза-позитивними; *Streptococcus spp.* та *Enterococcus spp.* – каталаза-негативні, (слід пам'ятати, що *Micrococcus spp.* також каталаза-позитивні) (рис. 2.3). Фермент каталаза сприяє розщепленню перекису водню на воду та молекулярний кисень ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$).

Таблиця 2.1 Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на стафілококову інфекцію

<table>
<tr><th colspan="5">Тип біологічного матеріалу від тварин</th></tr>
<tr><th colspan="3">Гній, слиз, ексудат, тощо</th><th colspan="2">Кров (при сепсисі)</th></tr>
<tr><th>Етапи</th><th>Бактеріоскопічне дослідження:</th><th>Бактерілогічне дослідження:</th><th colspan="2">Бактерілогічне дослідження:</th></tr>
<tr><td>1 етап</td><td>• Виготовлення мазків, фарбування за Грамом;
• відповідь.</td><td>• Посів на ЖСА, Беард-Паркера агар;
• Характер колоній, наявність пігментації, ліцитиназної активності.</td><td colspan="2">• Посів на цукровий бульйон</td></tr>
<tr><td>2 етап</td><td rowspan="3">-</td><td>• Виготовлення мазків, фарбування за Грамом;</td><td colspan="2">• Посів на кров'яний агар
• Характер колоній: наявність або відсутність зони гемолізу.
• Пересів на скошений МПА.</td></tr>
<tr><td>3 етап</td><td colspan="3">Колонії мікроорганізмів (що виросли на ЖСА, Беард-Паркера агар) із зразків усіх типів досліджують:</td></tr>
<tr><td></td><td>Визначення ферментативних властивостей (здатність до ферментації глюкози і маніту). Посів на середовища Гіса з глюкозою і манітом, культивування в анаеробних умовах.</td><td>• Визначення каталазної активності.
• Визначення плазмокоагулюючої активності з плазмою кроля.</td><td>Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).</td></tr>
<tr><td colspan="5">ЗАКЛЮЧЕННЯ</td></tr>
</table>

Таблиця 2.2 Тести ідентифікації певних родів родини *Staphylococcaceae*

ТЕСТ	***Staphylococcus spp.***	***Streptococcus spp.***	***Micrococcus spp.***
Ріст за анаеробних умов	+	-	+
Утилізація вуглеводів	ферментація	окислення	ферментація
Каталазна активність	+	+	-
Оксидазна активність	-	+	-
Примітки: *«+» - позитивний результат;* *«-» - негативний результат.*			

Таблиця 2.3 Тести ідентифікації *Staphylococcus spp.* до виду

Вид стафілококів	**Утворення пігменту**	**Активність коагулази**	**Активність фосфатази**	**Активність орнітин-декарбоксилази**	**Розщеплення манітолу з утворенням**	**Розщеплення тригалози з утворенням кислоти**	**Продукція ацетону**	**Стійкість до новобіоцину**
S. aureus	+	+	+	-	+	+	+	-
S. epidermidis	-	-	+	-	-	-	(+)	-
S. saprophyticus	V	-	-	-	+	+	(+)	+
S. haemolyticus	V	-	-	-	(+)	+	(+)	-
S. hominis	V	-	-	-	+\-	-	+	-
S. capitis	-	-	-	-	+\-	-	+	-
S. warneri	V	-	-	-	(+)	+	+	-
S. simulans,	-	-	+\-	-	(+)	+	+\-	-
S. lugdunensis	V	-	-	+	-	+	+	-
S. cohnii	-	-	-	-	+	+	(+)	+
S. xylosus	V	-	(+)	-	+	+	(+)	+
S. intermedius	-	+	+	-	+\-	+	-	-
Примітки: «+» - позитивні більше 80% ізолятів; «-» - позитивні менше 20% ізолятів; «+\-» - позитивні 50-20 % ізолятів; «(+)» - позитивні 50-80% ізолятів; «V» - варіабельна реакція у різних штамів.								

Суть реакції: при контакті перекису водню з каталазою мікроорганізмів починається його розщеплення, що супроводжується вивільненням пухирців кисню. Реакція починається з перших секунд контакту.

Реакцію плазмокоагуляції ставлять у двох пробірках (рис. 2.4), що містять по 0,5 см^3 цитратної плазми крові кролів, розведеної фізіологічним розчином у співвідношенні 1:5 (Перед взяттям в роботу плазму кролячу цитратну суху в

ампулі (флаконі) розчинити в 1 $см^3$ стерильного 0,9 % розчину натрію хлориду. Приготування розведення 1:5: до вмісту ампули (флакону) 1,0 $см^3$ додати 4,0 $см^3$ стерильного 0,9% розчину натрію хлориду).

В першу пробірку з агаризованого поживного середовища вносять колонію досліджуваної культури *Staphylococcus spp.*, другу залишають контрольною.

Пробірки поміщають у термостат, температура інкубації 37°С.

Патогенні *Staphylococcus spp.* через 2–10 год коагулюють плазму (рис 2.4).



Рис. 2.3. Позитивна реакція на каталазу стафілококів
(*Джерело: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/staphylococcus-aureus-photos/s_aureus_tests.html)*

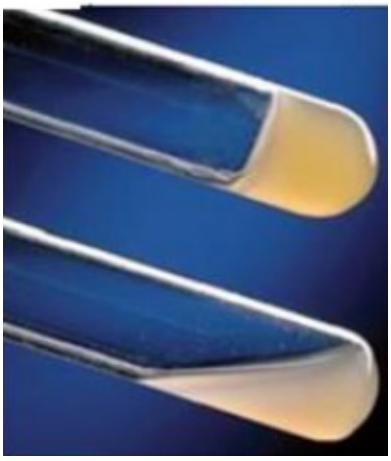


Рис. 2.4. Реакція плазмокоагуляції (верхня пробірка – позитивна реакція; нижня пробірка – контроль(негативна реакція)
(*Джерело: https://www.medical-labs.net/staphylococcus-coagulase-test-1137/)*

Якщо пробірки залишити в тер мостаті на більш тривалий час, то під дією фібринолітичного ферменту згусток плавиться.

Оксидазний тест використовується для визначення наявності цитохром-с-оксидази у бактерій. Цей фермент бере участь в електронному транспортному ланцюзі дихання. Для диференціації *Staphylococcus spp.* від *Micrococcus spp.* визначають оксидазну активність виділених культур. *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* оксидазонегативні; *Micrococcus spp.* – оксидазопозитивні (рис. 2.5).

Лабораторну діагностику стафілококозів здійснюють також за допомогою аналізаторів, що прискорюють термін дослідження, зокрема:

- автоматичний аналізатор VITEK® 2 compact для прискореної ідентифікації та визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків;
- MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) – метод мас-спектрометрії, що використовується для швидкої та точної ідентифікації мікроорганізмів, зокрема, стафілококів;
- ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) використовується для діагностики стафілококової інфекції, зокрема для виявлення ДНК стафілококів у біологічному матеріалі. Це високочутливий метод, який дозволяє швидко та точно визначити наявність збудника, навіть у невеликій кількості.

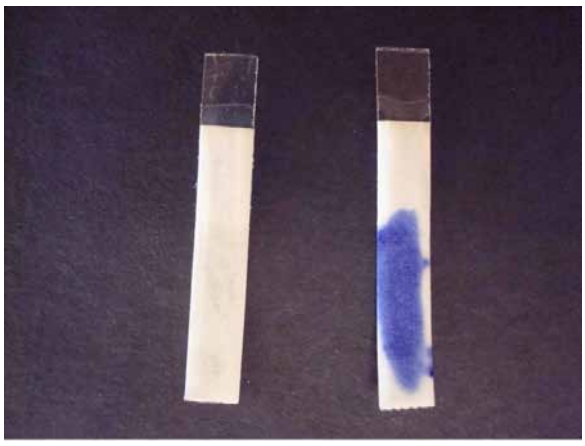


Рис. 2.5. Оксидазний тест. Визначення наявності цитохром-с-оксидази у бактерій. Безбарвна смужка – негативна реакція; смужка, забарвлена у синій колір – позитивна реакція.
(Джерело:https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_Laboratory_Manual_%28Hartline%29/01%3A_Labs/1.19%3A_Cytochrome_c_Oxidase)

Завдання для самостійної роботи студентів. *Ознайомитись з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника стафілококозу та з методами лабораторної діагностики стафілококозу.*

Питання для самоконтролю
1.Які види стафілококів є патогенними для тварин, людини?
2.Які фактори обумовлюють патогенність стафілококів
3.Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості стафілококів.
4.Як здійснювати бактеріологічну діагностику стафілококозів?
5.Які тести використовують для диференціації стафілококів?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА МИТУ КОНЕЙ (СТРЕПТОКОКОЗУ ПТИЦІ)

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника миту коней (стрептококозу птиці) та з методами лабораторної діагностики цих захворювань.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі, бактеріологічні петлі.*

Стрептококи - збудники стрептококозу (патогенні види), стрептококової септицемії птиці, миту коней. Стрептококоз – інфекційне захворювання тварин

багатьох видів усіх вікових груп. У молодняка найчастіше реєструють гострий і підгострий перебіги хвороби, які характеризуються загальним пригніченням, гарячкою, набряками, порушенням координації рухів, артритами, діареєю. У дорослих тварин частіше реєструють латентну інфекцію, причиною активізації якої є аборти, метрити, мастити. Збудник стрептококозу належить до роду *Streptococcus*, який налічує більше 20 видів бактерій, серед яких зустрічаються як патогенні, так і представники нормальної мікрофлори організму тварин і людини.

Мит – гостре інфекційне захворювання коней, переважно лошат, яке в типових випадках проявляється катарально-гнійним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів й ураженням регіонарних лімфатичних вузлів. Збудник *Streptococcus equi* – коки, що утворюють різні за довжиною ланцюжки і належать до серологічної групи С.

Стрептококоз птиці (стрептококова септицемія птиці, стрептококова хвороба курей) – інфекційне захворювання, супроводжується депресією, кон'юнктивітом, парезом, паралічем, артритом. Найбільш чутливі до хвороби кури, менше – голуби, качки, індики, гуси.

Збудники хвороби:

Enterococcus gallinarum (раніше *Streptococcus gallinarum*) – володіє природньою низькорівневою стійкістю до ванкоміцину.

Streptococcus zooepidermicus (стрептокок групи С за класифікацією Ланс-філда), *Enterococcus zymogenes* (раніше *Streptococcus zymogenes*) – морфологічно представлені короткими і довгими ланцюжками грампозитивних коків.

Відповідно до класифікації Брауна (1919) стрептококи розділені на 3 групи:

- β-гемолітичні – утворюють повний гемоліз на кров'яному агарі, типовий вид: *S. piogenes*, деякі види ентерококів;

- α-гемолітичні стрептококи – утворюють зону зеленячого гемолізу, типовий вид: *S. pneumoniae*;

- γ-негемолітичні стрептококи – не утворюють зони гемолізу на кров'яному агарі.

Типи стрептококів за гемолітичними властивостями:

• α-гемолітичні стрептококи (зеленячі стрептококи, *Streptococcus viridans*). Можуть стимулювати розвиток гнійних інфекцій, стоматологічних захворювань (карієс, періодонтит), інфекційних патологій серця (ендокардит). Різновидом типу є *Streptococcus pneumoniae* (пневмокок), який може стати причиною розвитку синуситу, отиту, менінгіту;

• β-гемолітичні стрептококи (групи A, B, C, D, F, G). Найпоширенішим є *Streptococcus pyogenes* групи А, що викликає захворювання органів дихальної системи (фарингіт, тонзиліт, скарлатину, ангіну), гострі патології серця, нирок, ревматичні захворювання (артрит, васкуліт), інфекції шкіри. Інші групи зустрічаються рідше (*Streptococcus equi*, *Streptococcus equimilis*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus Canis*, *Streptococcus dysgalactiae* (група G)), провокують фарингіт, ендокардит, септичний артрит, ангіну;

• γ-гемолітичні стрептококи. Можуть спричинювати менінгіт, ендокардит.

До окремої групи виділені *Enterococcus faecalis*, які раніше входили до групи D стрептококів. Ентерококи викликають інфекції сечовивідних шляхів, шлунково-кишкового тракту, ендокардит.

Морфологія і тинкторіальні властивості. *Streptococcus spp.* мають круглу або овальну форму, розміром 0,5–2,0 мкм; в мазках розташовуються у вигляді ланцюжків або парами. *Streptococcus spp.* грампозитивні, спор не утворюють, джгутиків не мають (нерухомі). Деякі стрептококи утворюють ніжну капсулу.

Культуральні властивості. За типом дихання – факультативні анаероби, окремі види з активним анаеробіозом. Оптимальна температура для їх культивування – 37 °С, оптимальна концентрація водневих іонів у середовищі культивування – pH 7,2–7,6.

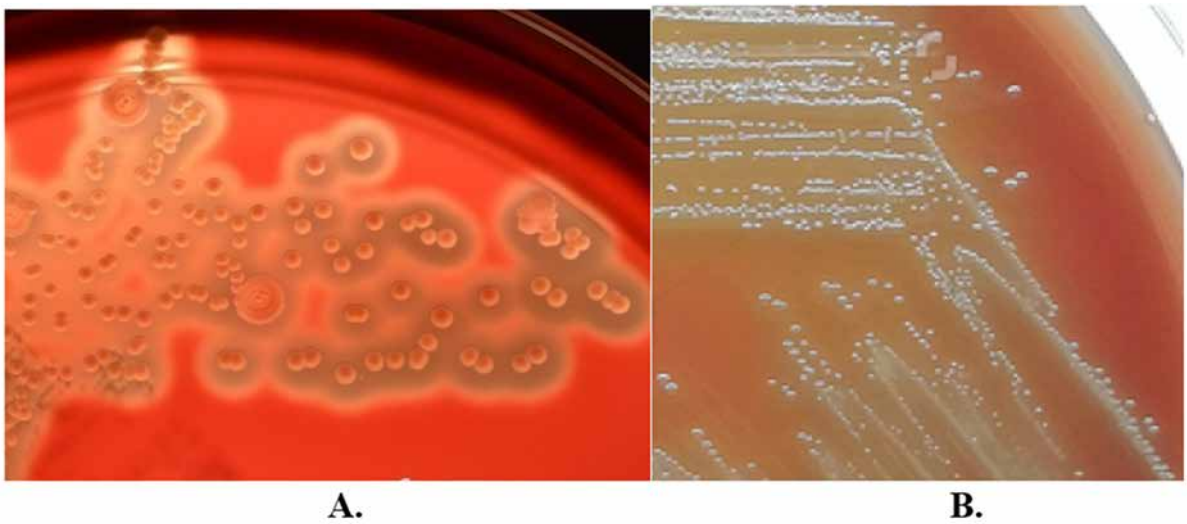


Рис. 2.6. А - β-гемолітична активність *S. pyogenes* на кров'яному агарі; В - α-гемолітична активність *S. pneumoniae* на кров'яному агарі

(Джерело: А -https://www.microbiologyinpictures.com/bacteriainphotos/s_pyogenes.html; В: https://www.shutterstock.com/ru/image-photo/alphahemolytic-streptococcus-pneumoniae-on-blood-agar-1917702536)

На загальновживаних поживних середовищах (МПБ, ПБ, МПА, ПА, та ін.) культивування утруднене. Культивують на поживних середовищах, збагачених кров'ю, сироваткою. На твердих середовищах утворюють дрібні колонії сіруватого кольору. За характером росту на кров'яному агарі *Streptococcus spp.* поділяють на три типи: β-гемолітичні, утворюють навколо колоній зони гемолізу; α-гемолітичні – навколо колоній непрозорі зеленуваті зони; γ-негемолітичні стрептококи (рис. 2.6).

Ферментативні властивості. Стрептококи розщеплюють глюкозу, лактозу, сахарозу, маніт (не завжди) і мальтозу з утворенням кислоти. Протеолітичні властивості у них слабо виражені. Вони згортають молоко, желатин не розріджують.

Чутливість до антимікробних препаратів. Терапію антимікробними засобами при інфекціях, викликаних *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до

антимікробних препаратів груп пеніцилінів, цефалоспоринів, карбапенемів, азтреонаму, тетрациклінів, аміноглікозидів, макролідів, фторхінолонів, лінезоліду.

Лабораторна діагностика стрептококових/ентерококових інфекцій

Для бактеріологічної діагностики ***миту коней*** у лабораторію надсилають: пунктати уражених лімфовузлів, гній з абсцесів, носові виділення, шматочки печінки, селезінки, легень, гній з абсцесів лімфатичних вузлів, кров із серця загиблих тварин.

Для бактеріологічної діагностики *стрептококозу птиці* у лабораторію надсилають: свіжі трупи або хвору птицю.

Бактеріологічне дослідження зразків біологічного матеріалу від хворих та підозрілих на стрептококоз птиці здійснюють відповідно до схеми (таблиця 2.4).

Таблиця 2.4. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на стрептококоз птиці

<table>
<tr><th colspan="4">Тип біологічного матеріалу від тварин</th></tr>
<tr><td colspan="2">Кров із серця, внутрішні органи, фібринозний ексудат черевної порожнини забитої хворої птиці.</td><td colspan="2">Мазки готують із крові серця, внутрішніх органів, фібринозного ексудату черевної порожнини забитої хворої птиці.</td></tr>
<tr><th>Етапи</th><th>Бактерілогічне дослідження</th><th colspan="2">Бактеріоскопічне дослідження</th></tr>
<tr><td>1 етап</td><td>Посів проби патологічного матеріалу на 0,5 % глюкозний МПА, сироватковий МПА, МПБ, кров’яний агар.</td><td colspan="2">Препарати фарбують за Романовським-Гімзою.
В позитивних випадках виявляють коки, розміщені парами ланцюжками, іноді – оточені капсулою.</td></tr>
<tr><td>2 етап</td><td>Посіви культивують в аеробних умовах; колонії мікроорганізмів дрібні, напівпрозорі, оточеними зоною β-гемолізу. На рідких середовищах R-форми стрептококів ближче до дна пробірки утворюють осад у вигляді пластівців. Бульйон залишається прозорим. S-варіанти стрептококів зумовлюють легке помутніння середовища з утворенням слизово-пластівцевого осаду.</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">3 етап</td><td colspan="3">Колонії мікроорганізмів, що виросли на агаризованих поживних середовищах із зразків усіх типів досліджують:</td></tr>
<tr><td>Визначення ферментативних властивостей (здатність до ферментації глюкози і маніту).</td><td>• Визначення каталазної активності.
• визначення наявності цитохром-с-оксидази</td><td>Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).</td></tr>
<tr><td colspan="4">ЗАКЛЮЧЕННЯ</td></tr>
</table>

Бактеріологічне дослідження зразків біологічного матеріалу від хворих та підозрілих на мит здійснюють відповідно до схеми (таблиця 2.5).

Таблиця 2.5. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на мит коней

<table>
<tr><th colspan="4">Тип біологічного матеріалу від тварин</th></tr>
<tr><td colspan="4">Пунктати уражених лімфовузлів, гній з абсцесів, носові виділення, шматочки печінки, селезінки, легень, гній з абсцесів лімфатичних вузлів, кров із серця загиблих тварин.</td></tr>
<tr><th>Етапи</th><th>Бактерілогічне дослідження</th><th colspan="2">Бактеріоскопічне дослідження</th></tr>
<tr><td>1 етап</td><td>Посіви на глюкозо-сироватковий МПБ; МПА; кров’яний МПА, збагачений глюкозою (1 %). Засіяні пробірки інкубують у термостаті за температури 36–37 °С 24 години.
Результат:
В МПБ – легке помутніння з невеликою кількістю пластівців (осад).
На МПА, кров’яному агарі утворюються росинчасті колонії до 1 мм у діаметрі, сірувато-білого кольору, слизисті, на кров’яному агарі оточені зоною β-гемолізу.</td><td colspan="2">Із патологічного матеріалу готують мазки, які фарбують за Грамом. Streptococcus equi грампозитивний, у мазках із гною утворює довгі ланцюжки, клітини мають не округлу, а дещо сплюснуту форму, й нагадують зерна сочевиці. У препаратах з крові і внутрішніх органів зустрічаються поодинокі, парні коки або їх коротенькі ланцюжки.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">2 етап</td><td colspan="3">Колонії мікроорганізмів, що виросли на агаризованих поживних середовищах із зразків усіх типів досліджують:</td></tr>
<tr><td>Культивують на середовищах із 40 % жовчі – Streptococcus equi не вегетує;
Не змінює колір молока з метиленовим синім;
Не ферментує лактозу, сорбіт і маніт; ферментує з утворенням кислоти без газу глюкозу й мальтозу.</td><td>• визначення каталазної активності.
• визначення наявності цитохром-с-оксидази</td><td>Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).</td></tr>
<tr><td colspan="4">ЗАКЛЮЧЕННЯ</td></tr>
</table>

Таблиця 2.6.Тести ідентифікації певних родів родини *Streptococcus spp.*

ТЕСТ	***Staphylococcus spp.***	***Streptococcus spp.***	***Micrococcus spp.***
Ріст за анаеробних умов	+	-	+
Утилізація вуглеводів	ферментація	окислення	ферментація
Каталазна активність	+	+	-
Оксидазна активність	-	+	-
Примітки: «+» - позитивний результат; «-» - негативний результат.			

Визначення *каталазної активності* дає можливість диференціювати *Staphylococcus spp.* від *Streptococcus spp.* та *Enterococcus spp., Staphylococcus spp.* каталаза-позитивні; *Streptococcus spp.* та *Enterococcus spp.* – каталаза-негативні, (слід пам'ятати, що *Micrococcus spp.* також каталаза-позитивні). Фермент каталаза сприяє розщепленню перекису водню на воду та молекулярний кисень ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$).

Суть реакції: при контакті перекису водню з каталазою мікроорганізмів починається його розщеплення, що супроводжується вивільненням пухирців кисню. Реакція починається з перших секунд контакту.

Оксидазний тест використовується для визначення наявності цитохром-с-оксидази у бактерій. Цей фермент бере участь в електронному транспортному ланцюзі дихання. Визначають оксидазну активність виділених культур. *Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Enterococcus spp.* оксидазонегативні; *Micrococcus spp.* – оксидазопозитивні.

Прискорену ідентифікацію *Streptococcus spp.* та *Enterococcus spp.* здійснюють за допомогою аналізаторів: VITEK® 2 compact (прискорена ідентифікації та визначення чутливості мікроорганізмів); методом мас-спектрометрії за допомогою приладів MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція).

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні і патогенні властивості збудника миту коней та стрептококозу птиці та методи лабораторної діагностики цих інфекцій.*

Питання для самоконтролю

1. *Які захворювання у тварин зумовлюють стрептококи?*
2. *Особливості бактеріологічної діагностики стрептококозів.*
3. *Як диференціюють різні види патогенних стрептококів?*
4. *Збудник миту та його морфологія. Бактеріологічна діагностика миту.*
5. *Збудники стрептококозу птиці та їх морфологія.*
6. *Бактеріологічна діагностика стрептококозу птиці.*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА САЛЬМОНЕЛЬОЗУ ТА КОЛІБАКТЕРІОЗУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудників сальмонельозу та колібактеріозу та з методами лабораторної діагностики сальмонельозів і колібактеріозів.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі, бактеріологічні петлі, поживні середовища МПА, МПБ, забуферна пептонна вода, селеніт-цистинове середовище, середовище Рапопорта-Василіадіса, середовище Кода, лаурилсульфітне середовище, середовище МакКонкі, вісмут-сульфітний агар, середовище Ендо агар, середовище XLD (ксілоза-лізин-дезоксихолат агар), середовище Сімонса, середовище TSI (трицукровий агар), середовища Гіса з лактозою, глюкозою, сахарозою, манітом, сироватки О- та Н-аглютинуючі для діагностики сальмонельозу в реакції аглютинації на склі.*

Сальмонельоз (лат. *salmonellosis*) – інфекційне зоонозне захворювання тварин, птахів та людей, яке спричинюють бактерії роду *Salmonella*, характеризується переважним ураженням травної системи з розвитком діареї, інтоксикації та зневоднення організму.

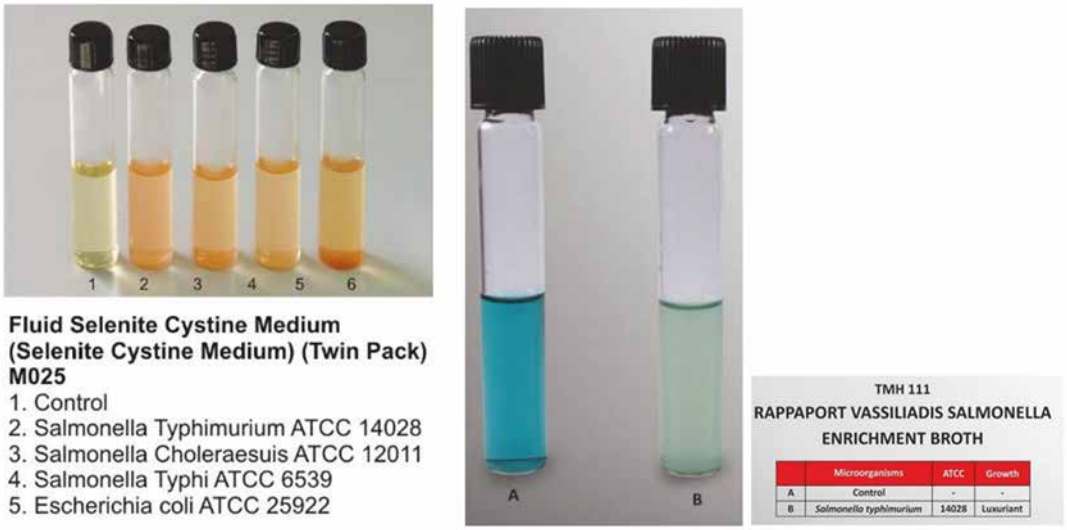
Salmonella spp. характеризуються вираженою поліпатогенністю – більшість відомих нині серотипів патогенні як для людини, так і для різних тварин та птиці. Деякі із сальмонел, «господар-адаптовані» серотипи, відзначаються здатністю викликати захворювання переважно у певних видів тварин: *S. dublin* – у великої рогатої худоби, *S. cholerae suis* – у свиней, *S. abortus ovis* – в овець, *S. abortus equi* – у коней, *S. gallinarum* – у курей. Заподіювані сальмонельозом економічні збитки визначаються втратами, пов'язаними з летальністю молодняку в межах 20 – 80 %, відставанням у рості та розвитку перехворілих тварин, а також матеріальними затратами на проведення тривалих оздоровчих заходів.

Salmonella spp. – рід бактерій родини *Enterobacteriaceae*. До роду *Salmonella spp.* входять 2 види: *S. bongori* та *S. enterica*. До виду *S. enterica* відносяться 6 підвидів: I – *enterica*, II – *salamae*, III a) – *arizonae*, III b) – *diarizonae*, IV – *houtenae*, VI –*indica*, VII, кожен з яких має багату кількість серотипів – збудників захворювань людини і тварин. Підвид *Salmonella enterica enteric* включає наступні серогрупи: A (найбільш відомий серотип *paratyphi* A); B (серотипи: *typhimurium*, *paratyphi* B та ін.); C (серотипи: *cholerae suis, infantis, virchow* та ін.); D (серотипи: *dublin, enteritidis, typhi* та ін.); E (найбільш відомий серотип *anatum*).

Морфологія. Грамнегативні, мають форму паличок розміром 2–4×0,5–0,8 мкм із заокругленими кінцями, спор та капсул не утворюють, мають джгутики, переважна більшість рухливі (перитрихи).

Культуральні властивості. Факультативні анаероби, здатні зброджувати глюкозу з утворенням молочної кислоти та інших кінцевих продуктів. Мезофіли, оптимальна температура культивування *in vitro* 35-37 °С, за

наявності домішку жовчі добре ростуть при температурі від 6 до 46 °С. Оптимальна pH 7,2–7,6. *S*-форми *Salmonella spp.* формують на МПА колонії *S*-форми (гладкі, напівпрозорі, випуклі, вологі), на МПБ – утворюють рівномірну каламуть середовища. *R*-форми *Salmonella spp.* на твердих середовищах ростуть у вигляді мутних або сухих колоній, мають нерівну поверхню та краї, в рідких середовищах утворюють значний осад, що не розбивається при струшуванні. *R*-форми не виявляються в РА. *Salmonella spp.* здатні формувати також слизові *M*-форми, колонії яких нагадують краплю слизу. У процесі дисоціації *Salmonella spp.* можуть переходити з *S*-форми у *R*-форми, інколи – через проміжні стадії утворення слизових колоній. *S*-*R*-дисоціація ускладнює бактеріологічну діагностику сальмонельозів.



А **Б**

Рис. 2.7. Ріст *Salmonella spp.* на селеніт-цистиновому середовищі (А); на середовищі Раппопорта-Васіліадіса (Б)

(Джерело: А: https://microbenotes.com/selenite-f-broth/; В: https://www.himedialabs.com/us/gmh1491-rappaport-vassiliadis-salmonella-enrichment-broth-granulated.html)



А **Б**

Рис. 2.8. Колонії *Salmonella spp. на* вісмут-сульфітному агарі (А); ріст Salmonella spp. на середовищі XLD agar (Б)

(Джерело: А: https://www.microbiol.it/en/p-134-bismuth-sulphite-agar.html; В: https://www.himedialabs.com/us/m031-xylose-lysine-deoxycholate-agar-xld-agar.html)

Ферментативні властивості. *Salmonella spp.* хемоорганотрофи; оксидазонегативні, каталазопозитивні, не утворюють ацетилметилкарбінолу (реакція Фогес-Проскаура негативна), реакція з метиловим червоним позитивна; засвоюють цитратні солі (ростуть на агарі Сімонса); не розріджують желатину, не утворюють індолу, утворюють сірководень і відновлюють нітрати у нітрити (більшість серологічних типів), ферментують з утворенням кислоти й газу глюкозу, маніт, мальтозу, галактозу, рафінозу, гліцерин. У процесі ферментації вуглеводів (насамперед, D-глюкози) та багатоатомних спиртів *Salmonella spp.* утворюють кислоту та газ.

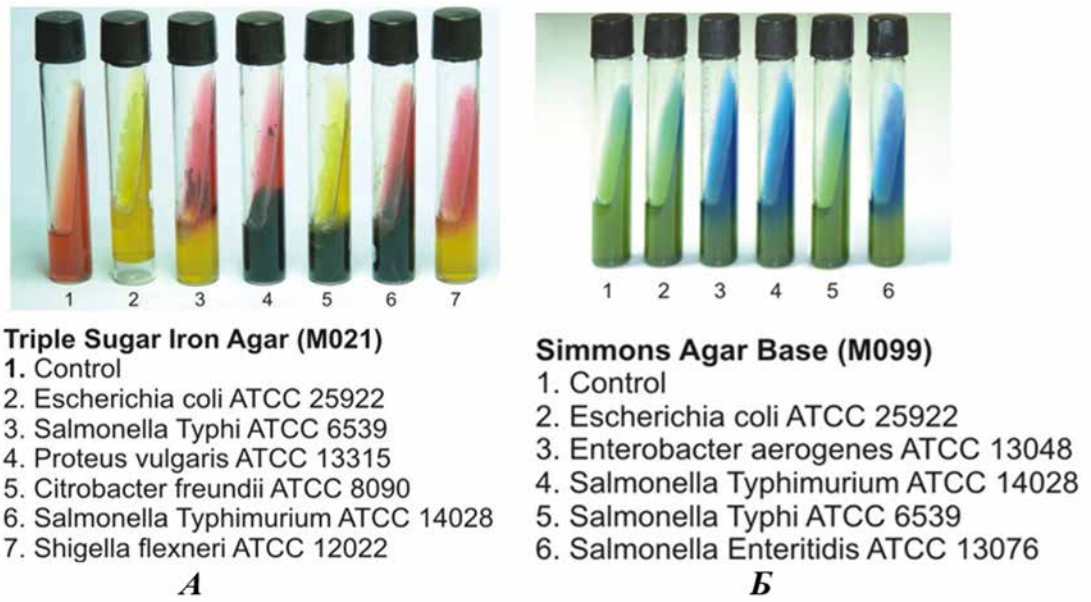


Рис. 2.9. Ріст *E. coli, Salmonella spp*. та інших ентеробактерій: середовище TSI agar (трицукровий агар) (А); середовище Simmons agar base (агар Сімонса) (Б)

(Джерело: А: https://microbenotes.com/triple-sugar-iron-agar-tsia-test/; В: https://www.labtestsguide.com/simmons-citrate-agar-faqs-and-mcqs)

На рисунку 2.9 (А) зображено результати культивування *E. coli, Salmonella spp*. та інших ентеробактерій на трицукровому агарі, призначеному для диференціації бактерій, зокрема, для ідентифікації ентеробактерій. Він містить три цукри: глюкозу, лактозу та сахарозу, а також сульфат заліза для виявлення сірководню.

На рисунку 2.9 (Б) зображено результати культивування ентеробактерій, зокрема *E. coli.* та *Salmonella spp*., на цитратному агарі Сімонса, призначеному для визначення грамнегативних бактерій на основі утилізації цитрату.

Антигенна структура. У *Salmonella spp.* виділено О-, Н- і К-антигени. Їх розпізнання лежить в основі антигенної системи Кауфмана-Уайта. Соматичний (О), джгутиковий (Н) та (Vi) антигени *Salmonella spp.* стимулюють в організмі вироблення О-, Н- та Vi-аглютинінів. Термостабільний О-антиген витримує кип’ятіння впродовж 2,5 год та автоклавування при 120 °С впродовж 30 хв. До хімічного складу соматичного О-антигену входить фосфоліпідополісахаридний комплекс із вмістом 60 % полісахаридів, 20–30 % ліпідів та

3,5–4,5 % гексозаміну. Специфічність цього антигену обумовлюється будовою бокових олігосахаридних ланцюгів молекули ліпополісахариду (ЛПС). Джгутиковий Н-антиген являє собою термолабільний протеїновий комплекс. Він складається з двох фаз: першої або специфічної фази, що аглютинується видовими специфічними сироватками, та другої або неспецифічної фази, що аглютинується не лише видовими, а й груповою сироватками. *Salmonella spp.*, що мають дві фази Н-антигену, називаються двофазними на відміну від монофазних, які мають тільки специфічний Н-антиген. Втрата джгутикового антигену може стосуватися як першої так і другої фаз або деяких компонентів обох фаз. Зважаючи на варіабельність антигенної структури *Salmonella spp.*, при серологічній ідентифікації бактерій даного роду до уваги приймають лише основні антигени (О, Н та Vi). Цей принцип покладено в основу антигенної схеми Кауфмана-Уайта. Також за допомогою сальмонельозних О-моноантигенів у сироватці крові людей або тварин можна виявляти специфічні антитіла, рівень яких вказує на наявність та стан інфекційного процесу у пацієнтів

Патогенність *Salmonella spp.* визначають фактори адгезії та колонізації, інвазії, здатність до токсиноутворення. *Salmonella spp.* продукують екзотоксини, зокрема, ентеротоксини (термолабільний і термостабільний), цитотоксин, мають особливу білкову систему, що запускає в ентероцитах так званий «III тип секреції». При руйнуванні сальмонели виділяють ендотоксин (ліпополісахаридний комплекс). *Salmonella spp.* здатні до внутрішньоклітинного паразитування.

Лабораторна діагностика сальмонельозу

Для бактеріологічної діагностики сальмонельозу у хворих тварин відбирають проби фекалій, кров, виділення з родових шляхів після аборту. Від загиблих тварин у лабораторію надсилають паренхіматозні органи (шматок печінки з жовчним міхуром, селезінку, нирку, трубчасту кістку, мезентеріальні лімфовузли, від телят - ще й легені). Іноді у лабораторію надходять цілі трупи тварин. При підозрі на хронічний перебіг хвороби від свиней відбирають сліпу кишку із вмістом. Для серологічної діагностики надсилають кров хворих тварин (ELISA-TEST). Роблять мазки-відбитки з різних органів і тканин, фарбують за Грамом. Схема бактеріологічного дослідження біологічного матеріалу від тварин при підозрі на сальмонельоз представлена у таблиці 2.7.

Ешерихіоз (колібактеріоз, коліентеротоксемія) – гостре інфекційне захворювання новонароджених тварин, супроводжуване профузним проносом, зневодненням організму, явищами септицемії й токсемії. Хвороба перебігає у трьох клінічних формах: септичній, коліентеротоксемічній та ентеритній. Прояв тієї чи іншої форми залежить від токсинів, продукованих збудником. Термолабільний ентеротоксин за характером дії нагадує холерну отруту. Такий же нейротоксин аналогічний дизентерійній отруті й зумовлює зміни, типові для набрякової хвороби поросят. Термостабільний ендотоксин сприяє виникненню судинного колапсу. Активне продукування збудником ешерихіозу токсинів викликає захворювання, яке називають колібактеріозним ентеротоксикозом.

Таблиця 2. 7. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на сальмонельоз

Тип біологічного матеріалу від тварин			
Біологічний матеріал від тварин		Мікроскопічне дослідження мазків з патологічного матеріалу	
Етапи	**Бактерілогічне дослідження**	**Бактеріоскопічне дослідження**	
1 етап	Варіант 1 – роблять висіви на агаризовані селективні та диференційно-діагностичні середовища для ентеробактерій (не менше 2 видів, вісмут-сульфітний агар – обов'язково). Варіант 2 – роблять висіви на селективні накопичувальні середовища (селеніт-цистеїнове, Рапопорта-Василіадіса), після інкубації пересівають на такі ж самі середовища які використовували для Варіанту 1.	Препарати фарбують за Грамом. В позитивних випадках виявляють грампозитивні паличкоподібні дрібні бактерії розміром 0,5–2×0,3–0,6 мкм із заокругленими кінцями.	
2 етап	Визначення: Оксидазної активності (-), Каталазної активності (+), реакція Фогеса-Проскауера (-), розрідження желатину (-), утворення індолу (-), утворення сірководню (+); відновлення нітратів у нітрити (+); ферментація з утворенням кислоти й газу глюкози, маніту, мальтози, галактози, рафінози, гліцерину (+).	-	
3 етап	Колонії мікроорганізмів, що утворили на агаризованих поживних середовищах характерні колонії з типовими для *Salmonella spp*. біохімічними властивостями досліджують в РА на склі з сироватками О- та Н-аглютинуючими, відповідно до інструкції виробника.		Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).
ЗАКЛЮЧЕННЯ			

Збудник – *Echerichia coli* – рід бактерій родини *Enterobacteriaceae.* Існує велика кількість типів *E. coli*, у тому числі понад 100 патогенних які об'єднані у чотири класи: ентеропатогенні, ентеротоксигенні, ентероінвазивні та ентерогеморагічні. Морфологічні відмінності між патогенними та непатогенними *E. coli* відсутні. *E. coli* у кишківнику людини з'являються у перші дні після народження і зберігаються впродовж життя на рівні 10^6–10^8 КУО/г вмісту товстої кишки. У фекаліях здорової людини *E. coli* (типові) виявляються у кількості 10^7–10^8 КУО/г, при цьому кількість лактозонегативних *E. coli* не повинна перевищувати 10^5 КУО/г, а гемолітичні *E. coli* у нормі мають бути відсутні. У 2011 році в Німеччині було зареєстровано понад 1000 випадків захворювань, викликаних *E. coli* STEC (Shiga toxin-producing). Випадки STEC були зареєстровані і в декількох інших державах ЄС. Джерелом захворювання є заражена їжа: сирі томати, свіжі огірки та салат.

Морфологія. Грамнегативні палички із заокругленими кінцями, розміром близько 0,4–0,8 × 1–3 мкм. Рухлива, не утворює спор. Окремі серотипи з підвищеною вірулентністю можуть утворювати капсулу. На агаризованих середовищах утворюють колонії S-форми, діаметром 2-4 мм. На середовищі Ендо лактозопозитивні *E. coli* утворюють темно-червоні колонії з металевим блиском (рис. 2.10).

Культуральні властивості. Факультативні анаероби, мезофіли, оптимальна температура інкубування *in vitro* 37-38 °С.

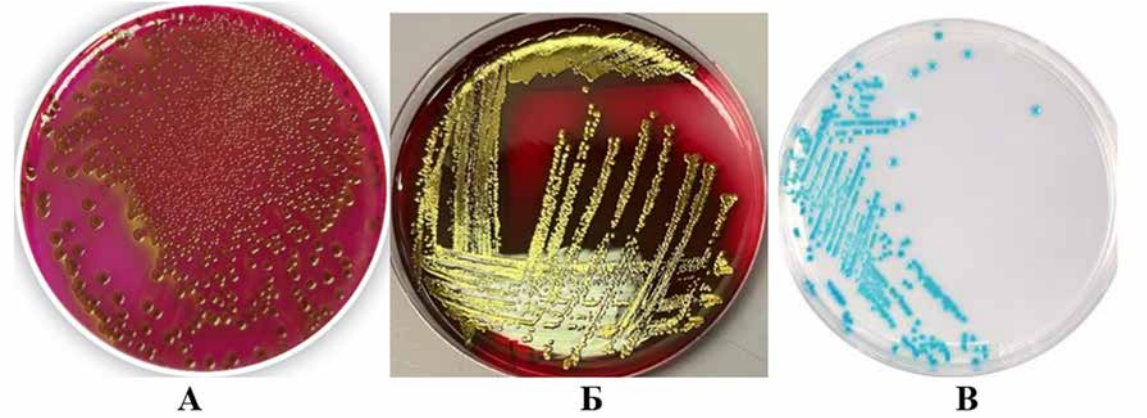


Рис. 2.10. Ріст *E. coli*: середовище Ендо агар (А, Б); середовище HiHrome *E. coli* agar (В)

(Джерело: А: https://www.carlroth.com/nl/en/media-for-coliforms-ecoli/endo-agar-%28base%29/p/x920.1;Б:https://www.reddit.com/r/microbiology/comments/17kziuw/contaminated_water_coliforms_ecoli_on_emb_and/; В: https://hardydiagnostics.com/g303)

Ферментативні властивості. *E. coli* ферментує з утворенням кислоти і газу глюкозу, лактозу, маніт, мальтозу, сахарозу та арабінозу; утворює індол, не виділяє або виділяє досить мало сірководню, молоко коагулює без пептонізації згустку казеїну, дає позитивну реакцію з метилротом і негативну за Фогес-Проскауером, не розщеплює сечовину, не утилізує нітрати, у зв'язку з чим не росте на середовищі Сімонса й не змінює його кольору.

Антигенна структура. У *E. coli* описані декілька груп антигенів: О, К (А, В, L, М), Н, f, α, β. Найбільш важливими антигенами для серологічної ідентифікації *E. coli* вважають О (соматичний антиген, термостабільний), Н-антиген (джгутиковий, термолабільний); К-антиген (поверхневий, пов'язаний з бактеріальною оболонкою (капсулою).

Основу антигенної класифікації ешерихій складає розділення їх за характером О-антигенів. У *E. coli* відомі понад 160 серологічих груп О-антигена, які позначені арабськими цифрами відповідно від 1 до 160 та більше. Ліпополісахаридний О-антиген повноцінний у S-форм бактерій; при дисоціації та переході в R-форму серологічна специфічність *E. coli* (як і у *Salmonells spp*.) втрачається. Антиген К (капсульний) об'єднує поверхневі антигени, що характеризуються як кислі полісахариди. Залежно від хіміо- та терморезистентності К-антигени позначають як А- В-, L- та М-антигени; на даний час відомо близько 100 К-антигенів. Джгутиковий Н-антиген білкової природи; 53 серологичні типи даного антигену позначають порядковими

номерами. Також *E. coli* мають поверхневі структури – фімбрії (pili). Деякі з них є чинниками колонізації, що обумовлюють адгезивність *E. coli*.

При складанні повної антигенної формули конкретного серотипу антигени відділяють двома крапками, вказуючи при цьому їх порядковий номер, наприклад O125:H6.

Патогенність *E. coli*. Вивчення природи патогенності *E. coli* дозволило розділити відомі штами, які спричинюють діарею, за механізмом патогенезу на декілька типів:

– ентеропатогенний тип (*EPEC*) включає сероваріанти: O26:H11, O55:H6/H7, O86:H34, O111:H2/H9, O114, O119:H2/H6, O125:H6, O127:H6/H40, O128:H2, O142:H6/H34 та викликає вогнищеву колонізацію кишківника;

– дифузно-агрегативний тип (*DAEC*): бактерії утворюють за допомогою фімбриального адгезину F1845 скупчення на великих ділянках кишківника, індукують подовження кишкових ворсинок, експресують α-гемолізин та цитотоксичний некротизуючий фактор 1;

– ентероагрегативний тип (*EAEC*) включає понад 90 серотипів, у тому числі O15:H18, O44:H18, O77:H18, O86:H2; O111:H12, O125:H9/H21, O126:H27, O128:H35. *E. coli* даного типу за допомогою фімбрій утворюють скупчення та біоплівку у пристінковому слизі кишківника, експресують ентеротоксин та ентероагрегативний термостабільний токсин EAST-1;

– ентеротоксигенний тип (*ETEC*): O128:H7/H8/H21/H27 колонізує кишківник за допомогою фімбрій та продукує термостабільні (*ST*) та/або термолабільні (*LT*) ентеротоксини.

Загальна кількість шигатоксинпродукуючих серотипів *E. coli* на початок XXI сторіччя перевищила 100. Однак, не всі штами *EHEC* патогенні для людини, їх часто виявляють у фекаліях клінічно здорових людей. Патогенність штамів обумовлюється не лише веротоксинами, а й іншими факторами вірулентності.

Основними факторами вірулентності EHEC є шигатоксини двох груп: Stx1 (*Stx*1c, *Stx*1d та ін.) та *Stx*2 (*Stx*2c, *Stx*2dac, *Stx*2e, *Stx*2f, *Stx*2g та ін.). Їх кодують інтегровані з хромосомою бактерії бактеріофаги. Stx1 повністю ідентичні або мають невеликі амінокислотні відмінності з токсином *S. dysenteriae* серотипу 1, але проявляють всього 60 % гомології з *Stx2*. Інші фактори вірулентності штамів EHEC вивчені не повністю.

Штами *E. coli* легко обмінюються кодуючими факторами вірулентності мобільними генетичними елементами (плазмідами, бактеріофагами та ін.) з іншими бактеріями, у першу чергу, ентеробактеріями. Ліпополісахариди захищають *E. coli* від опсонізуючої дії компліменту, а деякі з них проявляють специфічну активність. Ліпополісахарид групи O157 індукує агрегацію тромбоцитів. Термостабільний токсин *Sta* індукує втрату ентероцитами хлору та води, а *Stb* – атрофію та згладжування ворсинок кишківника, вивільнення бікарбонатів, простогландинів та серотоніну. Термолабільні токсини LT-I та LT-II відповідальні за виникнення осмотичної діареї. Лімфостатин – термолабільний токсин EPEC – інгібує проліферацію лімфоцитів, а також експресію інтерферонів та інтерлейкінів. Гемолізини (*Hly* A, B, C, D),

ентерогемолізини (*Ehly*) та цітолізин А лізують еритроцити та лейкоцити. Субтілазний цитотоксин (*Sub*AB), викликає мікротромбоз та некроз в головному мозку, нирках та печінки. Адгезини забезпечують прикріплення *E. coli* до клітин, а фактори системи секреції III дають можливість бактеріям проникати в ентероцити.

Для виявлення *Stx1* та *Stx2* в ізолятах *E. coli* застосовують імунологічні тести та методи молекулярної діагностики. Враховуючи те, що встановлено перехресну реактивність антигенів O157, O44 та O55 *E. coli* з антигенами *Salmonella spp., Proteus spp., Providencia spp., Hafnia spp., Enterobacter spp., Escherichia hermanii* та *Y. enterocolitica* на підставні імунологічних тестів остаточного діагнозу не роблять, а проводять скринінг ізолятів методом ПЛР. Інтерпретацію результатів досліджень на наявність *Stx1* та *Stx2 E. coli* проводять з обережністю, на підставі аналізу клінічних даних та результатів лабораторних досліджень, оскільки в *EHEC* проявляється нестабільність генів шигатоксинутворення.

Лабораторна діагностика ешерихіозу

Для бактеріологічної діагностики Ешерихіозу в лабораторію надсилають свіжий труп або відбирають від нього трубчасті кістки, селезінку, шматок печінки з жовчним міхуром, лімфатичні вузли брижі, головний мозок. Окремо надсилають перев'язану з двох кінців ділянку ураженого тонкого кишечнику. При діагностиці колібактеріозу птиці одночасно із свіжими трупами відправляють п'ять-шість живих хворих птахів, яких забивають у лабораторії з діагностичною метою й відбирають необхідний матеріал. Схема бактеріологічного дослідження біологічного матеріалу від тварин при підозрі на ешерихіоз представлена у таблиці 2.8.

Таблиця 2.8. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на ешерихіоз

Тип біологічного матеріалу від тварин		
Біологічний матеріал від тварин		Мікроскопічне дослідження мазків з патологічного матеріалу, забарвлених за Грамом
Етапи	**Бактерілогічне дослідження**	**Бактеріоскопічне дослідження**
1 етап	Варіант 1 – роблять висіви на агаризовані селективні та диференційно-діагностичні середовища для ентеробактерій (не менше 2 видів, середовище Ендо – обов'язково). Варіант 2 – роблять висіви на селективні накопичувальні середовища (МакКонкі, лаурилсульфітне, Кода), після інкубації пересівають на такі ж самі середовища які використовували для Варіанту 1.	Препарати фарбують за Грамом. Досліджують з використанням імерсійної системи мікроскопа. У позитивних випадках, за умови перебігу хвороби в септичній формі, виявляють характерні грамнегативні палички, які розміщуються по одній, іноді формують короткі ланцюжки і навіть нитки. Молоді клітини можуть забарвлюватись біполярно.

2 етап	Визначення: Оксидазної активності (-), Каталазної активності (+), реакція Фогес-Проскаура (-), розчеплення сечовини (-); утворення індолу (+), утворення сірководню (-); відновлення нітратів у нітрити (-); ферментація з утворенням кислоти й газу глюкози, лактози, маніту (+); не ферментують інозит і адоніт.	-
3 етап	Колонії мікроорганізмів, що утворили на агаризованих поживних середовищах характерні колонії з типовими для *E. coli* біохімічними властивостями досліджують в РА на склі з сироватками О-, Н-аглютинуючими, відповідно до інструкції виробника.	Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).
ЗАКЛЮЧЕННЯ		

Прискорену індикацію та ідентифікацію *Salmonella spp.* та *E. coli* здійснюють за допомогою автоматичного аналізатора VITEK® 2 compact (біохімічна ідентифікація та визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів), MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція, виявлення специфічних ділянок ДНК збудника).

Чутливість до антимікробних препаратів. Терапію антимікробними засобами при інфекціях, викликаних *Salmonella spp./E. coli* доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів з груп напівсинтетичних та інгібітор захищених пеніцилінів, цефалоспоринів, карбапенемів, азтреонаму, фторхінолонів, аміноглікозидів, тетрациклінів, колістину, фосфоміцину, нітрофурантоїну, нітроксоліну, триметоприму, триметоприм-сульфаметоксазолу.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні властивості збудників сальмонельозу та колібактеріозу та методи лабораторної діагностики цих інфекцій.*

Питання для самоконтролю

1. *Які захворювання у тварин зумовлюють Salmonella spp.?*
2. *Які культурально-морфологічні властивості Salmonella spp.?*
3. *Антигенна структура Salmonella spp.*
4. *Які особливості бактеріологічної діагностики сальмонельозу?*
5. *Які захворювання у тварин зумовлюють E. coli?*
6. *Культурально-морфологічні властивості E. Coli.*
7. *Фактори патогенності E. coli.*
8. *Особливості бактеріологічної діагностики ешерихіозу.*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА КИШКОВОГО ІЄРСИНІОЗУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника кишкового ієрсиніозу та з методами лабораторної діагностики кишкового ієрсиніозу тварин.*

Матеріали та обладнання. *Термостати для інкубації при різних температурах (22–25 °С і 37 °С), світлові мікроскопи, імерсійна олія, фарби для забарвлення за методом Грама, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі, бактеріологічні петлі, поживні середовища: ПК, CIN-агар, МакКонкі; API 20E стрипи, контейнери для знезараження відходів і використаних матеріалів.*

Кишковий ієрсиніоз (лат. *Yersiniosis intestinalis*) – широко розповсюджене інфекційне захворювання людини і тварин, що належить до зоонозів. У людей хвороба проявляється, лихоманкою, нудотою та блюванням, болями у животі, суглобах, висипами на шкірі, загальною інтоксикацією. У тварин (хворіють велика рогата худоба, вівці, кози, свині, кролі, собаки, коти та ін.) спостерігаються діарея, ознаки інтоксикації, інколи аборти у корів.

Основним резервуаром ієрсиніозної інфекції в природі є тварини, джерелами інфекції – дикі та домашні тварини-бактеріоносії, зокрема свині, олені, лисиці, гризуни (миші, пацюки), а також птахи. У людей, які перехворіли на кишковий ієрсиніоз, бактеріоносійство може тривати до трьох місяців, тому людину також можна вважати потенційним джерелом ієрсиніозної інфекції.

Факторами передачі збудника кишкового ієрсиніозу є контаміновані збудником харчові продукти (корми для тварин), об’єкти довкілля (вода, ґрунт) та побутові предмети тощо.

Зараження відбувається фекально-оральним шляхом, переважно при вживанні контамінованих продуктів людиною та контамінованих кормів тваринами.

Збудник кишкового ієрсиніозу – ***Yersinia enterocolitica*** згідно сучасної класифікації мікроорганізмів належить до роду *Yersinia* (порядок *Enterobacterales*, родина *Yersiniaceae*). *Y. enterocolitica* – паличка з заокругленими краями, розміром 0,5–0,8 мкм в ширину та 1–3 мкм у довжину, інколи кокоподібна. За мікроскопії мазків, отриманих з вирощеної на живильному середовищі культури, виявляється у вигляді поодиноких клітин, скупчень та зрідка коротких ланцюжків. Мікроорганізм рухливий. Рухливість залежить від температурних показників середовища його перебування. За температури в межах 18–28^{0}С рухливий (рухається за допомогою перитрихіальних джгутиків), за температури 37^{o}С і вищої – нерухливий (синтез джгутиків призупиняється).

Y. enterocolitica спор не утворює. Типові капсули також не виявляються. За певних обставин навколо клітин з’являється капсулоподібна субстанція («слизовий шар», «капсулоподібна оболонка»), яка забезпечує захист мікроорганізму від фагоцитозу та комплементу; сприяє формуванню біоплівки, яка захищає від шкідливих для мікроорганізмів факторів, зокрема антибіотиків.

Мікробіологу слід враховувати, що внаслідок такої «модифікації» клітин *Y. enterocolitica* можлива екранізація О-антигенів, що може впливати на достовірність результатів серотипування ізолятів збудника.

Y. enterocolitica добре фарбується аніліновими фарбами, грамнегативна (рис. 2.11). В мазках з культур, вирощених на рідкому середовищі, або ж зроблених з патологічного матеріалу, нерідко фарбується біполярно (інтенсивніше на полюсах клітини).

Yersinia enterocolitica надзвичайно розповсюджена у природі завдяки здатності як до сапрофітного (в умовах довкілля), так і паразитичного (в організмі людини і тварин) існування. Немало штамів *Y. enterocolitica* мають виразний патогенний потенціал, обумовлений, зокрема, здатністю до адгезії та інвазії, токсигенністю, наявністю механізмів захисту щодо факторів імунітету у теплокровних.

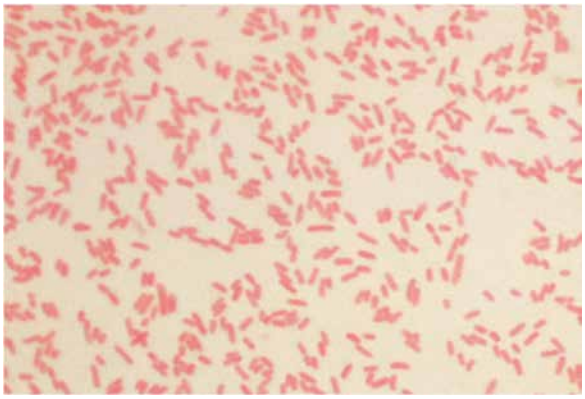


Рис. 2.11. *Y. enterocolitica* у мазку з бульйонної культури (пофарбовано за Грамом)
(Джерело:https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AYersinia_enterocolitica_gram.jpg?utm_source=chatgpt.com)

Лабораторна діагностика кишкового ієрсиніозу у тварин та виявлення *Yersinia enterocolitica* у харчових продуктах, кормах і різних об'єктах довкілля здійснюється за використання бактеріологічного, імунологічних та молекулярно-генетичних методів. Розроблені та використовуються як експресні так і методи ретроспективної діагностики.

Бактеріологічне дослідження. Базується на виділенні *Yersinia enterocolitica* з досліджуваного матеріалу, визначенні її серотипу та біотипу, вірулентності, чутливості до лікарських засобів.

Для прижиттєвої діагностики ієрсиніозу в лабораторію направляють матеріал від хворих тварин, яким не застосовували антибактерійні препарати: фекалії (2–3 г), відібрані безпосередньо з прямої кишки за допомогою катетера чи під час дефекації; молоко (10–15 мл), відібране з дотриманням правил асептики й антисептики. Паралельно надсилають проби крові для серологічного дослідження на предмет виявлення специфічних щодо *Yersinia enterocolitica* антитіл.

В разі посмертної діагностики в лабораторію направляють матеріал від тварин, що загинули чи були вимушено забиті. Трупи дрібних тварин (поросят, птахів та ін.) направляють не розтинаючи їх. Від крупних тварин надсилають серце, шматочки селезінки, легень, печінки (з жовчним міхуром), нирки, уражені ділянки, лімфатичні вузли області голови (підщелепні, заглоткові привушні, лімфатичні вузли брижі кишечника, портальні), зіскоби з поверхні кореня язика та глоткових мигдалин (або ж відповідні ділянки слизової оболонки).

Дослідження зразків проводять якомога швидше після надходження або зберігають їх при 4 °С (не більше 24 годин).

Схема проведення бактеріологічного дослідження включає, як правило, «холодове збагачення» досліджуваного матеріалу, виділення та селекцію *Y. enterocolitica* (на диференційно-діагностичному середовищі), отримання чистої культури та визначення серотипу, біотипу, вірулентності виділеного штаму та ін.

З метою «холодового збагачення» матеріал вносять у пептонно-калійове середовище (ПК), поміщають в холодильник (2–4°С) і періодично, на 2–3, 5–7 та, найпізніше, на 10 добу, здійснюють посів на селективні диференційно-діагностичні середовища (CIN-агар, МакКонкі чи ін.).

Проби фекалій, зішкріб зі слизової оболонки кишечника, кореня язика та мигдаликів, а також кров, головний і спинний мозок, жовч (0,2–0,3 мл) вносять у пробірки з 8–10 мл середовища ПК, суспендують і витримують у холодильнику для «холодового збагачення». Шматочки печінки, селезінки, нирок і лімфатичних вузлів (1–1,5 $см^3$) попередньо обробляють (етанол, обпалювання), після чого переносять у середовище ПК, суспендують і також витримують у холодильнику.

М'ясну сировину та продукти (25 г) подрібнюють, гомогенізують із 5–10 мл середовища ПК і переносять у 50 мл середовища; фарш, молоко, вершки, сметану та сир (по 25 г) без попередньої обробки одразу вносять у 50 мл середовища ПК, струшують і витримують у холодильнику. Овочі (коренеплоди) обробляють стерильними тампонами, подрібнюють, 25 г матеріалу переносять у 50 мл середовища ПК, струшують 3–5 хв і витримують у холодильнику для «холодового збагачення».

З метою прискорення результату матеріал можна висівати на диференційно-діагностичне середовище (МакКонкі, CIN-агар) одразу після надходження в лабораторію, однак цей метод менш ефективний, ніж після холодового збагачення. За потреби обидва методи застосовують паралельно.

Для пригнічення сторонньої мікрофлори перед висівом застосовують лужну обробку проб, що ґрунтується на відносній резистентності ієрсиній до лугів. Обробку проводять перед висівом із середовища ПК на щільні поживні середовища: у лунки планшетів або пробірки вносять по 0,2 мл свіжо-приготовленого 0,5% розчину КОН у 0,5% NaCl і 0,2 мл досліджуваного матеріалу (з надосаду), перемішують 5 секунд і висівають по 0,1 мл на агар МакКонкі і CIN-агар.

Посіви інкубують при 28 ±1°С протягом 24–48 годин.

Yersinia enterocolitica на CIN-агарі утворює круглі, опуклі колонії діаметром 1–2 мм із характерною яскраво-рожевою «вишневою серцевиною» (рис. 2.12). Селективність середовища забезпечується антибіотиками (цефсулодин, іргазан, новобіоцин), які пригнічують ріст більшості кишкових бактерій.

На середовищі МакКонкі колонії зазвичай безбарвні або блідо-рожеві, оскільки бактерія не ферментує лактозу; вони круглі, опуклі, блискучі.

На щільному живильному середовищі з бромтимоловим синім (СБТС) через 48 год виростають блакитно-зелені колонії діаметром 2–4 мм з фестончатим краєм і випуклим центром (рис.2. 13).

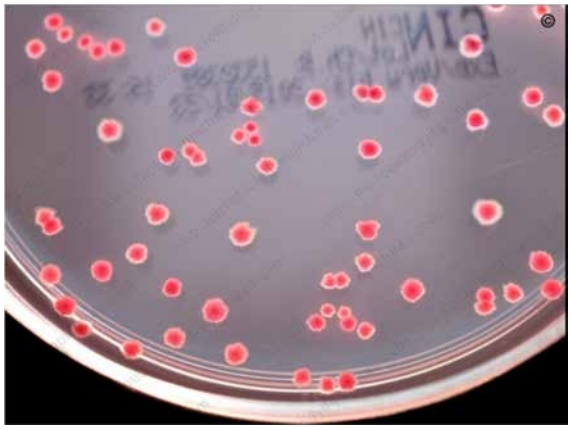


Рис. 2.12. Колонії *Y. enterocolitica* на CIN-агарі, культивування 24 години, 30°С

(Джерело: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/yersinia-enterocolitica-photos/yersinia-colonies-on-cin-agar.html)

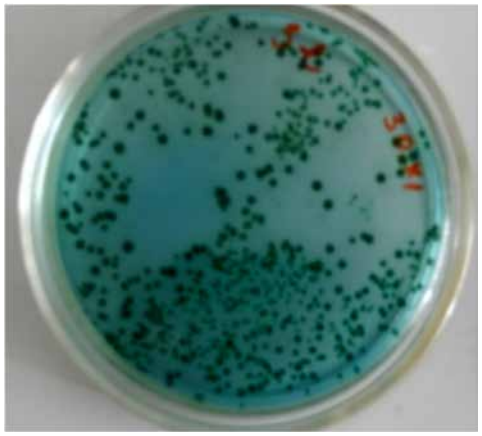


Рис. 2.13. Колонії *Y. enterocolitica* на агарі СБТС *(Козловська Г.В., 2015)*

В процесі ідентифікації визначають також рухливість штаму при різних температурах, оскільки *Yersinia* рухливі при 26–28 °С, але нерухливі при 37 °С. З цією метою використовують препарати «роздавлена» або «висяча крапля», а також тест на напівщільному агарі з ТТС (Triphenyl Tetrazolium Chloride).

Тест на визначення рухливості на напівщільному агарі з ТТС. Для визначення рухливості бактерій використовують напівщільний агар (0,4–0,5% агар) з додаванням ТТС (Triphenyl Tetrazolium Chloride). Безбарвний ТТС служить індикатором росту: рухливі бактерії редукують його у червоний формазан, що робить зону росту добре видимою.

Стерильною бактеріологічною петлею занурюють культуру *Y. enterocolitica* у середовище по центру пробірки, формуючи тонкий вертикальний штрих. Інкубують при 25 °С протягом 24–48 годин.

Оцінка результату: рухливі штами – утворюють розпливчасту червону зону навколо штриха занурення. Нерухливі штами – червоний формазан видно лише вздовж штриха, зона розповзання відсутня (рис. 2.14).



Рис. 2.14. Тест на рухливість на напівщільному агарі з ТТС (Triphenyl Tetrazolium Chloride). *Y. enterocolitica* рухливі при 25°С (2 ліві пробірки) та нерухомі при 35°С (права пробірка)

Остаточна ідентифікація *Y. enterocolitica* можлива за використання молекулярно-генетичних чи імунологічних методів, або ж шляхом вивчення ферментативних ознак виділеного штаму.

Ідентифікація за ферментативними властивостями. За ***ферментативними*** критеріями можна визначити вид і біотип ізолятів *Y. enterocolitica*. На відміну від більшості патогенних ентеробактерій, *Y. enterocolitica* проявляє уреазну активність, що дозволяє відрізнити її від сальмонел, шигел і *Escherichia*. Представників роду *Proteus*, які також розщеплюють сечовину, диференціюють за характерним ростом на щільних середовищах та здатністю утворювати індол. Ферментація ксилози, сорбіту, саліцину та утворення індолу дозволяють визначити біотип *Y. enterocolitica* (табл. 2.9).

Таблиця 2.9. Ферментативні властивості *Yersinia enterocolitica* різних біотипів

Показник / Біотип	**1A**	**1B**	**2**	**3**	**4**	**5**
Уреаза	+	+	+	+	+	+
Індол	+	+	+/-	–	–	–
Ферментація ксилози	+	+	+	+	–	V
Ферментація сорбіту	+	–	+	+	+	+
Ферментація саліцину	+	–	–	–	–	–
Ескулін	+/-	–	–	–	–	–
Ліпаза	+	+	–	–	–	–
β-D-глюкозидаза	+	–	–	–	–	–
Рухливість при 26–28 °C	+	+	+	+	+	+
Рухливість при 37 °C	–	–	–	–	–	–
Патогенність	Непатогенний	Високопатогенний	Помірна	Помірна	Помірна	Помірна

Примітки: "+" – позитивна реакція, "–" – негативна, "V" – варіабельна реакція.

Ідентифікація за допомогою специфічних сироваток. Серотипуванню підлягають культури, віднесені за морфологічними, культуральними та ферментативними властивостями до виду *Y. enterocolitica*. Її здійснюють шляхом постановки реакції аглютинації на склі, використовуючи діагностичні сироватки, специфічні щодо різних серотипів *Y. enterocolitica*. На сьогодні встановлено, що патогенні штами належать до таких серогруп: O:1,2a,3; O:2a,3; O:3; O:8; O:9; O:4,32; O:5,27; O:12,25; O:13a,13b; O:19; O:20; та O:21. Найчастіше захворювання у людей викликають *Y. enterocolitica* серогруп O:3, O:8, O:9 та O:5,27.

Ідентифікацію ієрсиній можна здійснити також іншим методами, зокрема молекулярно-генетичним (ПЛР), імунофлюоресцентним, за допомогою біосенсорів, імунохроматографії та ін.

Визначення вірулентності. Сучасна лабораторна практика поєднує ферментативні, серологічні та молекулярно-генетичні методи визначення

вірулентності ізолятів *Y. enterocolitica*, а в окремих випадках здійснює біологічні дослідження (зараження лабораторних тварин – мишей, щурів).

За постановки ПЛР здійснюють детекцію генів *virF*, *ail*, *yadA*, *inv* та *myfA*, наявність яких свідчить про потенційну патогенність штаму. Постановка ПЛР у реальному часі дозволяє не лише виявити названі гени, а й визначити їх кількість у зразку, що допомагає порівнювати вірулентність різних ізолятів. Секвенування та геномний аналіз дають можливість повністю охарактеризувати набір вірулентних факторів, включаючи плазміди та токсини, забезпечуючи високоточну оцінку потенційної патогенності штаму без використання біологічних моделей.

Постановку ПЛР здійснюють згідно з інструкцією виробника відповідного набору (тест-системи).

Серологічний метод дозволяє визначати наявність специфічних антитіл, їх титр та динаміку титру у крові хворої людини чи тварини, ретроспективно діагностувати кишковий ієрсиніоз.

Для ретроспективної діагностики ієрсиніозу відбирають проби крові (не менше 5-ти) від одних і тих самих тварин з інтервалом 2–3 тижні та надсилають на дослідження. Якщо в стаді хворіють тварини з різним перебігом хвороби, важливо відібрати проби у тих, що мають середню тяжкість перебігу захворювання.

Антитіла до збудника ієрсиніозу з'являються у крові (реєструються серологічними методами) вже на першому тижні прояву ознак захворювання Істотне підвищення їх титру відбувається на початку 3-го тижня. Цими показниками обґрунтовано терміни відбору та дослідження парних сироваток крові. Вміст антитіл у крові через 2 місяці помітно нижчий, а через півроку титр їх мінімальний.

У зв'язку з наявністю у *Yersinia enterocolitica* перехресно реагуючих антитіл з іншими ентеробактеріями, мінімальний діагностичний титр в реакції аглютинації (РА) становить 1:160. Достовірним вважається 2–4-кратне або вище зростання титру антитіл при дослідженні парних сироваток, що свідчить про сероконверсію або активну інфекцію.

Реакція аглютинації (РА)

Для постановки РА використовують стандартні ієрсиніозні антигени актуальних серотипів *Yersinia enterocolitica.* «Антигени» у даному випадку – суспензія інактивованих еталонних штамів *Yersinia enterocolitica* (S-форма) з концентрацією 10 млрд клітин/мл.

Перед використанням антигени розводять у співвідношенні 1:10, отримуючи робочу концентрацію 1 млрд клітин/мл. Реакцію виконують методом рівних об'ємів антигену та сироватки. Постановку та облік результатів здійснюють відповідно до інструкції з експлуатації набору.

В Україні розроблено «Набір компонентів для серологічної діагностики ієрсиніозів тварин» (розробник ННЦ «ЕКВМ»). До складу його входять:

- ієрсиніозні антигени сероварів О:3, О:6.30 та О:9;
- позитивні антиієрсиніозні сироватки сероварів О:3, О:6.30 та О:9;
- негативна сироватка.

Набір застосовують для серологічної діагностики кишкового ієрсиніозу тварин, а також для диференційної діагностики бруцельозу (у випадках виявлення бруцельозної серопозитивності у тварин із благополучних господарств).

Реакцію аглютинації проводять у пробірках або на плексигласових пластинах, використовуючи три антигени окремо для кожної досліджуваної сироватки. Сироватку розводять фізіологічним розчином (1:100 і 1:200), додають антиген у робочому розведенні, ретельно перемішують та витримують у термостаті при 37±1 °С протягом 18–20 годин, після чого – 3–5 годин – за кімнатної температури. Облік результатів здійснюють за наявністю аглютинату. Проби сироваток, які дали позитивну реакцію на 4 хрести, вважають позитивними і додатково розтитровують їх до розведень 1:800–1:1600.

Поряд з дослідами ставлять контролі:

- Контроль на специфічність: антиген кожного серовару з фізіологічним розчином натрію хлориду (0,85%), з негативною та гетерологічними позитивними ієрсиніозними сироватками у розведеннях 1:200 і 1:400;
- Контроль на активність: антиген кожного серовару з гомологічною позитивною сироваткою у розведеннях 1:200 і 1:400.

Імуноферментний аналіз (ІФА). Для постановки ІФА використовують тест-системи «Ієрсиніоз-ІФА-IgA», «Ієрсиніоз-ІФА-IgM», «Ієрсиніоз-ІФА-IgG», призначені для виявлення антитіл класів А, М і G до збудника кишкового ієрсиніозу у людини. Висока чутливість і специфічність методу досягається завдяки використанню в якості антигенів, сорбованих на поверхні стрипів кількох рекомбінантних білків зовнішньої мембрани ієрсиній. Постановку та облік реакції здійснюють відповідно до інструкції по застосуванню діагностикуму.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні властивості збудника кишкового ієрсиніозу та методи лабораторної діагностики інфекції.*

Питання для самоконтролю

1. *Які захворювання у тварин зумовлюють патогенні ієрсинії?*
2. *Яка морфологія властивості Yersinia enterocolitica?*
3. *Етапи бактеріологічного дослідження на кишковий ієрсиніоз.*
4. *Ідентифікація Yersinia enterocolitica. за допомогою специфічних сироваток.*
5. *Визначення вірулентності Yersinia enterocolitica.*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ЛІСТЕРІОЗУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника лістеріозу та з методами лабораторної діагностики лістеріозу у тварин.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі, бактеріологічні петлі. Як поживні середовища застосовують м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), триптон-соєвий бульйон (ТСБ), кров'яний агар, рідке середовище Фрейзера, а також селективні середовища Palcam agar* та *Oxford agar.*

Лістеріоз (лат. *Listeriosis*) являється зоонозним інфекційним захворюванням, що характеризується проявом різноманітних клінічних симптомів як у тварин, так і у людей (ураження центральної нервової системи, септичні прояви, аборти, мастити). У дорослих тварин хвороба перебігає в нервовій формі, відмічаються загальне пригнічення, відсутність апетиту, світлобоязнь, судороги, порушення зору, парези й паралічі. У ягнят відмічають лихоманку, пригнічення, проноси тощо; у великої рогатої худоби – підвищення температури тіла, відсутність апетиту, зниження молочної продуктивності, судороги. У свиней хвороба може перебігати у септичній або нервовій формі. У всіх видів тварин реєструють аборти та мастити.

Збудник лістеріозу належить до роду *Listeria*, родини *Listeriaceae* та включає 16 видів, серед яких встановлено етіологічну роль у виникненні лістеріозу у *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. seeligeri, L. welshimeri, L. innocua.*

Listeria spp. – широко поширені у довкіллі. Психрофіли, здатні компенсувати невелику ефективність рибосом за низьких температур додатковим їх синтезом.

Найбільш актуальним видом в етіології лістеріозу є *L. monocytogenes,* до специфічних факторів патогенності якого належить лістеріолізин О-гемолізин, який має виражену токсичну дію. Однак відомо, що при певних умовах активність продукції лістеріолізину О знижується, що призводить до ускладнення мікробіологічної діагностики лістеріозу. Здатність продукувати гемолізин мають також *L. ivanovii* та *L. Seeligeri*.

Антигенна структура *Listeria spp* складна, всього виділено 16 серотипів (*L. monocytogenes*: 7, 1/2a, l/2b, 1/2c, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e; *L. ivanovii*: 5; *L. Innocua*: *6a*, *6b*) (табл. 1.1). *L. monocytogenes* серотипів 4b, 1/2b, 1/2a викликають 90 % усіх випадків лістеріозу людини; у США переважна більшість *L. monocytogenes,* що виділяються, відноситься до серотипів 4a, 4b, 4ab, 4c, в Європі – до серотипів 1/2a, 1/2b, 1/2c.

Механізм внутрішньоклітинного паразитизму *Listeria spp*. включає в себе наступні фактори: взаємодію *Listeria spp*. із специфічними рецепторами еукаріотичної клітини; активну індукцію фагоцитозу, у результаті якого бактерія потрапляє в первинну фагосому; лізис первинної вакуолі; ділення у

цитоплазмі клітини; полімеризацію актину з утворенням «актинового» хвоста для пересування бактерій цитоплазмою; проникнення у сусідню клітину шляхом продавлювання мембрани; лізис вторинної вакуолі; новий цикл ділення у сусідній клітині.

Фактори патогенності *Listeria monocytogenes:*

Лістеріолізин О – тіолзалежний гемолізин – провідний фактор патогенності *Listeria spp.* Здатність продукувати гемолізин мають *L. monocytogenes, L. ivanovii* та *L. seeligeri.*

Фосфатидилінозитол – специфічна фосфоліпаза С (*plc*A, *PI-PLC*); приймає участь у лізисі мембрани первинної вакуолі разом з лістеріолізином О.

Фосфатидилхолін – специфічна фосфоліпаза С (*plc*B, *PC-PLC*), лецитиназа; є одним із важливих факторів патогенності *L. monocytogenes* необхідним для виживання та розмноження збудника в інфекційному процесі; приймає участь у лізисі вторинної вакуолі.

L. ivanovii та *L. seeligeri* також мають ген, що кодує лецитиназу.

Металопротеаза (*mpl*) – поліпептид, що сприяє зміні неактивної форми лецитинази в активну.

Інтерналіни А та В (*inl*A та *inl*B) – поверхневі білки, приймають участь в інвазії епітеліальних клітин.

На етапі інвазії важливу роль відіграє позаклітинний білок муреїнгідролаза (*P*60), що виявляється у всіх видів бактерій роду *Listeria* та необхідний для їх клітинного ділення.

*Act*A – поверхневий білок, індукує полімеризацію актину, що забезпечує активний рух збудника цитоплазмою клітин.

Морфологія. *Listeria spp.* − грампозитивні паличкоподібні дрібні бактерії розміром 0,5–2×0,3–0,6 мкм із заокругленими кінцями, спор та капсул не утворюють, мають джгутики, рухомі.

Культуральні властивості. Факультативні анаероби, оптимум pH 7,2–7,4. Факультативні психрофіти - ростуть у температурному діапазоні 1–45 °С, за низьких температур (6–8 °С) здатні посилювати свої патогенні властивості; температурний оптимум культивування *in vitro Listeria spp.* у межах 30–37 °С. Здатні розмножуватися за високої концентрації кухонної солі (до 10 %). Здатні до внутрішньоклітинного паразитування. *Listeria spp.* властива мінливість: температура культивування нижче оптимальної сприяє зміні форм клітин, у процесі пасажування *in vitro* на твердих середовищах культури *S*-форм переходять в *R*-форму; під впливом несприятливих факторів утворюють *L*-форми.

В рідкому середовищі (МПБ, ТСБ) впродовж 24 годин *Listeria spp.* утворюють ріст у вигляді рівномірного помутніння з наявністю невеликої кількості біолого аморфного осаду на дні пробірки, якій легко розбивається при струшуванні.

На середовищах Oxford agar (рис. 2.15), Palcam agar (рис. 2.16) утворюють дрібні колонії *S*-форми, сіро-чорного кольору, з почорнінням середовища в зоні росту колоній. На 48 годину культивування у центрі колоній утворюється заглиблення, а сама колонія набуває вигляду ґудзика.

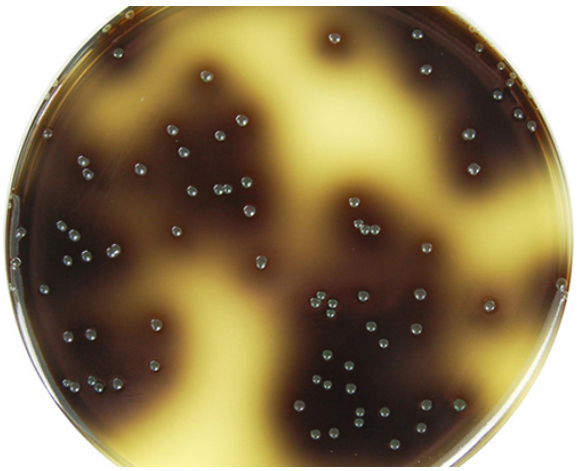


Рис. 2.15. Ріст *L. monocytogenes*, середовище Oxsford agar
(Джерело: https://eolabs.com/product/pp0630-listeria-oxford-agar/)

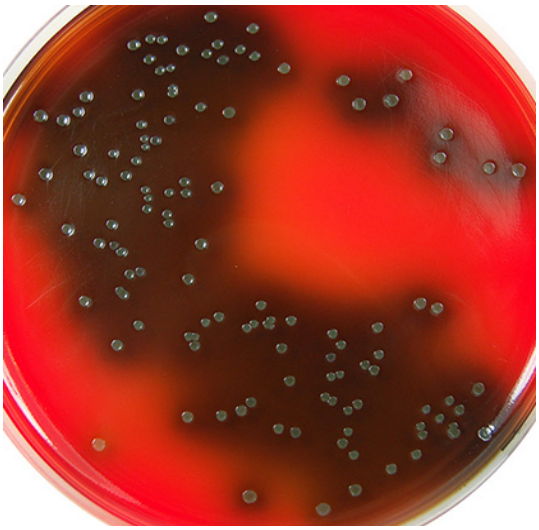


Рис. 2.16. Ріст *L. monocytogenes*, середовище Palcam agar
(Джерело: https://eolabs.com/product/pp0005-palcam-agar/)

За характером росту на кров'яному агарі поділяють на β-гемолітичні (*L. monocytogenes, L. ivanovii* та *L. seeligeri*) - утворюють навколо колоній зони β-гемолізу; γ - негемолітичні (рис. 2.17).



Рис. 2.17. Ріст *L. monocytogenes*, середовище Columbia Blood Agar
(Джерело: https://www.vetbact.org/popup/image.php?imgtable=vetbact_images&imgid=185)

Ферментативні властивості. *Listeria spp.* каталазопозитивні, оксидазонегативні; ферментують цукри з утворенням кислоти без газу (глюкозу, мальтозу та ін.); гідролізують ескулін; не ферментують дульцит, інулін, рафінозу, трегалозу, левулезу; не гідролізують желатин, казеїн, молоко; не редукують нітрати (за виключенням *L. murrayi*); не утворюють індол, сірководень; не володіють уреазною активністю; здатні рости на МПБ в присутності до 10 % NaCl; *L. seeligeri, L. ivanovii, L. welshimeri* на відміну від *L. monocytogenes* та *L. innocua* ферментують ксилозу. *L. monocytogenes* ферментує глюкозу, мальтозу, рамнозу, лактозу, сорбіт, дульцит, інозит, не ферментує ксилозу. *L. ivanovii* ферментують глюкозу, лактозу, мальтозу, ксилозу, цукрозу.

Для внутрішньовидової диференціації здійснюють постановку CAMP-test на кров'яному агарі (*Columbia Blood Agar*) з використанням тест-культур *Staphylococcus aureus* та *Rhodococcus equi*. Для проведення CAMP-test 24–48-годинні агарові культури гемолітичного штаму *S. aureus* та *R. equi* засівають на кров'яний агар двома паралельними штрихами на відстані 5,0–5,5 см. Між штрихами *S. aureus* та *R. equi* засівають паралельними штрихами на відстані один від одного не менше 1 см досліджувані штами лістерій із щільного середовища (МПА, ТСЕДА (триптон-соєвий екстракт-дріжджовий агар) (відстань між штамами лістерій та вертикальними штрихами *S. aureus* та *R. equi* має складати 2–3 мм). Посіви інкубують 24–48 годин за температури (37±1) ˚С. Визначають наявність або відсутність зон β-гемолізу та розширення зон гемолізу біля вертикальних штрихів росту *Staphylococcus aureus* та *Rhodococcus equi* (рис. 2.18).

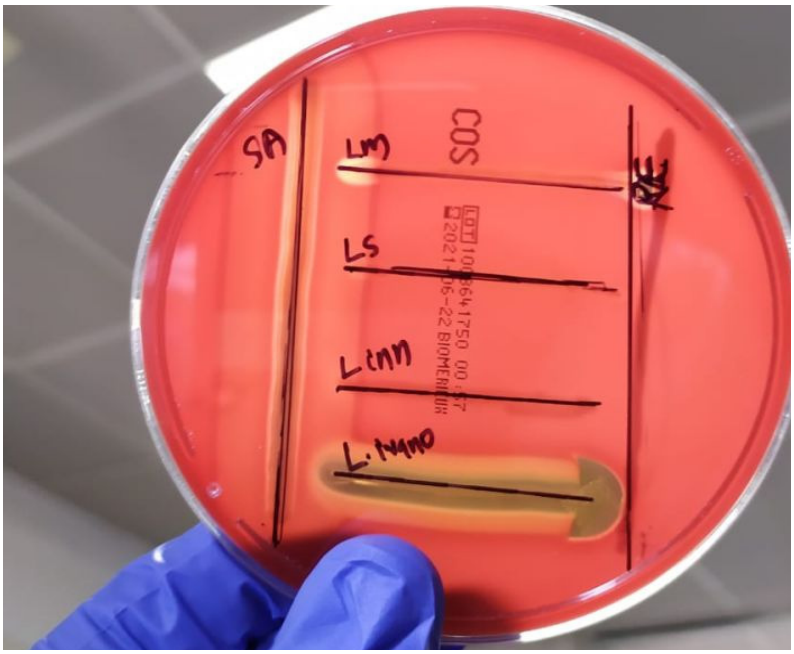


Рис. 2.18. Результати постановки CAMP-test: *Lm - L. monocytogenes, Ls - L. seeligeri, L inn - L. innocua, L. ivano -L. ivanovii, SA - S. aureus, RE - R. equi*

(*Джерело: https://www.linkedin.com/posts/sebinsha-n-s-73733a194_camp-test-listeria-activity-6811207879698210816-acCK/*)

В CAMP-test культури *L. monocytogenes,* що володіють гемолітичною активністю, позитивно реагують шляхом розширення зони гемолізу біля *S. aureus* (можлива позитивна реакція і біля *R. equi)*; *L. ivanovii* -– в разі позитивної реакції утворюють широку зону гемолізу у вигляді «лопатки» біля *R. equi*. Культури *L. seeligeri* повинні утворити позитивну реакцію біля штриха *S. aureus*, (утворюють невелике розширення зони гемолізу біля штриха, що візуально проявляється через 48 годин культивування). Культури *L. innocua, L. grayi/L. murrayi* та інших гемолітично не активних видів зон гемолізу не утворюють (рис. 2.14).

Таблиця 2.10. Внутрішньородова диференціація *Listeria spp.* в CAMP-test

Вид *Listeria spp.*	***Staphylococcus aureus***	***Rhodococcus equi (R)***
Listeria monocytogenes	+	-[1]
Listeria ivanovii	-	+
Listeria innocua	-	-
Listeria seeligeri	+[2]	-

Примітка:
«+» - наявність зони β-гемолізу;
«-» - відсутність зони β-гемолізу;
«1» - деякі штами можуть давати R+;
«2» - L. seeligeri проявляє гемолітичну активність як правило на 48 годину культивування.

Лецитиназну активність (володіють *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. seeligeri*). виявляють на поживному агарі с додаванням жовтка курячого яйця й у присутності активованого вугілля.

Каталазну активність − виявляють по утворенню газу при суспендуванні ізольованих колоній в 3% розчині перекисі водню на предметному скельці. *Listeria spp.* каталазопозитивні.

Чутливість до антимікробних препаратів: терапію антимікробними засобами при інфекціях, викликаних *Listeria spp.* доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів, зокрема бензилпеніциліну, ампіциліну, меропенему, моксіфлоксацину, лінезоліду, еритроміцину, триметоприм-сульфаметоксазолу.

Лабораторна діагностика лістеріозу

Для бактеріологічної діагностики лістеріозу у лабораторію надсилають трупи дрібних тварин, паренхіматозні органи (печінку, селезінку, нирки, уражені ділянки легень), оболонки плода, виділення з родових шляхів, молоко з ураженої частки вим’я. Для серологічної діагностики надсилають кров хворих тварин. Роблять мазки-відбитки з різних органів і тканин, у т. ч. з мозку. Фарбують за Грамом. Схема мікробіологічного дослідження біологічного матеріалу від тварин представлена у таблиці 2.11 та на рисунку 2.19; у таблиці 2.12 наведені диференційні ознаки *Listeria spp.* певних видів.

Таблиця 2.11. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на лістеріоз

<table>
<tr><th colspan="4">Тип біологічного матеріалу від тварин</th></tr>
<tr><td colspan="2">паренхіматозні органи, оболонки плода, виділення з родових шляхів, молоко з ураженої частки вим’я. При дослідженні абортованих плодів посіви роблять з вмісту шлунку та внутрішніх органів.</td><td colspan="2">Готують мазки-відбитки з різних органів і тканин.</td></tr>
<tr><th>Етапи</th><th>Бактерілогічне дослідження:</th><th colspan="2">Бактеріоскопічне дослідження:</th></tr>
<tr><td>1 етап</td><td>Мазки із зіву, статевих шляхів, виділення із очей) висівають на селективні (бульйон Фрейзера половинний та повний) та збагачені (ТСБ) середовища.
Кров, ліквор, амніотичну рідину – висівають на кров’яний, шоколадний агар та на глюкозо-печінковий або глюкозо-гліцериновий бульйон з подальшим пересівом на Columbia Blood Agar.</td><td colspan="2">Препарати фарбують за Грамом.
В позитивних випадках виявляють грампозитивні паличкоподібні дрібні бактерії розміром 0,5–2×0,3–0,6 мкм із заокругленими кінцями.</td></tr>
<tr><td>2 етап</td><td>Пересів культур з рідких середовищ на диференційно-діагностичні середовища для ідентифікації Listeria spp. (Oxford agar, Palcam agar, та ін.). інкубація – 24-48 годин при 37 ^{0}C.</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">3 етап</td><td colspan="3">Колонії мікроорганізмів, що виросли на агаризованих поживних середовищах із зразків усіх типів досліджують:</td></tr>
<tr><td>Гідроліз ескуліну;
Каталазна активність;
Рухливість;
Ферментація цукрів;
Лецитиназна активність.</td><td>b -гемолітична активність;
Camp-test (з S. aureus та R. equi)</td><td>Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).</td></tr>
<tr><td colspan="4">ЗАКЛЮЧЕННЯ</td></tr>
</table>

Ідентифікацію *Listeria spp.* здійснюють також за допомогою аналізаторів, що прискорюють термін дослідження, зокрема:

- автоматичний аналізатор VITEK® 2 compact;
- MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) - метод мас-спектрометрії;
- ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція).

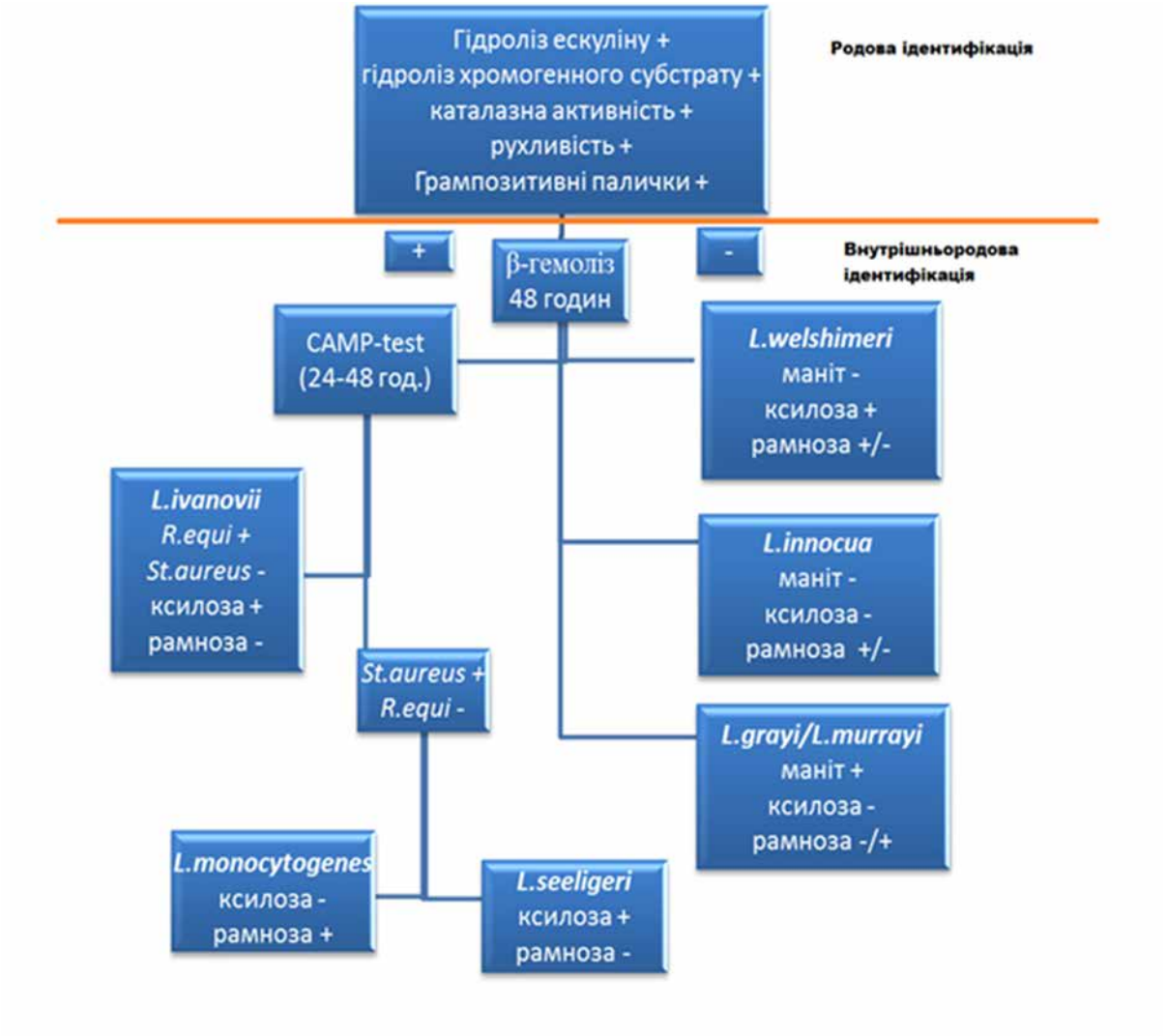


Рис. 2.19. Схема ідентифікації бактерій роду *Listeria* та їх видів

Таблиця 2.12. Диференціація бактерій роду *Listeria*

Диференційні ознаки	***L. monocytogenes***	***L. ivanovii***	***L. seeligeri***	***L. welshimeri***	***L. innocua***	***L. grayi, (L. murrayi)***
β-гемоліз	+	+	+	-	-	-
Camp-test:		-				
Staphylococcus aureus	+	-	+	-	-	-
Rhodococcus equi	±	+	-	-	-	-
Утворення кислоти з:						
манітолу	-	-	-	-	-	+
α-метил-D-манозиди	+	-	-	+	+	+
α-метил-D-глюкозиди	+	+	+	+	+	+
L-рамнози	+	-	-	±	±	- (+)
D-ксилози	-	+	+	+	-	-

Відновлення нітратів	-	-	-	-	-	- (+)
Лецитиназна активність	+	+	±	-	-	-
Патогенність для мишей	+	+	±	-	-	-
Патогенність для людини	висока	низька	низька	відсутня	відсутня	відсутня
Примітка: *«+» - позитивна реакція,* *«-» - негативна реакція,* *«±» - варіабельна реакція штаму.*						

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні і патогенні властивості збудника лістеріозу тварин та методи лабораторної діагностики лістеріозу (маніпулюючи з Listeria grayi).*

Питання для самоконтролю

1. *Які захворювання у тварин зумовлюють Listeria spp.?*
2. *Культурально-морфологічні властивості лістерій.*
3. *Які види лістерій володіють патогенним потенціалом?*
4. *Фактори патогенності лістерій.*
5. *Особливості бактеріологічної діагностики лістеріозу.*
6. *Як диференціюють різні види патогенних Listeria spp.?*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БЕШИХИ СВИНЕЙ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника Erysipelothrix rhusiopathiae та з методами лабораторної діагностики бешихи свиней.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі, бактеріологічні петлі; м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), кров'яний агар (Columbia Blood Agar), трицукровий агар, а також середовища Гіса з різними цукрами для визначення ферментативних властивостей культури.*

Бешиха свиней (лат. *Erysipelas suum*) – зоонозна інфекційна хвороба; за гострого перебігу проявляється у формі септицемії та загальної еритеми шкіри; за хронічного перебігу характеризується ендокардитом та артритами. Збудник бешихи свиней – *Erysipelothrix rhusiopathiae.* У людини дане захворювання

проявляється як еризипелоїд у різних формах – від легкого дерматиту до септицемії.

Характеристика збудника. Збудником бешихи свиней є *Erysipelothrix rhusiopathiae* – бактерії з домену *Bacteria*, царства *Bacillati*, типу *Bacillota*, класу *Erysipelotrichia*, порядку *Erysipelotrichales*, родини *Erysipelotrichaceae*, роду *Erysipelothrix*.

Вперше виділив *Erysipelothrix rhusiopathiae* Роберт Кох у 1876 році. У 1882 році Фрідріх Леффлер виділив подібного збудника, що був причиною хвороби у свиней. в 1884 році подібний мікроорганізм вперше був встановлений як патоген для людини. Рід *Erysipelothrix* отримав свою назву у 1909 році; назву *Erysipelothrix rhusiopathiae* збуднику надано у 1918 році, у 1920 році його було визначено як типовий вид роду.

Морфологія. Короткі палички (завдовжки 0,9–1,5 мкм, завширшки 0,1–0,3 мкм), нерухомі. Спор і капсул не утворюють. В мазках можна спостерігати окремі або попарно чи у вигляді латинської літери «V» розташовані бактеріальні клітини, також у вигляді коротких ланцюжків.

Тинкторіальні властивості: грампозитивні, не рухливі, не утворюють спор та капсул. Визначають рухливість у препаратах «висяча» чи «роздавлена» краплі. Досліджують 20–24-годинну бульйонну культуру, вирощену за температури 37°С.

Біохімічні властивості. Каталазонегативні, оксидазонегативні, ферментують із утворенням кислоти без газу глюкозу, галактозу, лактозу, іноді арабінозу, мальтозу, утворюють сірководень. Не утворюють індол, не редукують нітрити та метиленову синьку, желатин не розріджують. Володіють гемолітичною активністю: на кров'яному агарі утворюють колонії «S»- або «R»-форми, оточені зоною α-гемолізу (рис. 2.20). *E. rhusiopathiae* не вегетує у МПБ з 8,5 % хлориду натрію; вірулентні штами синтезують гіалуронідазу.

Культуральні властивості. Факультативні анаероби, мезофіли. За анаеробних умов при підвищенні рівню CO_2 продуктивність росту *E. rhusiopathiae* підвищується. Із неселективних поживних середовищ використовують рідкі, напіврідкі та тверді поживні середовища, зокрема МПБ, МПА, ГРМ агар та бульйон, середовище Хотінгера, триптон-соєвий бульйон та агар. Додавання до складу поживних середовищ глюкози (0,5%) та сироватки крові коней (5–10%) стимулює ріст *E. rhusiopathiae* (встановлено прискорення росту та підвищення рівню накопичення живих мікробних клітин у культурі). Оптимальна температура інкубації 36–38 °С, термін культивування – 24–48 годин. Оптимальна концентрація водневих іонів у середовищі культивування – у діапазоні pH 7,4–7,8.

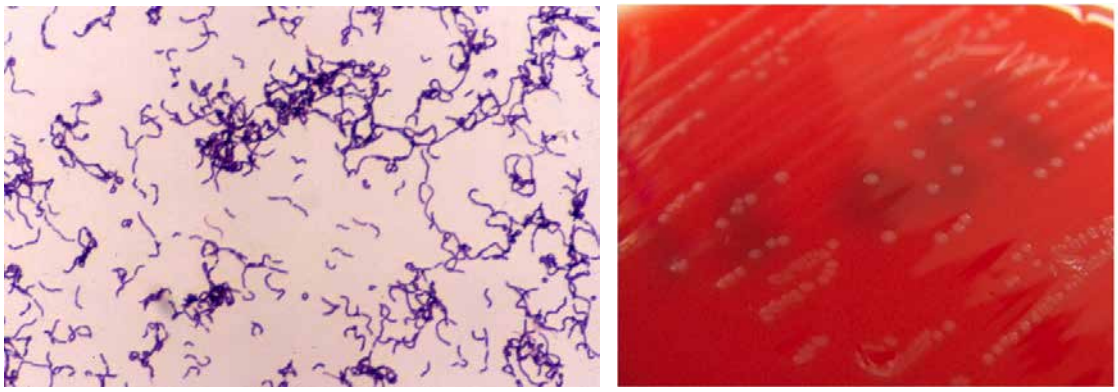


Рис. 2.20. А - *E. rhusiopathiae,* мазки фарбовані за Грамом;
Б - *E. rhusiopathiae,* ріст та α -гемоліз на Columbia Blood Agar
(Джерело: А: https://alchetron.com/Erysipelothrix-rhusiopathiae;
В: https://www.microbiologyinpictures.com/bacteriainphotos/erysipelothrix-rhusiopathiae.html)

В рідких поживних середовищах після 24–48 годин культивування спостерігають слабке помутніння без утворення кільця і плівки; при струшуванні пробірки у товщі середовища спостерігають «муарові хвилі».

На поверхні твердих агаризованих середовищ збудник росте у вигляді дуже дрібних росинчастих прозорих колоній S-форми, що просвічуються, які ледь помітні неозброєним оком. Іноді (частіше із зразків біологічного матеріалу від хворих тварин з хронічним перебігом захворювання) *E. rhusiopathiae* утворюють колонії R-форми – великі, з нерівними краями та поверхнею. Посіви на щільних поживних середовищах краще переглядати за допомогою лупи (через невеликі розміри колоній).

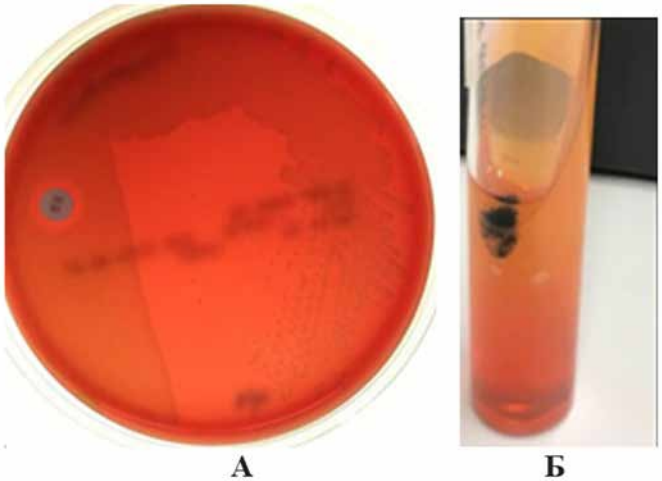


Рис. 2.21. А – Незначна зона затримки росту *E. rhusiopathiae* навколо диску з ванкоміцином (концентрація 30 мкг) ознака стійкості збудника;
Б - утворення сірководню (чорний пігмент) *E. rhusiopathiae* на трицукровому агарі (TSI)
(Джерело: https://cdn.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/blobs/dbd8/6535599/11426e37c098/JCM.02031-18-f0001.jpg)

У напіврідких поживних середовищах ріст *E. rhusiopathiae* проявляється через 6–7 днів культивування утворенням у стовпчику середовища сірувато-

білого стрижня, від якого відходять горизонтальні ніжні відростки; желатин не розріджується.

Антигенна структура. *E. rhusiopathiae* має соматичний антиген (О-антиген) та капсульні полісахариди (зокрема, специфічні антигени II та III типу), які важливі для типування та диференціації серотипів. Відомо три типи антигенів – A, B та N, до яких відносять понад 20 серотипів. Антиген N – загальний видовий. Серотипи A та B відрізняються своїми гаптенами. Штами серотипу B несуть гемаглютинуючий та розчинний імуногенний антиген, тому вони особливо придатні для активної імунізації. Від хворих свиней та клінічно здорових бактеріоносіїв виділяють переважно штами серотипу A (до 95 %), рідше – серотипу B, дуже рідко – серотипу N.

Серологічну типізацію *E. rhusiopathiae* здійснюють за допомогою специфічних сироваток в реакції аглютинації на склі з добовою агаровою культурою.

Біопроба. Із лабораторних тварин найбільш сприйнятливі білі миші та голуби, які гинуть через 2–5 діб після зараження вірулентним штамом збудника. Метод застосовують для: ізоляції збудника з досліджуваного матеріалу; визначення патогенних властивостей виділених штамів.

Біологічний матеріал від тварин подрібнюють, розтирають у ступці додаючи стерильний фізіологічний розчин (співвідношення 1:10); отриману суспензію вводять лабораторним тваринам (білі миші масою 16–18 г) підшкірно в об'ємі 0,1–0,2 $см^3$. За наявності збудника тварини гинуть через 2–4 доби після зараження.

Зараження лабораторних тварин слабовірулентними культурами (виділеними від тварин з хронічним перебігом хвороби, тощо) може призводити до загибелі тварин у більш віддалені терміни або не викликати загибелі тварин. Від загиблих лабораторних тварин відбирають зразки біологічного матеріалу та піддають бактеріологічному дослідженню.

Патогенність. *Erysipelothrix rhusiopathiae* продукують екзотоксини (гіалуронідазу, лецитиназу, фосфатазу, нейрамінідазу), які відіграють роль факторів патогенності. У природних умовах сприйнятливі свині, особливо у віці від 3 місяців до 1 року. Відомі спорадичні випадки захворювання у великої рогатої худоби, овець, оленів, коней, собак. Сприйнятливі дельфіни, гризуни, хутрові звірі, птиця (качки, гуси, кури, індички). *E. rhusiopathiae* патогенні для людини.

Чутливість до антимікробних препаратів. Терапію антимікробними засобами при інфекціях викликаних *E. rhusiopathiae* доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів, зокрема груп пеніцилінів, цефалоспоринів, фторхінолонів.

Лабораторна діагностика бешихи свиней ґрунтується на результатах бактеріологічного дослідження, результати якого підтверджують за допомогою відповідних приладів та тестів методами: молекулярно-генетичними; мас-спектрометрії; біохімічними.

Матеріал на дослідження. У лабораторію направляють труп тварини цілком або серце (при хронічному перебігу обов'язково), печінку, селезінку,

нирку, трубчасту кістку. Матеріал не консервують або поміщають у стерильний 30% розчин гліцерину.

Бактеріологічне дослідження зразків біологічного матеріалу від хворих та підозрілих на захворювання тварин здійснюють відповідно до схеми (таблиця 2.13):

Таблиця 2.13. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на інфекцію викликану *E. rhusiopathiae*

Тип біологічного матеріалу від тварин		
Гній, слиз, ексудат, тощо		Кров (при сепсисі)
Етапи	**Бактеріоскопічне дослідження:**	**Бактерілогічне дослідження:**
1	• Виготовлення мазків, фарбування за Грамом.	• Посів на МПБ, МПА, тощо
2.	-	Оцінюють характер росту культури на поживних середовищах. Готують фарбовані за Грамом мазки з агарових культур. Визначають каталазну та оксидазну активність. Характерні грампозитивні, оксидазо- та каталазо-негативні культури пересівають на: кров'яний агар, трицукровий агар, середовища Гіса з цукрами. Також на даному етапі здійснюють дослідження за допомогою аналізаторів (біохімічних, ПЛР, мас-спектрометрів).
3.	-	Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).
ЗАКЛЮЧЕННЯ		

Лабораторну діагностику інфекцій, викликаних *E. rhusiopathiae* здійснюють також за допомогою аналізаторів, що прискорюють термін дослідження, зокрема автоматичного аналізатора VITEK® 2 compact, MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції).

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні і патогенні властивості збудника бешихи свиней та методи його лабораторної діагностики.*

Питання для самоконтролю

1. *Для яких видів тварин є патогенними E. rhusiopathiae?*
2. *Які фактори обумовлюють патогенність E. rhusiopathiae?*
3. *Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості E. rhusiopathiae.*
4. *Як здійснювати бактеріологічну діагностику E. rhusiopathiae?*
5. *Які тести використовують для диференціації E. rhusiopathiae*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПАСТЕРЕЛЬОЗУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями інфекційних захворювань, викликаних представниками родини Pasteurellaceae та з методами лабораторної діагностики.*

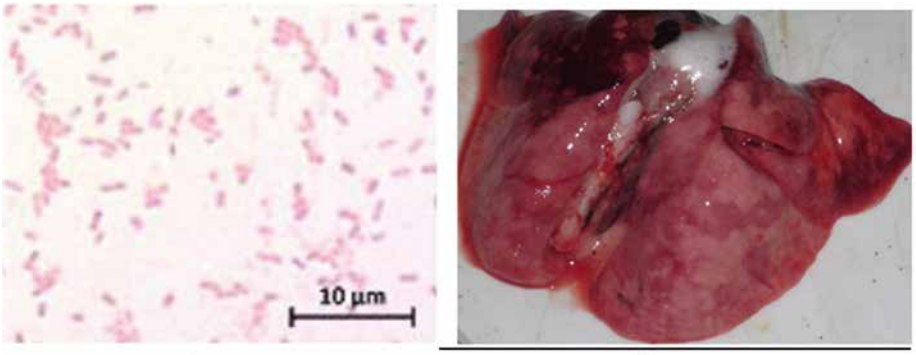
Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі та бактеріологічні петлі. Поживні середовища: МПА, МПБ, Columbia Blood Agar (кров'яний агар), хромогенне середовище CHROMagar™ (*Chromagar Pasteurella*), середовища Гіса з цукрами (глюкозою, сахарозою, манозою, манітом, лактозою, мальтозою), середовище Сімонса, середовище TSI (трицукровий агар); середовища для визначення утворення індолу (бульйон Хотінгера, 2 %-на пептонна вода з додаванням 0,3 %-ного триптофану) та Тест-реактив для визначення індолу (Ковача).*

Пастерельоз (*Pasteurellosis*) – інфекційне антропозоонозне захворювання, що вражає багато видів тварин та людину та викликається бактеріями роду *Pasteurella*.

Найчастіше причиною пастерельозу у тварин багатьох видів є представники виду *Pasteurella multocida*, які в той же час являються поширеними коменсалами (представниками нормальної бактеріальної флори). *P. multocida* поширені по всьому світу. Гострий перебіг пастерельозу супроводжується явищами септицемії, геморагічного запалення слизових оболонок дихальних шляхів та кишківника. Для хронічного перебігу характерні симптоми гнійно-некротичної пневмонії, іноді супроводжуються кератокон'юнктивітом, ураженнями суглобів, молочної залози та матки. Найпоширенішою формою пастерельозу у людини є інфекція м'яких тканин що виникає внаслідок укусів або подряпин тваринами (собаками, котами та ін.).

Характеристика збудника. Вид *Pasteurella multocida* належить до роду *Pasteurella*, родини *Pasteurellaceae*. *P. multocida* – нерухомі грамнегативні овоїди, аероби або факультативні анаероби.

Морфологія. P. multocida грамнегативні, забарвлюються біполярно; у мазках-відбитках з органів і тканин тварин бактерії помітні у вигляді овоїдів або коротких паличок розміром 0,3–1,0×1,0–2,0 мкм, у культурах – овоїдів; не рухливі. Вірулентні штами в організмі тварин утворюють слизову капсулу.



А Б

Рис. 2.22. А: *Pasteurella multocida* у мазках, пофарбованих за Грамом
(*Джерело: https://www.researchgate.net/figure/P-multocida-colonies-growing-on-sheep-blood-agar-a-and-their-characteristics-on-Gram_fig2_369177134);*
Б - серце та легені кроля, загиблого від пастерельозу
(Виговська Л. М., Скрипка М. В., Пустовіт Н.А.)

.

Культуральні властивості. Факультативні анаероби, температурний оптимум 37–38 ºС, pH 7,2 ± 0,2, мезофіли. Культивують *Pasteurella multocida* на рідких, напіврідких та твердих поживних середовищах, як на загальновживаних (МПА, МПБ, ГРМА, ГРМБ, тощо) так і на збагачених. Для збагачення поживних середовищ використовують інактивовану сироватку крові (коней, великої рогатої худоби). На щільних поживних середовищах утворюють гладкі (*S*), мукоїдні (*M*) і шорсткі (*R*) колонії. *R*-форми безкапсульні. На середовищі Columbia Blood Agar формують через 18–24 години культивування колонії *S*-, *M*- або *R*-форми діаметром 1–4 мм, без зон гемолізу навколо колоній. На хромогенному середовищі CHROMagar™ *Pasteurella* 18–24 годинні культури *P. multocida* утворюють колонії фіолетового кольору. Не стійкий у довкіллі: за дії прямого сонячного світла *P. multocida* через 10–15 хв втрачають життєздатність.

Більшість штамів *P. multocida* ферментують глюкозу, сахарозу, манозу та маніт з утворенням кислоти без газу. Не ферментують лактозу та мальтозу, утворюють індол, сірководень, не розщеплюють сечовину та не ростуть на середовищі Сімонса (не утилізують цитрат натрію).

Антигенна структура. Антигенна структура пастерел складна, вони мають термостабільний соматичний О-антиген та капсульний К-антиген у вірулентних штамів, за яким здійснюють серологічну диференціацію збудника. *P. multocida* має 4 серотипи (A, B, D, E).

Патогенність. Існує класифікація Картера і Хедлестоуна заснована на відмінностях збудників в антигенній структурі, відповідно до неї: *P. multocida* серотипу А здебільшого вражає птахів, рідше велику рогату худобу, буйволів та свиней; *P. multocida* типу В викликає гостре захворювання домашніх і диких жуйних, що перебігає у вигляді геморагічної септицемії в Європі, *P. multocida* типу Е – в Африці; тип D – реєструється у всіх видів тварин.

P. multocida серотипу В частіше викликає гострий перебіг пастерельозу; *P. multocida* інших серотипів частіше спричиняють затяжний перебіг захворювання.

Слід пам’ятати що суворої видової специфічності у штамів *P. multocida* різних серотипів не існує.

Пастерельоз у людей реєструється рідко, джерелом інфекції є тварини багатьох видів. Найчастіше пастерельоз розвивається в результаті укусів котів та собак. Можливе також проникнення захворювання через слизові оболонки.

Чутливість до антимікробних препаратів. Терапію антимікробними засобами при пастерельозі доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів, зокрема груп пеніцилінів, цефалоспоринів, тетрациклінів, фторхінолонів.

Лабораторна діагностика пастерельозу

Для бактеріологічної діагностики пастерельозу у лабораторію надсилають: шматочки печінки та селезінки, нирку, лімфатичні вузли, кров із серця, трубчасту кістку.

З метою скринінгових досліджень птиці використовують серологічну діагностику в РНГА.

Бактеріологічне дослідження зразків біологічного матеріалу від хворих та підозрілих на захворювання тварин здійснюють відповідно до схеми (таблиця 2.14).

Таблиця 2. 14. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на пастерельоз

Тип біологічного матеріалу від тварин		
шматочки печінки та селезінки, нирки, лімфатичні вузли, кров із серця, трубчаста кістка		
Етапи	**Бактеріоскопічне дослідження**	**Бактерілогічне дослідження**
1	• Виготовлення мазків, фарбування за Грамом; • відповідь.	• Посів на МПА, МПБ, Columbia Blood Agar; CHROMagar™ Pasteurella • Характер колоній, наявність пігментації,
2	-	• Виготовлення мазків, фарбування за Грамом;
3	-	• Посів характерних колоній з CHROMagar™ Pasteurella на Columbia Blood Agar та на скошений МПА; • Характер колоній на Columbia Blood Agar: наявність або відсутність зони гемолізу.
4	-	• Пересівають з скошеного МПА на середовища Гіса з глюкозою, сахарозою, сорбітом, манітом які *P. multocida* мають розщеплювати з утворенням кислоти без газу; визначають здатність утворювати індол (проба на індол у *P. multocida* позитивна), та сірководень (проба негативна).
5	-	• Визначення чутливості до антибіотиків (відповідно до EUCAST).
ЗАКЛЮЧЕННЯ		

Таблиця 2.15. Культурально-морфологічні ознаки *Pasteurella multocida*

Ознаки	Характеристика *Pasteurella multocida*
Мазки-відбитки з біологічного матеріалу	Неспорові, дрібні, біполярні палички
Фарбування за Грамом	Грамнегативні
Ріст на МПА	18-24 годинні культури утворюють дрібні росинчасті, прозорі з легкою опалесценцією колонії; 48-72 годинні колонії сірувато-білого кольору.
Ріст на МПБ	Рівномірне помутніння з невеликою кількістю білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні.
Мазки з культур	Біполярність майже не реєструється
Рухливість	Нерухливі

Таблиця 2.16. Основні диференційні ознаки представників родини *Pasteurellaceae*

Ознаки	*P. multocida*	*Rodentibacter pneumotropicus*	*Mannheimia haemolytica*	*Actinobacillus ureae*	*Pasteurella aerogenes*	*Avibacterium gallinarum*
Гемоліз на кров'яному агарі	-	-	+	-	+	-
Утворення індолу	+	+	-	-	-	-
Утворення сірководню	-	-	-	-	-	-
сечовина	-	+	-	+	+	+
глюкоза	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*
сахароза	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*
маніт	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*
сорбіт	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*	+*К*
Примітки: *«+» – 90% штамів – позитивна реакція* «-» *– негативна реакція* «*+К*» *– утворення кислоти без газу*						

З метою виділення чистої культури та визначення її вірулентності ставлять біологічну пробу. Біологічним матеріалом від птиці заражають голубів, курей, качок; матеріалом від великої рогатої худоби, свиней та овець заражають білих мишей і кролів.

Голубам матеріал вводять внутрішньом'язово у дозі 0,3 мл, білим мишам – підшкірно у дозі 0,2 мл, кролям – 0,5 мл. Патогенні пастерели викликають загибель заражених тварин через 18–36 годин.

Mannheimia haemolytica – вид грамнегативних бактерій, який належить до родини *Pasteurellaceae*. Факультативний анаероб, не утворює спор, нерухома. Ньюс і Кросс у 1932 році вперше охарактеризували *Mannheimia haemolytica* як *Pasteurella haemolytica* та віднесли її до роду *Pasteurella*.

За результатами ДНК-ДНК гібридизації та секвенування генів за 16S рРНК у 1999 році вид *P. haemolytica* було віднесено до нового роду *Mannheimia.*

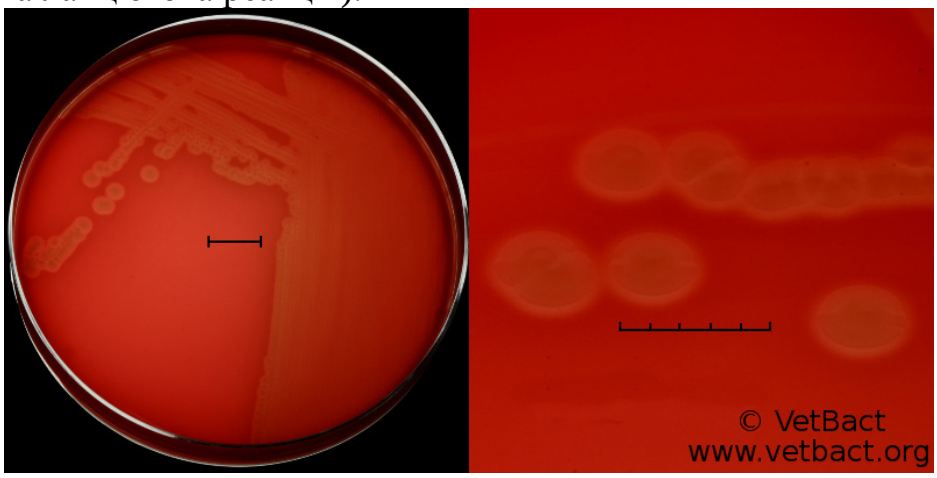
Патогенність *Mannheimia haemolytica* проявляється насамперед як збудник респіраторних захворювань у тварин. У великої рогатої худоби, овець і кіз бактерія викликає пневмонію, часто у складі комплексу респіраторних інфекцій. Інфекція характеризується ураженням легеневої тканини та плеври, що призводить до запалення, утворення ексудату та порушення дихання. Крім того, *M. haemolytica* може спричиняти септицемію, мастити та отити, особливо у молодих або ослаблених тварин. У людини інфекції трапляються рідко, але можливі при укусах або тісному контакті з інфікованими тваринами.

Серед факторів патогенності *M. haemolytica* виділяють лейкотоксини, ендотоксини, інші фактори вірулентності, які пошкоджують тканини дихальних шляхів та призводять до зниження імунітету господаря, внаслідок чого розвивається важка фібринозна пневмонія.

Лабораторна діагностика інфекцій, викликаних Mannheimia haemolytica, передбачає виділення збудника з прижиттєвого _(мазки з носової порожнини, мокротиння, бронхіальний слиз) та патологічного матеріалу (тканини легень, бронхів, верхніх та нижніх дихальних шляхів).

Із зразків біологічного матеріалу від тварин роблять висіви на Columbia Blood Agar (кров'яний агар); *M. haemolytica* утворюють характерні колонії, оточені зоною β-гемолізу. *M. haemolytica* володіє гемолітичною активністю, не утворює індолу, сірководню та сечовини, ферментує з утворенням кислоти без газу глюкозу, сахарозу, маніт, сорбіт.

Прискорену ідентифікацію та диференційну лабораторну діагностику захворювань, викликаних представниками родини *Pasteurellaceae,* здійснюють за допомогою аналізаторів, що прискорюють термін дослідження, зокрема **а**втоматичного аналізатора VITEK® 2 compact, MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція).



А **Б**

Рис. 2.23. Колонії *Mannheimia haemolytica* після культивування на бичачому кров'яному агарі впродовж 24 годин за температури 37°С.
Довжина масштабної шкали еквівалентна 1 см (А) та 5 мм (Б) відповідно
(Джерело:https://www.vetbact.org/popup/image.php?imgtable=vetbact_images&imgid=452)

Чутливість до антимікробних препаратів. Терапію антимікробними засобами інфекцій, викликаних *M. haemolytica*, доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів, зокрема груп макролідів, тетрациклінів та фторхінолонів,

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні і патогенні властивості інфекційних захворювань, викликаних представниками родини* Pasteurellaceae**.**



Питання для самоконтролю

1. Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості P. multocida .

2. Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості M. haemolytica.

3. Як здійснювати бактеріологічну діагностику інфекцій, викликаних бактеріями родини Pasteurellaceae*?*

4. Які тести використовують для диференціації бактерій родини Pasteurellaceae*?*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БРУЦЕЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника бруцельозу у великої рогатої худоби та з методами лабораторної діагностики бруцельозу.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі та бактеріологічні петлі; м'ясо-пептонний печінковий бульйон (МППБ), печінково-глюкозо-гліцериновий бульйон та агар (ПГГБ, ПГГА), гліцеринова картопля, тощо.*

Бруцельоз (лат. *Brucellosis*) – це небезпечна зоонозна інфекційна хвороба тварин і людей, яка передається від хворих тварин до людей та супроводжується гарячкою, ураженням опорно-рухової, нервової та статевої систем, а також алергічними проявами. Найчастіше людина заражається аліментарним та контактним шляхами (через вживання сирого молока та молочних продуктів, а також через контакт із зараженими тваринами та їхніми виділеннями), іноді – повітряно-крапельним шляхом.

Основні шляхи зараження тварин: аліментарний, контактний; можливе зараження повітряно-крапельним та статевим (для деяких видів тварин) шляхом.

Захворювання найчастіше перебігає у гострій, підгострій або хронічній формі. Основні симптоми: у великої рогатої худоби – аборти на 5–7 місяці вагітності, затримка плаценти, безпліддя, мастити, артрити; у овець і кіз – ендометрити, викидні, народження слабкого молодняка, запалення суглобів; у свиней – безсимптомний перебіг або аборти, у кнурів – орхіти, хронічне запалення суглобів; у собак – безпліддя, мертвонародження, збільшення лімфатичних вузлів, ураження суглобів.

Характеристика збудника. Збудниками бруцельозу є бактерії, які відносяться до домену *Bacteria*, типу *Pseudomonadota* (синонім «*Proteobacteria*» з 2021 року), класу α-*Proteobacteria*, порядку *Rhizobiaceae*, родини *Brucellaceae*, роду *Brucella*. На серпень 2025 року відомі 11 видів бруцел:

Brucella abortus – збудник бруцельозу великої рогатої худоби, патогенний для людини; *Brucella canis* – збудник бруцельозу у собак, патогенний для людини; *Brucella ceti* – джерело і резервуар інфекції – морські ластоногі; *Brucella inopinata* – вперше виділена з місця інфекції грудного імплантату людини; *Brucella melitensis* – збудник бруцельозу ДРХ, патогенний для людини; *Brucella microti* вперше виділений з полівки звичайної (*Microtus arvalis*); *Brucella neotomae* – вперше виділений в американських лісових щурів, також зареєстровані випадки захворювання у людини; *Brucella ovis* – збудник інфекційного епідидиміту баранів; *Brucella papionis* – збудник бруцельозу приматів, зокрема павіанів; *Brucella pinnipedialis* – викликає інфекційні захворювання у ластоногих та китоподібних; *Brucella suis* – збудник бруцельозу свиней.

Основним збудником бруцельозу у великої рогатої худоби є *Brucella abortus*. Бруцели здатні до внутрішньоклітинного розмноження, що призводить до тривалої персистенції збудника в організмі.

Морфологія. Бруцели дрібні грамнегативні короткі палички або овоїди (від 0,6–0,7 мкм до 0,6–1,5 мкм), нерухомі (рис. 2.24). Спор, джгутиків та пілей не утворюють. Мікрокапсулу утворюють за певних умов.

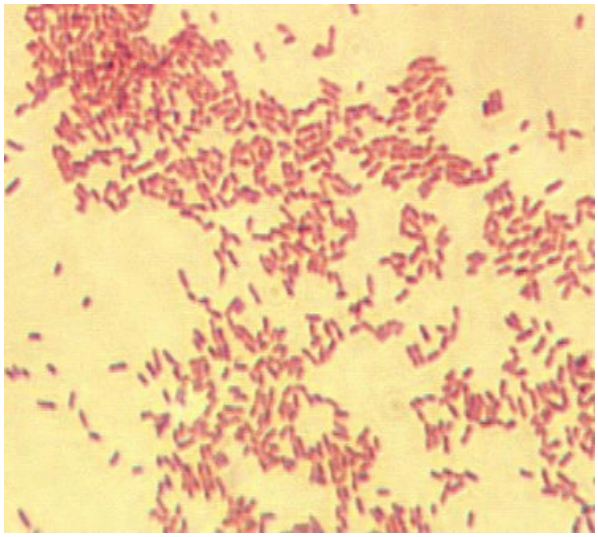


Рис. 2.24. *Brucella spp.* у мазках фарбованих за Грамом
(*Джерело:* https://doh.sd.gov/laboratory/chemical-bioterrorism/atlas-of-organisms/brucella-species/)

Біохімічні властивості. *Brucella abortus* каталазопозитивні, оксидазопозитивні. Більшість бруцел не ферментує вуглеводів, деякі штами ферментують декстрозу, галактозу, ксилозу, левульозу, арабінозу; можуть синтезувати каталазу, пероксидазу, ліпазу, фосфатазу. Бруцели не розріджують желатин, не згортають молоко, не володіють гемолітичною активністю.

Культуральні властивості. Облігатні аероби, мезофіли. Температурний оптимум 37 °С, термін інкубації – при першому пасажі с патологічного матеріалу від 7 до 30-40 діб; при наступних пасажах 2–14-діб. Мікроаерофіли (краще зростають в атмосфері 5–15% вуглекислого газу). Вимогливі до складу живильних середовищ. Ізоляція та культивування бруцел зазвичай здійснюється на твердих живильних середовищах; рідкі поживні середовища використовують для великих обсягів зразків або з метою збагачення.

Для культивування бруцел використовують такі основні поживні середовища як Brucella medium base, триптоновий соєвий агар (ТСА); до складу поживних середовищ додають 2–5% сироватки крові великої рогатої худоби або коня. Також використовують кров'яний агар, сироватково-декстрозний агар (СДА), гліцерол-декстрозний агар, середовище Кастанеди (Castañeda's medium). Зазначені середовища можуть бути використані для приготування селективних середовищ за умови додавання антибіотиків. Найчастіше використовуване селективне середовище Фаррелла (Farrell's medium); його виготовляють шляхом додавання шести антибіотиків до основного середовища. На 1 літр агару додають: сульфат поліміксину (5000 ОД = 5 мг), бацитрацин (25000 ОД = 25 мг), натаміцин (50 мг), налідиксову кислоту (5 мг), ністатин (100 000 ОД), ванкоміцин (20 мг).



Рис. 2.25. А - Колонії *Brucella spp*. на середовищі BD BBL™ Brucella Agar з 5% овечої крові, геміном та вітаміном К1; Б - колонії *B. abortus* на середовищі з овечою кров'ю (SBA)

(Джерело: А: https://www.fishersci.com/shop/products/bbl-brucella-agar-5-sheep-blood-hemin-vitamin-k1-prepared-media/B4397716X; Б: https://www.wikidoc.org/index.php/File:Brucellosis10.jpeg)

Антигенна структура. У бруцел виявлено поверхневий Vi-антиген і соматичний О-антигени двох видоспецифічних типів (А- та М-антигени), кількісне співвідношення яких у різних видів неоднакове. У *B. melitensis* переважає М-, а в *B. suis* - А-антиген.

Біологічна проба. Використовують чутливих лабораторних тварин (морських свинок (не менше 5) масою 350–400 г. У тварин попередньо відбирають кров та досліджують сироватку в реакції аглютинації (РА) з бруцельозним антигеном; результат повинен бути негативним. Суспензію, виготовлену із підозрюваного матеріалу, вводять лабораторним тваринам підшкірно з внутрішньої сторони стегна в об'ємі 1 $см^3$. На 15, 25 і 40 добу після зараження у заражених тварин відбирають кров в об'ємі 1–2 $см^3$ (з вушної вени або з серця) та досліджують сироватку крові РА. За позитивної реакції аглютинації тварин забивають, у разі необхідності отримання культури збудника матеріал від них досліджують бактеріологічно. Термін досліду – до 2 місяців.

Патогенність (зокрема і для людини). Бруцели мають 0-антиген двох типів (А- та М-), містять ендотоксин, продукують фактори агресії: гіалуронідазу, каталазу, пероксидазу. Вони мають високу інвазивну (проникаючу) і адгезивну здатність.

Чутливість до антимікробних препаратів. Бруцели мають природну стійкість до багатьох антибіотиків, для лікування бруцельозу застосовують комбіновану терапію, яка найчастіше включає тетрацикліни (доксициклін) та аміноглікозиди (стрептоміцин), або рифампіцин.

Доксициклін – основний компонент терапії – ефективний проти внутрішньоклітинних бактерій.

Стрептоміцин використовують в комбінації з доксицикліном для досягнення кращого терапевтичного ефекту. Рифампіцин може застосовуватися у випадках, коли аміноглікозиди протипоказані.

Лабораторна діагностика включає проведення *бактеріологічних і серологічних* досліджень.

У господарствах обстеження тварин здійснюють *алергічною пробою*.

Для *бактеріологічного дослідження* в лабораторію надсилають дрібні абортовані плоди (від свиноматки – не менше трьох). Від великих плодів відбирають шлунок з вмістом, шматочки печінки і селезінки. Також відбирають ділянки плодових оболонок з вогнищами геморагічної інфільтрації, виділення з родових шляхів, вміст уражених бурс.

В той же час для серологічного дослідження від тварин, що абортували відбирають проби крові та молока. У разі відсутності можливості доставити зразки відібраного матеріалу в лабораторію впродовж 24–30 годин матеріал консервують 30 %-м стерильним водним розчином гліцерину.

Дослідження проводять у спеціальних лабораторіях рівня BSL3.

Бактеріологічна діагностика бруцельозу основана на: бактеріоскопії мазків із патологічного матеріалу; виділенні культури бруцел; за необхідності – постановці біопроби.

Бактеріологічне дослідження зразків біологічного матеріалу від хворих та підозрілих на захворювання тварин здійснюють відповідно до схеми (таблиця 2.17).

Таблиця 2.17. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на інфекцію викликану *Brucella abortus*

<table>
<tr><td colspan="3">Тип біологічного матеріалу від тварин: мазки - відбитки, гістологічні зрізи</td></tr>
<tr><td>Етапи</td><td colspan="2">Бактеріоскопічне дослідження</td></tr>
<tr><td rowspan="3">1</td><td rowspan="3">*Мазки* (по два з кожного об’єкта) фіксують полум'ям, фарбують за Грамом і на вибір – за Козловським або Стемпом.</td><td>*Препарати мазків фарбованих за Грамом* – бруцели – дрібні короткі грамнегативні, розташовані окремо, попарно або скупченнями палички або овоїди.</td></tr>
<tr><td>*Препарати мазків фарбованих за Козловським* – Фіксовані мазки фарбують 2 хвилини водним р-ном сафраніну (2%) з підігріванням до появи пухирців.
Препарати швидко промивають водопровідною водою, дофарбовують впродовж 30–60 секунд водним р-ном малахітового зеленого (0,75–1,0 %), знов промивають водою і висушують.
Бруцели на відміну від інших бактерій повільно сприймають анілінові фарби, тому не перефарбовуються малахітовим зеленим, та зберігають яскраво-червоне забарвлення. Супутня мікрофлора та основний фон препарату набувають зеленого кольору</td></tr>
<tr><td>*Препарати мазків фарбованих за Стемпом*
Фіксовані мазки:
фарбують *карболовим фуксином Ціля (1:10)* 10 хвилин;
промивають водою - 30 секунд;
обробляють *0,5 % розчином оцтової кислоти*;
промивають водою;
1 % розчином метиленового синього - дофарбовують (20–30 секунд);
промивають *водою*;
висушують і мікроскопують.
Бруцели мають червоне забарвлення, інші мікроорганізми, клітини патологічного матеріалу та фон – синє. В мазках бруцели розміщуються ізольовано, парами і невеликими скупченнями.</td></tr>
<tr><td colspan="3">Тип біологічного матеріалу від тварин: кров, молоко, абортплоди, ділянки плодових оболонок з вогнищами геморагічної інфільтрації, виділення з родових шляхів, вміст уражених бурс</td></tr>
<tr><td>етап</td><td colspan="2">Бактеріологічне дослідження</td></tr>
<tr><td>1</td><td>Посів біологічного матеріалу на поживні середовища:</td><td>Для виділення бруцел використовують спеціальні середовища типу:
- м’ясо-пептонний печінковий бульйон (МППБ),
- печінково-глюкозо-гліцериновий бульйон (ПГГБ), аналогічний агар (ПГГА),
- гліцеринова картопля, тощо.
- Бруцел-агар
Для пригнічення сторонньої мікрофлори до середовищ додають бактеріостатичні препарати:
- генціанвіолет і малахітовий зелений в концентрації 1:200</td></tr>
</table>

		тис; кристал віолет у концентрації 1:100 тис; оцтовокислий натрій із розрахунку 0,125 мг/мл. - Перед посівом із паренхіматозних органів вирізають шматочки розміром 2х1,5х2,5 см, обробляють спиртом і розтирають у ступці з фізіологічним розчином до одержання суспензії, яку сіють пастерівською піпеткою в об'ємі 0,1–0,2 мл на щільні середовища. Вміст шлунку плода сіють на щільні й рідкі середовища. - Для знищення сторонньої мікрофлори у матеріалі з плодових оболонок шматочки проби на 30 хв заливають 3 %-м розчином гідроксиду калію, промивають стерильним фізіологічним розчином й приготовану в ступці суспензію висівають на середовища з бактеріостатиками.
2	Культивування посівів на поживних середовищах:	*Чашки Петрі та пробірки з посівами:* - поміщають у термостат, температура 37±1°С, - посіви від великої рогатої худоби інкубують в мікроаерофільних умовах, з вмістом 10–15 % CO_2. - За посівами спостерігають 30 діб. - Пробірки та чашки, в яких виявлено ріст мікрофлори через 24 годин культивування, видаляють. - Перші ознаки росту бруцел з'являються через 7–10, інколи – через 30–40 діб. - Виділені культури в другому пасажі ростуть значно швидше (на 3–5-й день). На поверхні твердих поживних середовищ бруцели утворюють дрібні, блискучі, випуклі, з рівними краями й поверхнею, голубуваті колонії, які згодом сіріють. В рідких середовищах бруцели утворюють рівномірне помутніння та пристінне кільце на поверхні середовища. Через кілька днів на дні пробірки утворюється невелика кількість осаду.
3	Ідентифікація виділених культур	Виділені культури ідентифікують на основі: - морфологічних, - тинкторіальних, - культуральних особливостей, - а також за допомогою реакції аглютинації на склі з бруцельозною діагностичною сироваткою.
	ПЛР; ІФА VITEK® 2 compact MALDI-TOF MS	- для ДНК-ідентифікації збудника - виявлення комплексу антиген+антитіло - прискорена ідентифікація та визначення чутливості збудника - виявлення специфічних білків
ЗАКЛЮЧЕННЯ		

Таблиця 2.18. Порівняльна характеристика основних видів бруцел

Вид	Біовар	Потреба у CO_2	Продукція H_2S	Ріст на агарі з барвниками		Аглютинація моноспецифічними сироватками		Лізис фагом
				тіонін	*фуксін*	***B. abortus***	***B. melitensis***	
Brucella melitensis	*1*	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
Brucella abortus	*1*	+	+	-	+	+	-	+
	2	+	+	-	-	+	-	+
	3	+	+	+	+	+	-	+
	4	+	+	-	+	-	+	+
	5	-	-	+	+	-	+	+
	6	-	-	+	+	+	-	+
	7	-	+	+	+	+	+	+
	8	-	-	+	+	-	+	+
	9	-	+	+	+	-	+	+
Brucella suis	*1*	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-	+	+	-

Примітки:
«+» – позитивна реакція
«-» – негативна реакція

Для дослідження на бруцельоз:

великої рогатої худоби, зебу та буйволів використовують роз-бенгал пробу (РБП), реакцію аглютинації (РА), реакцію тривалого зв'язування комплементу (РТЗК), реакцію зв'язування комплементу (РЗК), кільцеву реакцію з молоком (КР), а також бруцельозний алерген;

овець, кіз, оленів використовують серологічний (РБП, РЗК, РТЗК) та алергічний методи;

свиней – серологічний (РЗК, РТЗК, РА, РБП) та алергічний методи,

коней – серологічний метод (РА, РБП, РЗК);

верблюдів – серологічний метод (РБП, РА, РЗК);

собак та інших тварин – серологічний метод (РА, РЗК).

Роз-бенгал пробу *(Rose Bengal Test)* проводять при температурі 18– 30 °С на чистому склі або сухій металевій емальованій пластині з лунками.

Нерозведену досліджувану сироватку крові в об'ємі 0,03 $см^3$ мікропіпеткою вносять на дно лунки. При дослідженні сироваток крові великої рогатої худоби, коней, верблюдів і свиней в кожну лунку з сироваткою вносять також 0,03 мл бруцельозного антигену, пофарбованого бенгальським рожевим, а при дослідженні сироваток крові овець, кіз, буйволів й оленів – 0,015 мл. Компоненти ретельно перемішують, пластину злегка погойдують протягом 2 хв.

В позитивних випадках з'являються маленькі й великі пластівці аглютинату рожевого кольору.

Якщо сироватки, що дали позитивну РБП, надійшли з благополучного щодо бруцельозу господарства, то їх обов'язково досліджують за допомогою РА і РЗК з метою встановлення титру специфічних аглютинінів.

Якщо позитивні сироватки крові відібрані від овець, кіз, свиней та оленів, вирощуваних в неблагополучних господарствах, то цих тварин вважають хворими на бруцельоз.

Сироватки крові від інших тварин з таких господарств, позитивно реагуючі в РБП, додатково досліджують постановкою РА і РЗК.

Реакцію зв'язування комплементу (РЗК) та реакцію тривалого зв'язування комплементу (РТЗК) ставлять за описаною вище схемою.

Результати РЗК та РТЗК вважають позитивними за умови затримки гемолізу на два – чотири хрести в одному або декількох розведеннях сироватки (1:5 і більше) та повному гемолізі в контрольних пробірках без антигену.

Затримку гемолізу в один хрест розцінюють як сумнівний результат.

Кільцева реакція з молоком (КР). В уленгутівські пробірки наливають по 0,05 мл кольорового бруцельозного антигену і додають по 1 мл молока. Після ретельного перемішування компонентів пробірки вміщують у водяну баню або термостат при температурі 37–38 °С на годину.

Якщо в сироватці молока присутні антитіла щодо бруцельозного антигену, тоді стовпчик молока знебарвиться, а у верхній його частині утвориться чітке синє кільце.

Інтенсивність реакції враховують за чотирибальною системою в хрестах.

Від корів, молоко яких дало позитивну чи сумнівну реакцію, беруть кров для дослідження на бруцельоз в РА, РЗК, РТЗК або РБП.

Алергічний метод застосовують при обстеженні тварин на бруцельоз безпосередньо в господарствах, застосовуючи при цьому алерген – бруцелін.

Прискорену ідентифікацію збудника здійснюють за допомогою біохімічних аналізаторів (VITEK® 2 compact), методом мас-спектрометрії (MALDI-TOF MS) та ПЛР.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні і патогенні властивості збудника бруцельозу великої рогатої худоби та методи лабораторної діагностики бруцельозу.*

Питання для самоконтролю

1. Для яких видів тварин є патогенними *Brucella abortus*?
2. Які фактори обумовлюють патогенність *Brucella abortus?*
3. Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості *Br. abortus*?
4. Як здійснювати бактеріологічну діагностику *Brucella abortus*?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМІЇ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника Francisella tularensis та з методами лабораторної діагностики туляремії у тварин.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, мікроскоп, імерсійна олія, барвники для фарбування за Грамом, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі та бактеріологічні петлі; поживні середовища, тверді поживні середовища, до складу яких входить яєчний жовток, кров, вітаміни, цистин, цистеїн, тіамін, екстракти органів та тканин тварин (середовище Мак-Коя, напіврідке середовище з кров'ю Омелянової, середовище Френсіса, напіврідке жовткове середовище Дрожевкіної, FT-агар).*

Туляремія (лат. *Tularemia*) – це природно-вогнищеве зоонозне захворювання диких гризунів, хутрових звірів, сільськогосподарських і свійських тварин, що супроводжується геморагічною септицемією та паралічами у молодняку, абортами у дорослих тварин. На туляремію хворіють і люди. Збудник туляремії – *Francisella tularensis.* Основне джерело інфекції для людини – гризуни (ондатри, щури, миші, ховрахи, зайці). Досить часто заражаються мисливці, фермери, заготівельники хутра, м'ясники – після контакту із зараженими тваринами, під час оброблення туш. Збудник вражає насамперед лімфатичну систему та шкіру, селезінку; утворюються множинні гранулематозно-некротичні вогнища у різних органах, реєструється розвиток лихоманки та загальна інтоксикація. Основні шляхи передачі збудника – контактний, аліментарний, аерогенний (повітряно-крапельний), трансмісивний.

Характеристика збудника. Збудником туляремії у тварин є *Francisella tularensis* – бактерії з домену *Bacteria*, типу *Pseudomonadota* (синонім «*Proteobacteria*» з 2021 року) , класу *Gammaproteobacteria,* порядку *Thiotrichales*, родини *Francisellaceae*, роду *Francisella,* виду *Francisella tularensis.*

Назва роду *Francisella* походить від прізвища дослідника туляремії Едварда Френсіса. Видову назву та назву хвороби збудник отримав від провінції Каліфорнії Туляре, де дослідники Мак Кой та Чепін вперше виділили його від байбаків у 1912 році.

Відомі чотири підвиди *Francisella tularensis*: *tularensis* (тип А) (найбільш вірулентний, зустрічається лише в Північній Америці), *holarctica* (тип В) (найпоширеніший), *mediasiatica* (зустрічається у Центральній Азії), *novicida* (найменш вірулентний). Підвиди *tularensis, holarctica* та *mediasiatica* патогенні для людини.

Туляремія – природно-вогнищева зоонозна інфекція, *F. tularensis* здатні циркулювати у вогнищі інфекції серед тварин тривалий час. Природне вогнище збудника підтримується дикими гризунами та кровососними членистоногими. У природних вогнищах резервуаром *F. tularensis* є водяні щури, полівки, зайці, кролики, серед яких періодично виникають епізоотії та від яких заражаються синантропні мишоподібні гризуни. Збудник циркулює в крові інфікованих

гризунів з моменту розвитку септицемії до загибелі тварини. До *F. tularensis* сприйнятливі сірі щури, миші (лісові та хатні), хом'яки, піщанки, ховрахи, бурундуки, кроти, землерийки. З домашніх тварин до *F. tularensis* чутливі вівці, свині, собаки, кішки; з лабораторних тварин – морські свинки, білі миші. Переносники інфекції – кровосисні членистоногі, серед яких найбільше епідеміологічне значення із мають комарі, ґедзі, кліщі.

За ступенем чутливості до *F. tularensis* виділяють три групи тварин.

Перша група – високо сприйнятливі та високочутливі ссавці: полівки, дрібні мишоподібні гризуни, піщанки, водяні щури, хом'яки, хатні миші, землерийки, зайці. У тварин першої групи захворювання перебігає за типом гострої септицемії при мінімальній інфікуючій дозі; збудник виділяється із сечею та калом у великій кількості, загибель тварин реєструють на 6-10 день після інфікування, *F. tularensis* у великих кількостях міститься у крові та внутрішніх органах загиблих тварин.

Друга група – високо сприйнятливі, але малочутливі ссавці (сірі та чорні щури, ховрахи, їжаки, білки). У тварин другої групи інфекційний процес найчастіше закінчується одужанням; паренхіматозні органи та кров помірно контаміновані *F. tularensis*.

Третя група – малосприйнятливі та нечутливі ссавці (хижаки, вовки, єнотоподібні собаки, лисиці, тхори, кішки, собаки). Зараженні тварин збудником у високих дозах не викликає видимих клінічних проявів.

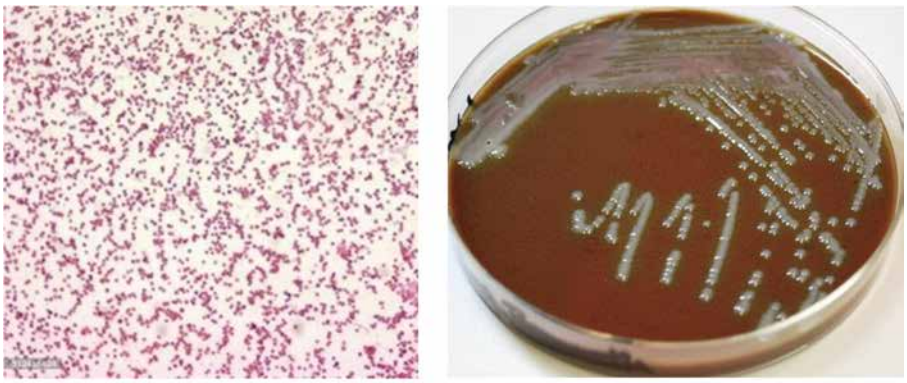
У сільськогосподарських тварин туляремія виникає спорадично, перебігає без видимих клінічних проявів. Зараження тварин відбувається через вживання інфікованих кормів та води, повітряно-краплинним шляхом, у результаті укусів кровосисних членистоногих. Найчастіше туляремію сільськогосподарських тварин реєструють у весняно-осінній період року; захворювання супроводжується невисоким рівнем зараженості тканин; у крові та у виділеннях *F. tularensis* не виявляється.

Морфологія. Дрібні грамнегативні палички (завдовжки 0,3–0,7 мкм, завширшки 0,2–0,4 мкм), нерухомі. Спор не утворюють, синтезують капсули (особливо в організмі тварин).

Біохімічні властивості. *F. tularensis* малоактивні у біохімічному відношенні. Для визначення ферментативної активності збудника туляремії середовища Гіса не придатні; з цією метою використовують тверді поживні середовища зі зниженим вмістом білка та визначеною концентрацією водневих іонів (pH). *F. tularensis* ферментують з утворенням кислоти без газу глюкозу та мальтозу; деякі штами здатні ферментувати левульозу та манозу. *F. tularensis* утворюють сірководень, індол, редукують тіонін, метиленовий блакитний, малахітовий зелений.

Культуральні властивості – факультативні анаероби, мезофіли. *F. tularensis* не росте на простих живильних середовищах; для його культивування використовують середовища, до складу яких входить яєчний жовток, кров, вітаміни, цистин, цистеїн, тіамін, екстракти органів та тканин тварин. Для культивування *F. tularensis* використовують згорнуте жовткове середовище Мак-Коя, напіврідке середовище з кров'ю Омелянової, середовище

Френсіса, напіврідке жовткове середовище, FT-агар. Вірулентні штами *F. tularensis* на середовищах з вмістом жовтка, крові утворюють невеликі колонії S-форми, блискучі, опуклі, діаметром 1–2 мм, з рівними чіткими краями, молочно-білого кольору з блакитним відтінком (рисунок 2.26). Оптимальна температура інкубації 36–38 °С, термін культивування – 2–14 діб. Оптимальна концентрація водневих іонів у середовищі культивування – у діапазоні pH 6,8–7,4.



А Б

Рис. 2.26. А - *F. tularensis,* фарбування за Грамом;
Б – колонії *F. tularensis* на шоколадному агарі
(*Джерело:*
A: https://content.govdelivery.com/landing_pages/49838/1d5a831d04b0562993623033244f9fd5;
B: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214250925002434)

За культивування у рідких поживних середовищах *F. tularensis* росте тільки на поверхні, продуктивність рідких поживних середовищ для культивування *F. tularensis* не висока. *F. tularensis* добре розмножується у жовтковому міхурі курячого ембріона, що розвивається.

Антигенна структура. У вірулентних штамів *F. tularensis* (*S*-форма колоній) наявні два антигенні комплекси, які локалізуються на поверхні клітини. Капсульний *Vi*-антиген містить ліпіди та білки. *O*-антиген пов'язаний із клітинною стінкою і являє собою термостабільний глікопротеїн. Ці антигени викликають утворення аглютинуючих, преципітуючих та комплемент-зв'язуючих антитіл та беруть участь у розвитку гіперчутливості уповільненого типу. Антигени *F. tularensis* мають спільні детермінанти з антигенами *Yersinia pestis* та *Brucella spp.*, тому можливі перехресні серологічні реакції, що необхідно враховувати при серологічних дослідженнях.

F. tularensis в *R*-формі втрачають *Vi*-антиген, що в свою чергу призводить до зниження і втрати вірулентності та імуногенних властивостей.

Біологічна проба. Заражають чутливих лабораторних тварин (морські свинки, білі миші) пунктатом з бубону. В разі наявності збудника у інфекційному матеріалі заражені тварини гинуть через 3–4 доби. З органів загиблих тварин роблять мазки, виявляють збудника.

Патогенність. Факультативний внутрішньоклітинний паразит, здатний уникати лізису макрофагами шляхом міграції з фаголізосоми в цитоплазму.

F. tularensis не продукує екзотоксин; антиген *Vi*, капсула, нейрамінідаза, ендотоксини є факторами патогенності. Збудник продукує гемолізини.

Чутливість до антимікробних препаратів. Терапію антимікробними засобами при інфекціях викликаних *F. tularensis* доречно призначати після визначення чутливості виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів, відмічають природню чутливість *in vitro* до аміноглікозидів, тетрациклінів, макролідів, хлорамфеніколу, рифампіцину. Водночас збудник стійкий до пеніцилінів, цефалоспоринів, фторхінолонів.

Лабораторна діагностика туляремії

Усі роботи з *F. tularensis* та підозрілим біологічним матеріалом слід виконувати в лабораторіях *3-го рівня біологічної безпеки* (BSL-3).

Матеріал від хворих (кров, пунктат бубону, виділення з виразки на шкірі, кон'юнктиви, наліт з мигдаликів, харкотиння) по можливості відбирають у перші дні хвороби, до застосування антибіотиків, висівають на жовткові або кров'яні середовища. Виділену культуру ідентифікують за морфологічними та антигенними властивостями.

Досліджують зразки біологічного матеріалу та виділені мікроорганізми бактеріологічним, серологічними, молекулярно-генетичними методами та методом мас-спектрометрії (MALDI-TOF MS).

Бактеріологічне дослідження зразків біологічного матеріалу від хворих та підозрілих на захворювання тварин здійснюють відповідно до схеми (таблиця 2.19).

Таблиця 2. 19. Схема мікробіологічного дослідження при підозрі на інфекцію викликану *F. tularensis*

Тип біологічного матеріалу від тварин: мазки-відбитки, гістологічні зрізи		
Етапи	Бактеріоскопічне дослідження	
1.	*Francisella tularensis* можна виявити в мазках або гістологічних зрізах за допомогою специфічних імунологічних або імуногістохімічних методів ідентифікації	• ***Препарати мазків для виявлення антигену*** • Мазки-відбитки з внутрішніх органів (печінка, селезінка, кістковий мозок, нирки, легені, кров), виготовляють на предметних скельцях. Фарбують за Грамом. Забарвлення мазків за Грамом виявляє дрібні, точкові грамнегативні бактерії. • *Francisella tularensis* можна виявити за допомогою прямого або непрямого фарбування флуоресцентними антитілами.
		• ***Гістологічні зрізи для виявлення антигену*** • *Francisella tularensis* можна виявити у зрізах за допомогою серологічних методів (тест на флуоресцентні антитіла, (FAT)) та імуногістохімічних тестах.

Тип біологічного матеріалу від тварин: кров серця, печінка, селезінка, кістковий мозок, туляремійні гранульоми		
етап	Бактеріологічне дослідження	
1.	Посів біологічного матеріалу на поживні середовища:	• середовище Мак-Коя, • середовище Френсіса, • Шоколадний агар (СА):, Інкубація посівів (2-14 діб за температури 36-38 ^{0}С)
2.	Оцінка характеру росту культур на поживних середовищах:	• середовище Мак-Коя – колонії дрібні (1-1,5 мм в діаметрі), блискучі, випуклі, з рівним краєм, нагадують шагреневу шкіру; • середовище Френсіса - колонії вологі, мутні, молочно-білого кольору, • Шоколадний агар (СА): крихітні, сіро-білі, непрозорі колонії, 1-2 мм,
3	Виготовлення мазків з отриманих культур, фарбування за Грамом	• Дрібні грамнегативні палички (завдовжки 0,3-0,7 мкм, завширшки 0,2-0,4 мкм)
	Визначення: • Оксидазної активності • Каталазної активності • Уреази	• Негативні • Негативні • Негативні
	ПЛР; ІФА **VITEK® 2 compact** MALDI-TOF MS	для ДНК-ідентифікації збудника **уявлення комплексу антиген+антитіло** **прискорена ідентифікація та визначення чутливості збудника** **виявлення специфічних білків**
ЗАКЛЮЧЕННЯ		

Таблиця 2.20. Порівняльна характеристика підвидів *F. tularensis*

Ознаки	**Підвиди *F. tularensis***			
	tularensis	***holarctica***	***mediasiatica***	***novicida***
Поширення	Північна Америка	Північна Півкуля	Казахстан, Узбекистан	Північна Америка
Вірулентність для людини (ЛД50), кількість мікробних клітин	≤ 10	≤ 1,0x10^3	Дані відсутні	≥1,0x10^3
Ріст на середовищі з цістеїном	+	+	+	-
β-лактамазна активність	+	+	-	+
Ферментація сахарози	-	-	-	+
Ферментація гліцерину	+	-	+	+
Продукція цитрулінуреїдази	+	-	+	+

Примітки:

«+» – позитивна реакція

«-» – негативна реакція

Лабораторну діагностику інфекцій, викликаних *F. tularensis* здійснюють також за допомогою аналізаторів, що прискорює термін дослідження, зокрема:

- VITEK® 2 compact;
- MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry);
- ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) використовується для діагностики туляремії, зокрема для виявлення ДНК *F. tularensis* у біологічному матеріалі;
- ІФА – імуноферментний аналіз – імунологічний метод для визначення наявності антигенів *F. tularensis* в реакції антиген-антитіло.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні і патогенні властивості збудника Francisella tularensis та методи лабораторної діагностики туляремії.*

Питання для самоконтролю

1. *Для яких видів тварин є патогенними F. tularensis?*
2. *Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості F. tularensis.*
3. *Як здійснювати бактеріологічну діагностику F. tularensis?*
4. *Які тести використовують для диференціації F. tularensis?*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СИБІРКИ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника Bacillus anthracis та з методами лабораторної діагностики сибірки у тварин.*

Матеріали і обладнання. *Мікропрепарати, мікроскоп, імерсійна олія, культури вакцинного штаму Bacillus anthracis на МПБ, МПА, набір фарб для фарбування за Грамом, пастерівські піпетки; стандартна преципітуюча сибіркова сироватка, нормальна сироватка (для контролю), стандартний сибірковий антиген; фізіологічний розчин, спиртівки.*

Сибірка (лат. *Anthrax*) – гостре інфекційне захворювання, що характеризується явищами септицемії, інтоксикацією, утворенням специфічних карбункулів. Чутливі до сибірки всі види диких і домашніх тварин, люди. Найчутливіші травоїдні, більш стійкі свині, малочутливі – собаки, кішки. Люди відносно стійкі до зараження *Bac. anthracis* й інфікуються найчастіше під час контакту із зараженими тваринами чи зараженими продуктами тваринного походження. Захворювання виникає внаслідок потрапляння спор *Bac. anthracis* у сприйнятливий макроорганізм. У разі природно набутого захворювання спори не виявляють у тканинах хазяїна, вони утворюються під впливом кисню, коли

вегетативні форми мікроорганізмів із інфікованої крові та інших рідин або тканин трупа потрапляють у навколишнє середовище.

Спори *Bac. anthracis* проникають в організм шляхом втирання в ушкоджену шкіру, вдихання (повітряно-пиловим шляхом), ін'єкцій або разом з їжею. Після цього вони проростають у вегетативні клітини, які розмножуються і продукують токсини, що призводить до загибелі клітин організму та набряку. Спори можуть також фагоцитуватися макрофагами і транспортуватися з місця зараження до регіональних лімфатичних вузлів, де вони також проростають, а вегетативні клітини розмножуються, спричиняючи захворювання.

Патогенність *Bacillus anthracis* визначається передусім двома ключовими факторами вірулентності: капсулою та токсинами.

Капсула складається з полі-D-глутамінової кислоти і має поліпептидну природу з високою молекулярною масою. Вона підвищує вірулентність бактерії, оскільки захищає її від фагоцитозу, дозволяючи мікроорганізмам виживати та розмножуватися в лімфі й крові.

Другим важливим чинником є токсини. Вони представлені трьома білками: протективним антигеном (ПА), набряковим фактором (НФ) і летальним фактором (ЛФ). Саме їх дія зумовлює основні ушкодження в організмі хазяїна.

Ці білки взаємодіють між собою, утворюючи два типи бінарних токсинів: набряковий (ПА + НФ); летальний (ПА + ЛФ).

У кожному випадку протективний антиген спочатку зв'язується з клітинами організму, формує в їх мембрані пори та забезпечує проникнення набрякового або летального фактора. У результаті це призводить до ушкодження і загибелі клітин (цитолізу).

Характеристика збудника. Збудник *Bacillus anthracis* – нерухлива, грам-позитивна, що утворює капсули і спори, паличка (3–10 х 1–1,5 мкм) (рис. 2.27, 2.28).



Рис. 2.27. Мікрофотографія бактерій (бацил) сибірки (фарбування за Грамом)



Рис. 2.28. Палички сибірки на електронній мікрофотографії

Аероб, не вибаглива до умов вирощування, добре росте на звичайних живильних середовищах (оптимальна pH – 7,2–7,6). Капсули утворює в організмі, а також не середовищах, збагачених кров'ю чи сироваткою. Спори

утворює поза межами організму. У трупах, що не підлягали розтину, спори не формуються.

Bac. anthracis ферментує з утворенням кислоти без газу глюкозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, фруктозу та декстрини. Утилізує цитрати, утворює ацетилметилкарбінол, в результаті чого дає позитивну реакцію Фогес–Проскауера. Редукує метиленовий синій. При посіві на молоко воно зсідається повільно, через 2–4 доби і надалі також повільно пептонізується. Лакмусове молоко червоніє за рахунок утворення кислоти. У збудника встановлена наявність каталази і лецитінази, немає уреазної та фосфотазної активності, він чутливий до пеніциліну, лізується специфічними бактеріофагами, патогенний для лабораторних тварин.

Реакція преципітації за Асколі дозволяє в короткі терміни виявити сибірковий антиген в екстрактах із шкіри та органів загиблих тварин, а також у несвіжому біологічному матеріалі. Необхідно також враховувати, що в даний час для вичинки шкір використовуються різні види кислот і лугів, які можуть впливати на результати реакції преципітації. Значення pH для екстрактів повинно знаходитися в межах 6,0–8,0. За необхідності підлуження розчину pH доводять 10 % розчином їдкого натрію, 10 % розчином карбонату натрію, за необхідності підкислення – 20 % розчином хлористоводневої кислоти (можливо інша). Для постановки реакції необхідно мати преципітуючу сибіркову сироватку, екстракт матеріалу, що досліджується, нормальну сироватку (сироватку без антитілдо збудника сибірки), стандартний сибірковий антиген (позитивний контроль) та негативний контроль (в якості негативного контролю можливе використання екстракту шкіри клінічно здорової тварини або стандартизованого антигену, виготовленого із бактерій групи антракоїдів).

Перед постановкою реакції свіжий біоматеріал попередньо витримують протягом 18–20 год у термостаті за температури 37 °С, несвіжий– екстрагують відразу. Екстрагування здійснюють гарячим або холодним способом. При цьому слід враховувати, що екстракти, отримані гарячим методом, містять менше преципітинів.

Для екстрагування гарячим способом біологічний матеріал подрібнюють, поміщають у пробірку або колбу, заливають 0,85 % розчином натрію хлориду у співвідношенні 1:10 і кип’ятять 30–40 хв на водяній бані. При холодному способі екстрагування – не кип’ятять, а залишають протягом 16–18 год за температури 20±2°С.

Отримані екстракти фільтрують до повної прозорості через азбестову вату, фільтрувальний папір чи вату, попередньо змочені 0,85 % розчином натрію хлориду. При цьому перші краплі фільтрату видаляють.

Реакцію виконують шляхом нашаровування або підшаровування. За нашаровування у пробірки Уленгута вносять 0,2–0,3 $см^3$ прозорої преципітуючої сироватки, а потім піпеткою з тонким капіляром обережно, не допускаючи змішування, нашаровують таку ж кількість екстракту. Між рідинами повинна бути видна чітка тонка лінія преципітації.

При підшаровуванні – у пробірки вносять 0,2–0,3 $см^3$ екстракту, потім, під нього, піпеткою обережно підшаровують рівну кількість преципітуючої

сироватки.Якщо між рідинами відсутня чітка тонка лінія преципітації (негативний результат реакції преципітації з екстрактом) реакцію ставлять повторно.

Одночасно ставлять 3 контрольні проби: 1) преципітуюча сибіркова сироватка з стандартним сибірковим антигеном; 2) преципітуюча сибіркова сироватка з екстрактом шкіри клінічно здорової тварини або стандартний антиген із антракоїдів; 3) нормальна сироватка з стандартним сибірковим антигеном.

Реакцію вважають позитивною, коли на границі двох рідин не пізніше, ніж за 15 хв, утворюється тонке каламутно-біле кільце преципітації. За сумнівної реакції утворення кільця спостерігають пізніше, ніж за 15 хв. Якщо кільце відсутнє – реакція вважається негативною.

Бактеріологічна діагностика. При підозрі на сибірку труп розтинати забороняється. В лабораторію надсилають вушну раковину (якщо труп лежить на правому боці – правого вуха і навпаки). На основі вушної раковини зав'язують дві паралельні лігатури. Між ними раковину відрізають. Культю дезінфікують (краще розжареним металом). Раковину загортають у чисту марлю, просочену 3 % розчином карболової кислоти, потім – у поліетиленову плівку чи пергаментний папір, кладуть у металевий ящик. Можна надсилати мазки крові. Місце її взяття дезінфікують 75 % етиловим спиртом, а після маніпуляцій обробляють розжареним металом. Роблять три – чотири товсті мазки на предметних скельцях і висушують їх на повітрі. Сушити слід не під прямими сонячними променями, не допускати, щоб з мазком контактували комахи. Після цього мазки перекладають сірниками (мазком усередину) і загортають у пергаментний папір.

При підозрі на сибірку у свиней (під час огляду туш) відбирають заглоткові лімфовузли та набряклі місця сполучної тканини. Якщо труп тварини випадково розтинали, у лабораторію надсилають шматочок селезінки.

Мікроскопія. Готують мазки з крові та мазки-відбитки з іншого матеріалу. Забарвлюють за Грамом, Романовським–Гімзою. *Bac. anthracis* виявляють у вигляді поодиноких, парних паличок або коротких ланцюжків. Внутрішні кінці паличок мовби обрубано, вільні кінці заокруглено (рис. 2.29, 2.30).

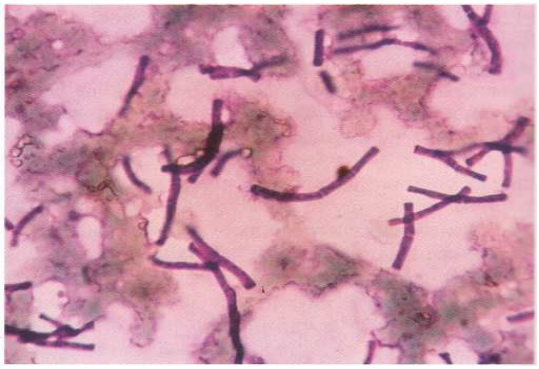


Рис. 2.29. Мазок-відбиток селезінки гвінейської свинки з типовими бацилами *Bac. anthracis*

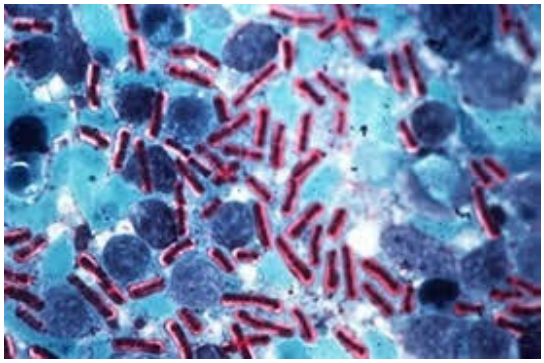


Рис. 2.30. Збудник сибірки в крові

У мазках, забарвлених за Романовським–Гімзою, чітко видно капсулу збудника. У матеріалі від свиней форма *Bac. anthracis* може бути іншою: короткі, товсті, зернисті палички, інколи «роздуті» по центру чи на кінцях.

В результаті мікроскопічного дослідження лабораторія зобов'язана видати попередній діагноз на сибірку, що зорієнтує ветеринарного спеціаліста господарства, ферми на здійснення необхідних заходів, пов'язаних із знезараженням трупа, запобігання поширенню інфекції.

Виділення чистої культури. *Bac. anthracis* за способом дихання відносять до факультативних анаеробів: він однаково добре розвивається в умовах підвищеної аерації, в тому числі і в атмосфері кисню, і в анаеробних умовах.

Посіви здійснюють на МПА і МПБ. Інкубують у термостаті при температурі 37–38 °С 18–24 години. При відсутності росту культури пробірки витримують у термостаті ще дві доби. На МПА *Bac. anthracis* утворює R-форми колонії. Поверхня її матова, краї з локоноподібними відростками. Інколи *Bac. anthracis* утворює S- чи M-форми колонії (при підвищеному вмісті CO_2, внесенні у живильне середовище сироватки крові тощо). На МПБ – типовий (R-форми) ріст у вигляді шматочка вати на дні пробірки. Бульйон залишається прозорим. Інколи він мутніє (S- або M-форма). При мікроскопії мазків, зроблених з агарової культури (звичайні середовища), знаходять довгі ланцюги грампозитивних паличок. У бульйонних культурах – короткі ланцюжки, поодиноко чи попарно розміщені грампозитивні палички. Капсули не виявляються.

У природі існує чимало мікроорганізмів, подібних за морфологією й деякими іншими властивостями до *Bac. anthracis*. Серед них, зокрема, так звані «антрокоїди» *Bac. megatherium*, *Bac. subtilis*, *Bac. cereus* та ін.

Відсутність рухливості, розрідження желатину в стовпчику у вигляді перевернутої ялинки, ріст у вигляді прямих паличок, розміщених ланцюжками, та посилений ріст в аеробних умовах є основними ознаками для ідентифікації *Bac. anthracis*. У таблиці 2.21 наведено схему диференціювання збудника сибірки та деяких сапрофітних бацил.

Таблиця 2.21. Диференційні ознаки *Bac. anthracis* та сапрофітних бацил

Ознака	Вид бактерій роду *Bacillus*			
	anthracis	***cereus***	***megatheium***	***subtilis***
Рухливість	–	+	+	+
Капсулоутворення	+	–	–	–
Гемолітичні властивості	–	+	–	±
Патогенність для білих мишей	+	+	–	–
Чутливість до пеніциліну (феномен «намиста»)	+	–	–	–
Чутливість до сибіркового бактеріофагу	+	–	–	–

Використовують діагностичний метод для диференціації вегетативних клітин *Bac. anthracis* від інших видів *Bacillus* на основі чутливості *Bac. anthracis* до гамма-фага.

Збудник сибірки лізується (рис. 2.31) сибірковими фагами. Фаготипування проводять згідно настанови по застосуванню фагів. Для виявлення фаголізабельності виділених штамів на підсушений МПА в чашці Петрі з розкресленим на квадрати дном бактеріологічною петлею діаметром 5 мм на кожен квадрат наносять велику краплю 5–6 – годинної культури. Чашку знову підсушують 30 хв і потім на центр кожної бляшки культури петлею діаметром 2 мм наносять маленьку краплю специфічного сибіркового бактеріофагу. Облік результатів проводять через 5–6 год інкубації при 37 °С. Якщо культура належить до *B. athracis,* у місці нанесення на неї фагу видно лізис у вигляді стерильної плямки. Жоден вид сапрофітних бацил нечутливий до дії специфічного фагу

Наявність капсулоутворення. Капсули виявляють шляхом висіву у 1 % бікарбонатний-сироватковий агар або білкове середовище ГКІ.

На 1 % бікарбонатно-сироватковому агарі культуру інкубують у CO_2-інкубаторі чи іншому пристрої, щоб створити атмосферу із вмістом 5–10 % CO_2 за температури 36±1 ºС протягом 18–20 год. Культури, що утворюють капсулу, ростуть на агарі у вигляді великих, гладких, блискучих, слизистих колоній. У препаратах-мазках, пофарбованих по Ребігеру (або іншими методами) виявляють ланцюжки паличок, оточені добре вираженою капсулою.

Тест на гемоліз. Тест проводять на кров'яному агарі. Посів досліджуваної культури здійснюють бактеріологічною петлею по секторах та культивують за температури 36±1 ºС протягом 18–20 год.

У ці терміни збудник сибірки не викликає лізису еритроцитів барана (рис. 2.32) на відміну від більшості сапрофітних бацил, які дають широку зону гемолізу навколо колоній.

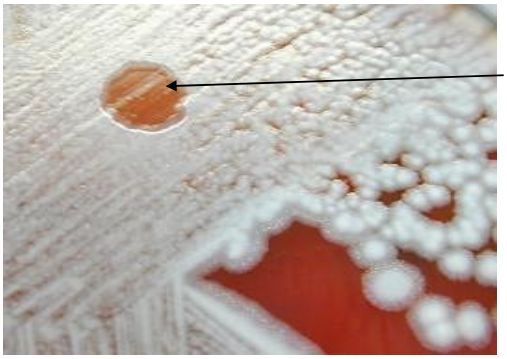


Рис. 2.31. Позитивна реакція з γ- фагом

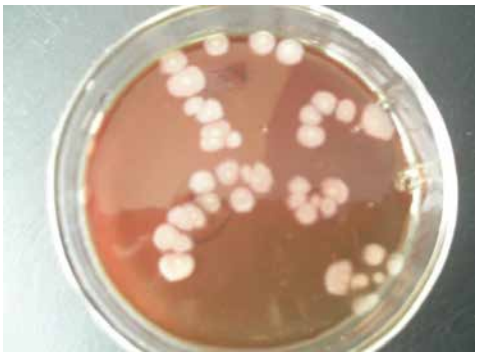


Рис. 2.32. Ріст *Bac. anthracis* на кров'яному агарі, зони гемолізу відсутні

Тест на чутливість до пеніциліну («перлинне намисто»). Поживний агар (МПА, Хоттінгера) розливають у 3 пробірки по 10–15 $см^3$ і охолоджують до 45 ºС. В одну пробірку додають пеніцилін із розрахунку 0,5 $Од/см^3$, у другу –

0,05 Од/см^3, третя залишається без антибіотика (для контролю). Вміст кожної пробірки виливають у бактеріологічні чашки. Після застигання середовища дно чашок розділяють на сектори, на яких пишуть номер дослідження. У кожен сектор вносять по одній краплі досліджуваних 3–6 годинних бульйонних культур. Посіви інкубують за температури 36±1 ºС. Не пізніше ніж через 3 год ріст культур продивляються під мікроскопом з імерсійним об'єктивом, попередньо накривши кожну ділянку росту покривним скельцем.

На середовищі з вмістом пеніциліну відмічають кулясті форми бактеріальних клітин збудника сибірки, розташовані у вигляді ланцюжків, які нагадують намисто із перлин. Спороутворювальні сапрофіти, як правило, стійкі до пеніциліну і мають звичайну паличкоподібну форму. На контрольному середовищі без пеніциліну клітини *Bac. anthracis* формують довгі ланцюжки з типових паличок для збудника.

Було проведено секвенування геному багатьох штамів *Bac. anthracis*. Крім хромосоми, штами дикого типу містять дві плазміди: pXO1 та pXO2, які кодують відповідно синтез токсину та капсули. Більшість хромосомних генів *Bac. anthracis* наявні також у *Bac. cereus*. Плазміду, подібну до pXO1, було виявлено у деяких штамів *Bac. cereus*.

Біопроба. Білим мишам або морським свинкам підшкірно вводять суспензію з патматеріалу чи культуру збудника (відповідно 0,1–0,2 та 0,5–1,0 мл). При наявності збудника сибірки тварини гинуть протягом 24–48 годин при вираженому запаленні в місці введення та дифузійному драглистому набряку в підшкірній жировій клітковині. Трупи розтинають і досліджують бактеріологічно.

Серологічна діагностика за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) інколи застосовується, але має ретроспективне значення. Для швидкої ідентифікації бактерій та діагностики захворювання слід використовувати полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Оскільки *Bac. anthracis* має низку унікальних генів, вибір відповідних генів-мішеней не створює проблеми. Синтез токсину можна підтвердити імунологічними методами або методами генних зондів у відповідних лабораторіях.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, тинкторіальні, культуральні, ферментативні, патогенні властивості Bacillus anthracis та методи лабораторної діагностики сибірки у тварин.*



Питання для самоконтролю

1. Який матеріал надсилають у лабораторію для дослідження?
2. Особливості відбирання матеріалу при підозрі на сибірку.
3. Морфологія та культуральні властивості збудника.
4. Диференціація Bac. anthracis і сапрофітів.
5. Серологічні методи виявлення сибіркового антигену у різних матеріалах.
6. Схема дослідження шкіряної сировини.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ЕМФІЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛА ТА НЕКРОБАКТЕРІОЗУ У ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Мета заняття: *Засвоїти правила відбору та пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження, відмінні особливості морфологічних, культурально-біохімічних властивостей збудників емфізематозного карбункулу та некробактеріозу. Засвоїти схему лабораторної діагностики некробактеріозу.*

Матеріали та обладнання. *Мазках-відбитках з культури Clostridium chauvoei та Fusobacterium necrophorum зафарбовані за Грамом, середовища Кітт-Тароцці, глюкозо-кров'яний агар (в чашках Петрі), середовище Вільсона-Блера, спиртівки, сірники, стерильні чашки Петрі для розливання середовища, стерильні пробірки, предметні скельця, бактеріологічні петлі.*

Патогенні анаероби – це збудники багатьох захворювань: злоякісного набряку, дизентерії ягнят, брадзоту, ентротоксемії овець, емфізематозного карбункула, правця, ботулізму, фузобактеріозу. Всі вони, за винятком останнього, належать до роду *Clostridium*, представники якого –паличкоподібні (частіше рухливі), що утворюють спори, діаметр яких перевищує товщину вегетативної клітини. У молодих культурах – грампозитивні, у старих – грамнегативні. Більшість штамів – суворі анаероби.

Збудник емфізематозного карбункулу

Емфізематозний карбункул, емкар – гостре інфекційне захворювання великої рогатої худоби, рідше–овець, кіз, лосів, оленів. Після потрапляння до організму збудник кров'ю розноситься по всьому тілу, осідає в багатих на м'язи частинах тіла, де швидко розмножується і виділяє токсини, агресини та гіалуронідазу. Під їх дією виникають запальні процеси, переродження і некроз м'язової тканини, розщеплення глікогену з утворенням кислоти й газу, що зумовлює її крепітацію.

В осередках ураження збільшується проникність капілярів, у між м'язових тканинах утворюються значні крепітуючі пухлини. Продукти розпаду тканин і токсини збудника хвороби, надходячи в кров, зумовлюють явища інтоксикації організму, дистрофічні зміни в різних органах та порушення їхніх фізіологічних функцій, що призводить до швидкої загибелі тварини.

Збудник захворювання – *Cl. chauvoei*. Це прямі або трохи зігнуті палички із заокругленими кінцями, довжиною 3–8 мкм. Рухливі, у молодих культурах – грампозитивні, у старих – грамнегативні. Спори утворюють у трупах та у зовнішньому середовищі. Останні розміщуються центрально або субтермінально (рис. 2.33, 2.34). У ґрунті спори зберігаються до 20–25 років, гниючих трупах – до 3 міс., у гниючих м'язах – до 6 міс., на дні стоячих водойм – понад 10 років, у засоленому м'ясі – понад 2 роки. Пряме сонячне випромінювання знищує спори лише через 24 год, текуча пара – через 5–6 год, кип'ятіння – через 2 год, автоклавування – через 30–40 хв.



Рис. 2.33. *Cl. chauvoei* зі джгутиками

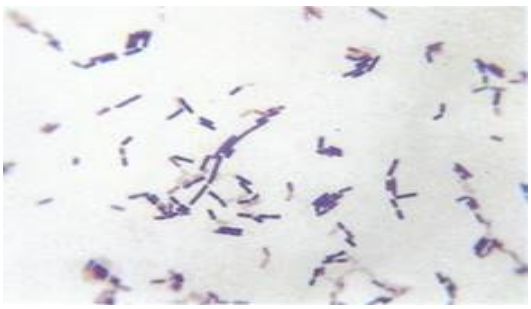


Рис. 2.34. *Cl. chauvoei* (фарбування за Грамом)

Капсул збудник не утворює, анаероб. Оптимальна температура для росту – 36–38 °С. Росте на спеціальних живильних середовищах (Кітт-Тароцці, Мартена, глюкозо-кров'яний агар).

Ферментує з утворенням кислоти і газу глюкозу, лактозу, мальтозу. Саліцин, маніт, гліцерин не розщеплює, розріджує желатин, молоко коагулює.

Бактеріологічна діагностика. У лабораторію надсилають уражену м'язову тканину. При необхідності матеріал консервують 40 % розчином гліцерину або висушують на повітрі.

Мікроскопія. При мікроскопії мазки фарбують за методами Грама чи Муромцева. Збудника знаходять у вигляді поліморфних (веретено-, грушоподібних та кулястих) товстих паличок. Поліморфізм пов'язаний із спороутворенням. Палички розміщені поодиноко, попарно, інколи – у вигляді коротеньких ланцюжків.

Виділення чистої культури. Посів роблять на середовище Кітт–Тароцці, МПБ, МПА. Несвіжий матеріал перед посівом прогрівають протягом 15–20 хв. при температурі 80 °С. Одночасно культуру бажано висівати на глюкозо-кров'яний агар. Посіви витримують в анаеробних умовах 24–48 годин. При наявності збудника рідке середовище спочатку мутніє, й відмічають газоутворення. Згодом бактерії осідають на дно, і бульйон стає прозорим. На агарі через 24 години формуються характерні колонії.

На сироватковому агарі *Cl. chauvoei* утворює сочевицеподібні або округлі колонії з ніжними відростками.

У чашках Петрі з глюкозо-кров'яним агаром через 24–48 год з'являються характерні колонії збудника у вигляді перламутрових ґудзиків або виноградного листя, оточених зоною прозорого гемолізу.

При рості *Cl. chauvoei* на середовищі Кітта-Тароцці спочатку спостерігається помутніння бульйону, що рівномірно розподіляється по всьому стовпчику. Через 20–24 години поживне середовище починає світлішати і за 36–48 годин стовпчик його стає прозорим, а на дні пробірки чи флакона утворюється осад мікробних клітин. Газоутворення незначне. При мікроскопії цих культур виявляють окремі чи попарно розташовані грампозитивні палички і палички із спорами.

На агарі Цейсслера в чашках Петрі росте у вигляді круглих плоских піднятих колоній з рівними краями, що нагадують перламутрові ґудзики чи виноградний лист, колонії оточені вузькою зоною прозорого гемолізу. На

вологому, непідсушеному середовищі краю їх можуть бути зазубреними (рис. 2.35, 2.36).

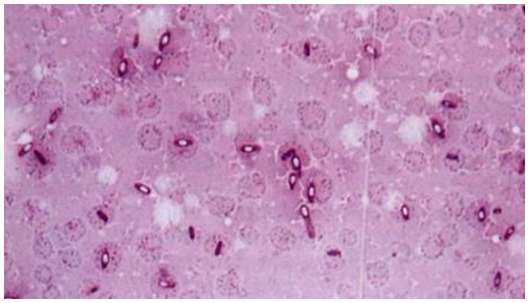


Рис. 2.35. Спороутворення *Cl. chauvoei*

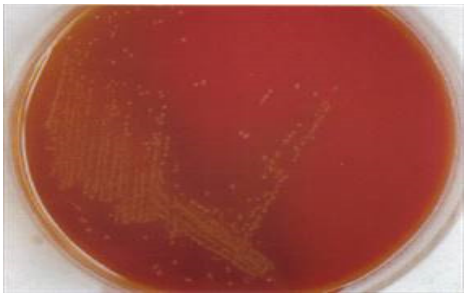


Рис. 2.36. *Cl. chauvoei* культивування на агарі Цейслера

Біопроба. Одночасно з посівами заражають лабораторних тварин. Для цього шматочки м'язів, селезінки або печінки подрібнюють і ретельно розтирають у стерильній ступці з невеликою кількістю МПБ в рівномірну суспензію. Отриману суспензію (1:10) в дозі 0,5–1,0 мл вводять підшкірно в області черевних м'язів двом морським свинкам масою 350–400 г. Кров і м'язовий ексудат вводять таким же способом в дозі 0,5–1,0 мл. Спостереження за зараженими тваринами ведуть протягом 8 діб.

При наявності *Cl. chauvoei* тварини гинуть протягом 24–96 годин. У загиблих морських свинок на шкірі відзначається серозно-некротичний випіт, розлиті або точкові крововиливи. Шкіра від уражених м'язів відділяється важко. М'язи грудей, черевного преса, іноді і задніх кінцівок темно-червоного кольору. У пахових областях виявляються незначні скупчення пухирців газу. Кишечник не роздутий, а як би укладений, органи черевної порожнини без видимих змін. Жовчний міхур переповнений жовчу.

З трупа або убитої в агональному стані морської свинки роблять посіви з місця введення матеріалу, крові серця і печінки в середовище Кітт-Тароцці, МПБ і МПА. Готують мазки-відбитки з тих же органів, а також з діафрагмальної поверхні печінки.

При необхідності диференціації емфізематозного карбункулу від злоякісного набряку суспензією з органів (1:10) або культурою заражають кролика масою 2,0–2,5 кг підшкірно в ділянку спини в дозі 1,0–1,5 мл. Якщо в суспензії знаходився тільки збудник емфізематозного карбункулу – кролик не гине.

Можливо також зараження інших тварин (наприклад, телят) культурою *Cl. chauvoei* для спостереження типових патологоанатомічних змін: мускулатура і підшкірна клітковина геморагічно інфільтровані, темно-червоного кольору, сухі, губчасті, з бульбашками газу.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА НЕКРОБАКТЕРІОЗУ У ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Некробактеріоз (фузобактеріоз) – інфекційне захворювання з ознаками гнійно-некротичного розкладу тканин. Гнійно-некротичні ураження локалізуються переважно на нижніх частинах кінцівок, а в окремих випадках – у ротовій порожнині, на вимені, статевих органах, у печінці, легенях, м'язах та інших тканинах та органах. Інколи процес генералізується. При цьому утворюються метастази – некротичні вогнища у печінці, легенях, нирках тощо.

Збудник – *Fusobacterium necrophorum* – поліморфна, нерухлива, неспороутворююча паличка довжиною 3–5 мкм (у патматеріалі і культурах часто зустрічаються ниткоподібні, довжиною до 30–300 мкм форми), Грамнегативна (рис. 2.37). Забарвлюється нерівномірно (відмічається виразна зернистість пофарбованих бактерій). Анаероб. Добре росте на середовищах, до складу яких входять 10–20 % свіжої кров'яної сироватки та 0,3–0,5 % глюкози (рис. 2.38). Оптимальна для росту температура – 36–38 °С, pH середовища – 7,4–7,6. Ферментує арабінозу, глюкозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, саліцин з утворенням кислоти і невеликої кількості газу.

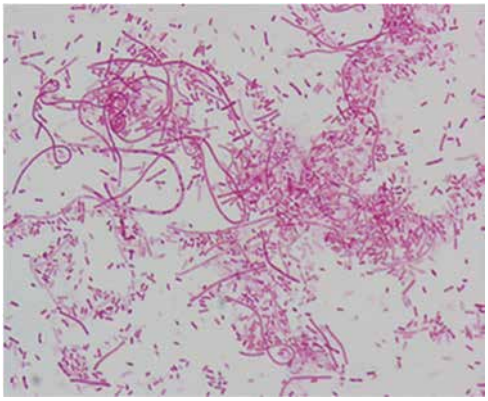


Рис. 2.37. *Fusobacterium necrophorum* фарбування за Грамом

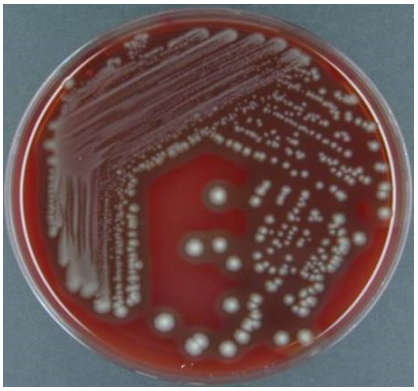


Рис. 2.38. Ріст колоній *Fusobacterium necrophorum* на кров'яному агарі

Бактеріологічна діагностика. У лабораторію надсилають уражену тканину, відібрану на межі з неураженою. Нарізають маленькі шматочки, розтирають у ступці з невеликою кількістю фізіологічного розчину і використовують для виділення чистої культури.

Мікроскопія. Мазки, зроблені з патологічного матеріалу, фарбують синькою Леффлера або за Муромцевим, а також за Грамом. У мазках фарбованих за Грамом. *F. necrophorum* має вигляд ниткоподібних ланцюжків, грамнегативні (Гр), нерівномірно пофарбовані.

Виділення чистої культури. Посів матеріалу здійснюють на середовище Кітт–Тароцці. Інкубують протягом двох – трьох діб при температурі 37 °С. Збудник зумовлює помутніння середовища.

Біопроба. З метою одержання чистої культури заражають білих мишей або кролів. Останнім матеріал вводять під шкіру вуха (0,5–1,0 мл). Через дві –

чотири доби на місці введення розвивається некротичний осередок. З останнього роблять мазки і сіють на живильне середовище. Кролі гинуть від генералізованої форми. Для біопроби використовують також білих мишей, вводячи їм 0,3–0,5 мл культури підшкірно. Гризуни гинуть на 6–10-й день.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити правила відбору та пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження, відмінні особливості морфологічних, культурально-біохімічних властивостей збудників емфізематозного карбункулу, некробактеріозу та схему лабораторної діагностики цих інфекцій.*



Питання для самоконтролю

1. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію для діагностики емкару?
2. Морфологія, культуральні, тинкторіальні й біохімічні властивості збудника емкару.
3. Бактеріологічний метод діагностики емкару.
4. Морфологія, культуральні, тинкторіальні й біохімічні властивості збудника некробактеріозу.
5. Бактеріологічна діагностика некробактеріозу. Особливості біопроби.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПРАВЦЯ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника правця та з методами лабораторної діагностики правця.*

Матеріали та обладнання. *Предметні скельця, набір фарб для фарбування за Грамом, патологічний матеріал (запальний ексудат, шматочки тканин, взяті з глибини ураженої ділянки), середовища для культивування (Кітт-Тароцці, глюкозо-кров'яний агар), анаеростат, ексикатор, стерильні чашки Петрі для розливання середовища, стерильні пробірки, предметні скельця, бактеріологічні петлі.*

Правець (лат. *Tetanus*) – гостре інфекційне захворювання тварин і людини. Характеризується високою рефлекторною збудливістю, судомними скороченнями м'язів.

Збудник – *Clostridium tetani* – облігатний анаероб, який добре росте в м'ясному бульйоні, а при культивуванні на збагаченому кров'яному агарі утворює тонку плівку, яка поширюється. Спори можуть бути дуже стійкими до несприятливих умов, але ступінь стійкості змінюється залежно від штаму.

Спори деяких штамів витримують кип'ятіння у воді до 3 год. Вони можуть протистояти сухому жару за температури 160 °С протягом 1 години та 5 % розчину фенолу впродовж 2 тижнів і більше. Вважають, що 1 % водний розчин йоду вбиває спори протягом кількох годин, але один із небагатьох хімічних дезінфектантів, який є ефективним спороцидним засобом, – це глутаральдегід.

Збудник правця містить соматичний (О) та джгутиковий (Н) антигени. Перший груповий, останній – типоспецифічний. Спори містять лише соматичний антиген. За характеристикою джгутикового антигену розрізняють 10 серологічних варіантів збудника. У природі циркулюють переважно перші два сероваріанти. Різні серологічні варіанти продукують імунологічно однорідний екзотоксин, який нейтралізується протиправцеву сироваткою.

На відміну від більшості патогенних анаеробів збудник правця не має факторів інвазивності. В той же час він продукує надзвичайно сильний фактор токсичності – екзотоксин. Останній містить два компоненти: тетаноспазмін та тетанолізин. Екзотоксин продукується як в ураженому організмі, в місці локалізації збудника, так і на живильному середовищі. В останньому випадку його виявляють після 24-годинної інкубації, а в найвищій концентрації – на 5–7-му добу. З мікробної клітини екзотоксин виділяється секрецією, а також після її лізису. Тетаноспазмін є основним токсичним фактором. Він уражує нервові клітини, тобто характеризується нейротропністю. У значній кількості тетанолізин виявляють у культуральній рідині вже через 20–30 год. Характеризується він гемолітичною активністю, руйнується у присутності атмосферного кисню, має загальні властивості з тета-токсином, а також з пневмолізином пневмококів і 0-стрептолізином гемолітичних стрептококів. Співвідношення тетаноспазміну та тетанолізину у різних штамів може значно коливатися, що впливає і на характеристику зумовлюваних ними патологічних процесів в організмі уражених тварин. Екзотоксин *CI. tetani* термолабільний – при 60°С руйнується протягом 30 хв, при 65°С – за 5 хв. Він інактивується під впливом сонячних променів, розчинів марганцевокислого калію, кислот, лугів, йоду, азотнокислого срібла.

Під дією формаліну екзотоксин переходить в анатоксин, який характеризується вираженою імуногенністю.

До токсину *CI. tetani* чутливі ссавці усіх видів. Найбільш чутливими є коні, потім вівці, кози, велика рогата худоба, свині, собаки, коти, а також люди. Більш чутливими є молоді тварини. Серед лабораторних тварин надзвичайно чутливі білі миші, морські свинки, кролі.

Крім екзотоксину, факторами патогенності збудника правця є також РНК-аза та фібринолізин. РНК-аза токсична для лейкоцитів, гальмує фагоцитарну їх активність. Патогенна дія фібринолізину пояснюється, зокрема, тим, що він сприяє всмоктуванню екзотоксину.

Збудник правця – *Cl. tetani* – представник роду *Clostridium*. Це тоненька грампозитивна рухлива паличка довжиною 4–8 мкм. Утворює спори, які розміщено переважно термінально (рис. 2.39, 2.40).

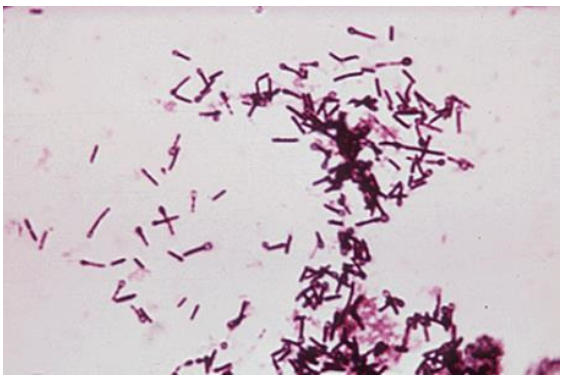


Рис. 2.39. Палички *Clostridium tetani* (фарбування за Грамом)

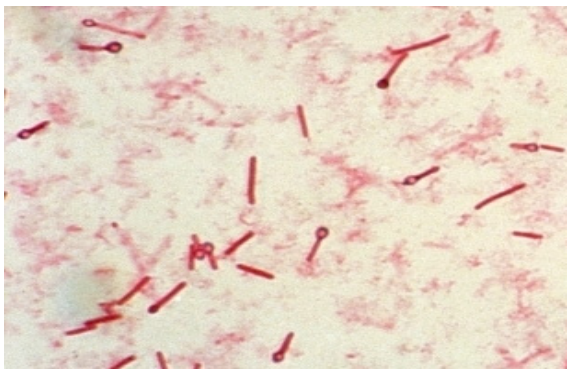


Рис. 2.40. Грампозитивна паличка *Clostridium tetani*

Облігатний анаероб. Оптимальна температура вирощування – 37–38 °С, pH середовища 7,4–7,9. Розріджує желатин повільно. Протеоліз супроводжується утворенням сірководню, аміаку. Деякі штами ферментують глюкозу, мальтозу, сахарозу.

Бактеріологічна діагностика. У лабораторію надсилають відібраний запальний ексудат, шматочки тканин, взяті з глибини ураженої ділянки.

Мікроскопія. Мазки фарбують за Грамом. При мікроскопії у позитивних випадках знаходять тоненькі грампозитивні палички, частина яких утворює спори. Слід пам'ятати, що деяка стороння мікрофлора може імітувати збудника правця (*Cl. tetanomorphum*, *Cl. putrificum* тощо).

Виділення чистої культури. Посів здійснюють на середовище Кітт–Тароцці (якщо при мікроскопії у матеріалі, крім типових для збудника форм, спостерігали й інші). Перед посівом матеріал прогрівають протягом години при температурі 80 °С.

При наявності *Cl. tetani* середовище Кітт–Тароцці мутніє, а через 72 години стає прозорим. Відмічають слабке газоутворення, характерний запах. З культури роблять мазки й мікроскопують. При наявності сторонньої мікрофлори протягом 20 хв. При температурі 80 °С або протягом 2–3 хв. – при 100 °С.

З рідкого середовища роблять пересів на глюкозо-кров'яний агар. *Cl. tetani* утворює ніжні колонії з випуклим центром, інколи – маленькі круглі колонії. Гемоліз виражений слабо (рис. 2.41, 2.42).



Рис. 2.41. Середовища для анаеробного культивування *Clostridium tetani*

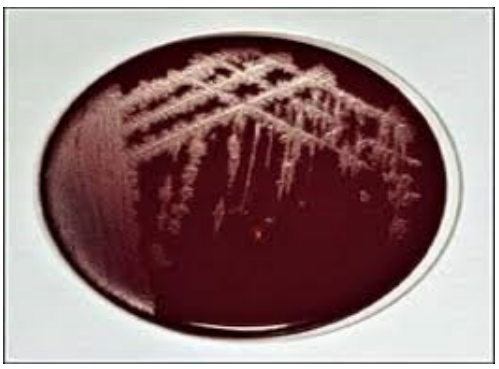


Рис. 2.42. Ріст *Clostridium tetani* на глюкозо-кров'яному агарі

Біопроба. Ставлять на білих мишах або морських свинках. Тварин заражають з метою вияву токсину *Cl. tetani* у патологічному матеріалі, а також у виділеній культурі.

Для вияву екзотоксину у патологічному матеріалі останній розтирають у ступці, заливають подвійною кількістю ізотонічного розчину кухонної солі й залишають на годину при кімнатній температурі. Фільтрують через ватно-марлевий фільтр (можна паперовий). Фільтрат уводять підшкірно двом – трьом білим мишам (0,5–1 мл) або морським свинкам (3–5 мл). При наявності токсину *Cl. tetani* через два – три дні у тварин спостерігаються специфічні ознаки. Вони гинуть у характерній позі з витягнутими кінцівками й викривленням тулуба у бік кінцівки, куди було введено патматеріал. Тривалість спостереження за тваринами (якщо вони не загинули) – 10 днів.

З метою вияву токсину одержану культуру фільтрують, центрифугують для відокремлення бактерій. Вільну від мікробів рідину вводять у дозі 0,3–0,5 мл двом – трьом білим мишам чи морським свинкам підшкірно, у задню кінцівку.

При наявності токсину тварини гинуть через 12 годин – п’ять діб.

Ідентифікацію токсину здійснюють за допомогою реакції нейтралізації на лабораторних тваринах. Суть її полягає у тому, що досліджуваний матеріал вводять разом з протиправцевою сироваткою. Якщо вона запобігає захворюванню і загибелі тварини, роблять висновок про те, що матеріал містив відповідний токсин.

Правцевий токсин можна виявити також і за допомогою інших серологічних реакцій, зокрема реакції пасивної гемаглютинації. Перспективним є метод імунофлуоресценції, який дає змогу ідентифікувати збудника безпосередньо в патологічному матеріалі (експрес-діагностика) та в одержаній культурі. Полімеразна ланцюгова реакція також може бути використана для виявлення токсину правця, але її чутливість невідома.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити правила відбору та пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження, особливості морфологічних, культурально-біохімічних властивостей Cl. tetani, резистентність, антигенну структуру та фактори патогенності. Вивчити схему лабораторної діагностики правця.*



Питання для самоконтролю

1. Морфологія й тинкторіальні властивості Cl. tetani.
2. Які біологічні ознаки (морфологічні, тинкторіальні, біохімічні, антигенні, резистентність) характерні для Cl. tetani?
3. Який патологічний матеріал відбирають і якими методами досліджують у разі підозри на правець?
4. Які фактори патогенності виробляє Cl. tetani?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БОТУЛІЗМУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника ботулізму та з методами лабораторної діагностики ботулізму.*

Матеріали та обладнання. *Предметні скельця, набір фарб для фарбування за Грамом, проби корму (силос, зерно, дерть, м'ясні й рибні відходи тощо), вміст шлунку, відрізки кишок з вмістом, кров)), середовища для культивування Кітт-Тароцці або кров'яний агар), анаеростат, ексикатор, стерильні чашки Петрі для розливання середовища, стерильні пробірки, предметні скельця, бактеріологічні петлі.*

Ботулізм (лат. *Botulismus*) – гостре кормове отруєння тварин, зумовлене токсином *Cl. botulinum.* Переважають ознаки нервово-паралітичного характеру. Летальність становить 85–100 %.

Cl. botulinum – поліморфний, в основному кокоподібної форми мікроорганізм величиною 4–6 мкм, грампозитивний, утворює спори. Останні надзвичайно термостійкі – витримують кип'ятіння протягом – 5–6 годин. Спори овальної форми, розміщені термінально або субтермінально. Багато спорулюючих клітин – ракеткоподібного вигляду. Збудник – суворий анаероб, продукує сильнодіючий екзотоксин, неоднорідний за антигенною структурою. Розрізняють токсини A, B, C, D, E та F. Кожний з них нейтралізується лише типоспецифічною сироваткою. Оптимальною температурою для утворення токсину у бактерій типів A, B, C і D є 35 °C, у бактерій типів E та F – 28–30 °C. Окремі серовари відрізняються між собою не тільки за антигенною структурою, а й за ферментативною активністю.

Бактеріологічна діагностика ботулізму полягає у виявленні ботулінічних токсинів, а також самого збудника. У лабораторію надсилають проби корму (силос, зерно, дерть, м'ясні й рибні відходи тощо), вміст шлунку, відрізки кишок з вмістом, кров.

Проби корму і вміст шлунку ретельно розтирають у ступці зі стерильним піском чи склом, заливають подвійною кількістю ізотонічного розчину кухонної солі й використовують для вияву токсину і виділення збудника.

Мікроскопія. Мазки фарбують за Грамом. Наявність у полі зору грампозитивних паличок, овальних спор, характерних «тенісних ракеток» дає змогу впевнитись, що у матеріалі є збудник ботулізму.

Виділення чистої культури. Посів роблять на середовище Кітт–Тароцці або кров'яний агар. Культивують в анаеробних умовах. У рідкому середовищі *Cl. botulinum* зумовлює помутніння, потім – утворення осаду й прояснення рідини, газоутворення. Клостридії ботулізму утворюють шорсткі колонії на печінковому агарі в анаеробних умовах. На агарі утворюються колонії неправильної форми з відростками, навколо яких – зона гемолізу. (рис. 2.43, 2.44).

На залізо-сульфітному агарі (середовищі Вільсона-Блера) клостридії ботулізму формують колонії чорного кольору за рахунок утворення сульфіду заліза під впливом сірководню, що виділяється бактеріями.



Рис. 2.43. Ріст *Clostridium botulinum* на середовищі Кітта-Тароцці – перша пробірка, контроль – друга пробірка.



Рис. 2.44. Колонії *Clostridium botulinum* на печінковому агарі

Токсин і його тип у мікробній культурі визначають, як і при виявленні у патологічному матеріалі. З цією метою використовують фільтрат або центрифугат чистої 4–8-добової культури.

На желатиновому середовищі збудник ботулізму формує сірі колонії, оточені зоною розрідженого желатину. Протеолітичні властивості найбільш виражені у бактерій, які продукують токсини типів А і В. Менш виражені протеолітичні властивості у бактерій, що синтезують токсин типу F, а у бактерій, що продукують токсини типів С, D і Е, протеолітична здатність дуже слабка.

Всі типи збудника продукують желатиназу та лецитиназу. *Cl. botulinum* ферментує гліцерин, глюкозу, левулозу, мальтозу, декстрин, саліцин, інозит з утворенням газу та кислоти і не розкладає сахарозу, галактозу, маніт, дульцит, рамному і арабінозу. Ці властивості непостійні.

Біопроба. Для виявлення токсину *Cl. botulinum* підготовлену пробу витримують 1–2 години при кімнатній температурі, фільтрують через фільтр Зейтца і ділять на три частини. При його відсутності матеріал можна фільтрувати з використанням ватно-марлевого фільтра або центрифугувати при 3000 об/хв. протягом 20–30 хв. Одержаний фільтрат (центрифугат) використовують для зараження білих мишей живою масою 16–18 г. Двом із них вводять фільтрат у дозі 0,5–0,8 мл внутрішньочеревно або підшкірно. Одночасно заражають мишей прогрітим (100°С – 30 хв.) матеріалом. При наявності токсину *Cl. botulinum* тварини, яким ввели непрогрітий матеріал, хворіють з характерними ознаками (розслаблення м’язів, параліч) гинуть, а ті, що одержали прогрітий матеріал, лишаються живими.

Замість мишей можна використовувати морських свинок. З метою ідентифікації ботулінічного токсину ставлять реакцію нейтралізації. Для цього перед введенням тваринам матеріал змішують з поліваленттними (при можливості – моновалентними) протиботулінічними сироватками й витримують їх протягом 30 хв. при температурі 32 °С. Тварини, які одержали суміш токсину з гомологічною сироваткою, виживають, а решта – гинуть.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити правила відбору та пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження,*

особливості морфологічних, культурально-біохімічних властивостей збудника, резистентність та фактори патогенності. Освоїти схему лабораторної діагностики ботулізму.



Питання для самоконтролю

1. Особливості лабораторної діагностики ботулізму.
2. Методика виявлення ботулінічного екзотоксину.
3. Виділення та ідентифікація Cl. botulinum.
4. Який патологічний матеріал відбирають і якими методами досліджують у разі підозри на ботулізм?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з основними підвидами збудників туберкульозу, морфологічними, тинкторіальними та біохімічними властивостями збудників, факторами патогенності, методами лабораторної діагностики. Освоїти методи фарбування та виявлення під мікроскопом збудника туберкульозу за його морфологічними та тинкторіальними властивостями.*

Матеріали та обладнання. *Мазки з підготовленого нативного матеріалу пофарбовані за Цілем–Нільсеном, барвники для фарбування за Цілем–Нільсеном, предметні скельця, мікроскопи, поживні середовища (Левенштейна–Йенсена, Гельберга, Петраньяні, гліцериновий МПБ), спиртівки, сірники.*

Туберкульоз – інфекційне захворювання тварин і людини, яке перебігає найчастіше хронічно і характеризується утворенням в уражених органах й тканинах особливих вузликів (туберкулів), схильних до казеозного розкладу.

Збудники захворювання *– Mycobacterium tuberculosis complex.* До цього комплексу належать близькоспоріднені види: *Mycobacterium tuberculosis* (основний збудник туберкульозу у людей), *Mycobacterium bovis* (збудник туберкульозу великої рогатої худоби, зоонозний), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti,* а також інші види (зокрема *M. caprae, M. pinnipedii, M. Orygis, M. avium*). Представники цього комплексу характеризуються високою генетичною спорідненістю, подібними морфологічними та біологічними властивостями, але відрізняються спектром природних хазяїв і епідеміологічними особливостями.

Мікобактерії туберкульозу мають форму тонких, прямих або трохи зігнутих, нерухливих грампозитивних паличок величиною 0,3–0,6 х 0,8–5,5 мкм, які не утворюють спор і капсул. У старих культурах зустрічаються тонкі переплетені нитки, що іноді розгалужуються. У зв'язку з підвищеним вмістом у клітинах збудника жирових і жировоскових речовин мікобактерії туберкульозу мають гідрофобні властивості, що надає їм стійкості проти короткочасної дії кислот, лугів, спиртів, антиформіну тощо.

Діагностика туберкульозу комплексна й основана на застосуванні патологоанатомічних, бактеріологічних та алергічних методів з урахуванням епізоотологічних даних і клінічних ознак хвороби.

Бактеріологічна діагностика. *В* лабораторію надсилають заглоткові, підщелепні, бронхіальні, пахвинні, надвим'яні, передлопаткові лімфатичні вузли, а також внутрішні органи, які відбирають за умови наявності в них підозрілих змін. Трупи птиці відправляють цілими.

Матеріал надсилають у свіжому чи замороженому стані або консервують 30 % водним розчином хімічно чистого гліцерину. За життя від тварин відбирають бронхіальний і вагінальний слиз, проби молока (150–200 мл) та фекалій (50–100 г). Перед проведенням бактеріологічних досліджень патологічний матеріал піддають спеціальній обробці, мета якої полягає в знищенні сторонньої мікрофлори і концентрації туберкульозних бактерій у невеликому об'ємі.

Внутрішні органи й лімфатичні вузли подрібнюють (ножицями) на невеличкі шматочки, які розтирають у стерильній ступці з додаванням стерильного битого скла або піску, заливають 3–5 % розчином сірчаної або 5–10% розчином щавлевої кислоти у співвідношенні 1:4, фільтрують через два шари стерильної марлі і центрифугують при 3000 об/хв. протягом 10–15 хв. Надосад зливають, осад двічі – тричі відмивають фізіологічним розчином (за допомогою центрифуги) і використовують для виготовлення мазків та проведення посівів з метою виділення чистої культури збудника.

З молока за допомогою центрифуги одержують осад, який обробляють 6 % розчином сірчаної кислоти, двічі – тричі відмивають фізіологічним розчином і використовують для дослідження.

Бронхіальний і вагінальний слиз змішують порівну з 10 % розчином тризаміщеного фосфату натрію, перемішують і ставлять у термостат на 24 години. Для досліджень використовують осад, одержаний центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 10–15 хвилин.

Фекалії гомогенізують у ступці з 18 % розчином сірчаної кислоти, фільтрують через стерильну марлю, центрифугують. Відмитий фізіологічним розчином осад використовують для виготовлення мазків та посівів на живильні середовища.

Концентрацію мікобактерій у досліджуваному матеріалі здійснюють також методом флотації. Гомогенізований до пастоподібного стану у ступці матеріал з додаванням фізіологічного розчину (10 $см^3$) поміщають у вузькогорлу колбу місткістю 250 $см^3$, додають таку ж кількість 1 % розчину гідрооксиду натрію і на шуттель-апараті доводять до однорідної консистенції. Матеріал розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:9, додають 1–2 $см^3$ ксилолу або авіаційного бензину. Суміш струшують протягом 5–10 хвилин, додають дистильовану воду до вузького перехвату колби і залишають на 30 хв. при кімнатній температурі. Туберкульозні бактерії спливають і концентруються у верхньому шарі рідини, який і використовують для досліджень.

Бактеріологічний метод діагностики туберкульозу включає три основні позиції: мікроскопію мазків із підготовленого матеріалу, виділення чистої культури мікобактерій та постановку біопроби.

Мікроскопія. Із нативного матеріалу, підготовленого для досліджень, готують по два мазки з кожного органу і лімфатичного вузла. Після висушування препарати фіксують над полум'ям і фарбують за *методом Ціля– Нільсена:*

– карболовий розчин фуксину Ціля наносять на мазок через смужку фільтрувального паперу і нагрівають до появи парів, не допускаючи висихання препарату;

– після остигання залишок фарби зливають, мазок промивають водою;

– препарат обробляють 3 % розчином солянокислого спирту (до 97 $см^3$ 70 % етилового спирту додають 3 $см^3$ концентрованої соляної кислоти) до повного знебарвлення фону;

– промивають ретельно водою і дофарбовують метиленовим синім протягом 3–5 хвилин;

– фарбу змивають водою, мазок висушують і досліджують під мікроскопом з використанням імерсійної системи.

Кислотостійкі мікобактерії туберкульозу після обробки фуксином не знебарвлюються солянокислим спиртом і зберігають рубіново-червоний колір. Розміщуються по одній або невеличкими скупченнями. Зернисті (нерівномірно забарвлені). Фон мазка, клітини патологічного матеріалу та інші види бактерій набувають синього кольору (рис. 2.45, 2.46).

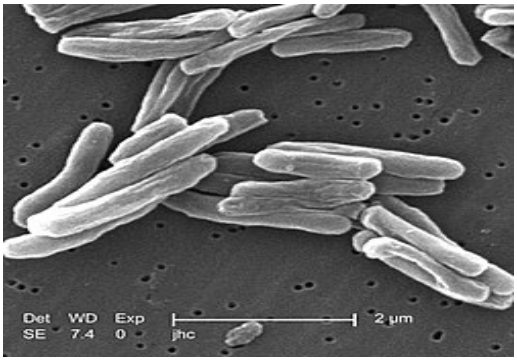


Рис. 2.45. Растрово-електронна мікрографія *Mycobacterium tuberculosis*

(Джерело: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cb/Mycobacterium_tuberculosis.jpg)

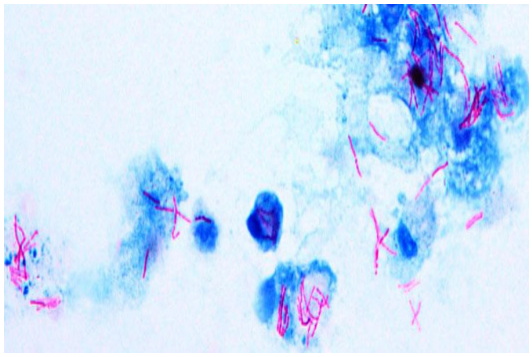


Рис. 2.46. *M. tuberculosis* (пофарбовано за Цілем-Нільсеном)

(Джерело: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/71/Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_02.jpg)

Серед збудників туберкульозу існують певні морфологічні відмінності. Зокрема, *Mycobacterium tuberculosis* представляє собою тонкі прямі і трохи зігнуті палички довжиною 2,5–3,5 та товщиною 0,3 мкм. У зв'язку з виразним поліморфізмом зустрічаються палички більшої довжини з потовщенням на кінці або досить короткі кокоподібної форми. Представники *Mycobacterium bovis* значно коротші і товстіші, клітини *Mycobacterium avium* характеризуються виразним поліморфізмом: поряд з типовими паличками зустрічаються видовжені ниткоподібні форми.

Виділення чистої культури. Оброблений за описаною вище методикою матеріал сіють у 5–10 пробірок з середовищем Левенштейна–Йенсена або Гельберга, Петраньяні, Мордовського, у гліцериновий МПБ, гліцеринову

картоплю тощо (рис. 2.47). Збудник культивують в аеробних умовах. Перші ознаки росту з'являються через два тижні і пізніше. На щільних середовищах *Mycobacterium bovis* через 20–60 діб утворюють дрібні кулясті колонії кольору слонової кістки. Колонії *Mycobacterium tuberculosis* – зморщені, сухі (R-варіант). Інколи зустрічаються гладенькі колонії S-варіанта. Представники *Mycobacterium avium* ростуть швидше і на 10–15-ту добу з'являються м'які, ослизлі, сірувато-білі або з жовтуватим відтінком колонії, які, зливаючись, утворюють суцільне нашарування.



Рис. 2.47. Ріст *Mycobacterium tuberculosis* на середовищі Левенштейна–Йенсена

(Джерело: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0a/TB_Culture.jpg)

Важливою ознакою, характерною для трьох видів туберкульозних бактерій, є їх здатність культивуватись на яєчних середовищах без саліцилату натрію, формуючи безпігментні колонії.

У гліцериновому МПБ, інших рідких середовищах *Mycobact tuberculosis* утворює на поверхні товсту складчасту плівку, тоді як *M. bovis* росте у вигляді тонкої, ніжної, сітчастої плівки. Поверхнева плівка *M. avium* спочатку суха, потім стає ослизлою. У всіх випадках бульйон залишається прозорим.

Відповідно до чинних нормативно-правових актів, непігментовані культури мікобактерій здатні рости при температурі 37–38 °С на яєчних середовищах без саліцилату натрію, утворювати колонії через 20 діб і більше при умові відсутності росту на звичайному МПБ, а також культури, що ростуть при температурі 37–45 °С на яєчних середовищах навіть при наявності саліцилату натрію через 10 днів і більше після посіву, підлягають дослідженню біологічним методом.

Пігментоутворюючі культури мікобактерій, які ростуть на спеціальних і простих середовищах з саліцилатом натрію при температурі 22 °С, вважають атиповими і в подальшому не досліджують.

У мікобактерій виявлено протеолітичні та цукролітичні ферменти, уреазу, ліпази, піразинамідазу та нітратредуктазу (табл. 2.22).

Під час диференціації мікобактерій туберкульозу від атипових мікобактерій найчастіше враховують здатність всіх мікобактерій продукувати каталазу, але мікобактерії туберкульозу продукують термолабільну каталазу (вона інактивується за температури 68 °С протягом 10 хв); інші виробляють

термостабільну каталазу. Фермент оксидазу виробляють тільки мікобактерії туберкульозу. Характерною ознакою *M. tuberculosis* є їх здатність виробляти нікотинову кислоту (ніацин), інші мікобактерії її не виробляють.

Таблиця 2.22. Диференціальні біохімічні ознаки бактерій роду *Mycobacterium*

Ознаки	*M. tuberculosis*	*M. bovis*	*M. microti*	*M. africanum*	*M. kansasii*	*M. avium*
Уреаза	+	+	+	+	+	–
Нікотинамідаза	+	–	+	+	+	+
Піразинамідаза	+	±	–	+	±	+
Нітратредуктаза	+	–	–	–	+	–
Синтез ніацину	+	–	+	–	–	–
Пігмент	–	–	–	–	Ф	–
Термостабільна каталаза	–	–	–	–	+	+

Умовні позначки: «+» – ознака позитивна, «–» – негативна, «±» – варіабельна, Ф – фотохромогенний.

У антигенному відношенні вид *M. tuberculosis* є однорідним (сероваріантів не виявлено) і близьким до виду *M. bovis.*

Біопроба. Суспензією патологічного матеріалу або виділеною культурою мікобактерій заражають кролів живою масою не менше 2 кг, морських свинок – 300–350 г і курей віком 150 діб, не менше. Слід зауважити, що культурами мікобактерій лабораторних тварин заражають з метою визначення типу збудника туберкульозу. їх відбирають з урахуванням передбачуваного типу збудника: якщо він виділений від ссавців, то заражають двох морських свинок, від птиці – двох курей. Морським свинкам матеріал уводять підшкірно в ділянці пахвини в дозі 1–2 $см^3$ або інтратестикулярно в дозі 0,2 $см^3$. Курей заражають у підкрильну вену.

Збудник туберкульозу людського і бичачого типів у морських свинок зумовлює розвиток генералізованого туберкульозу в період від 21 до 90 днів після зараження. Тварини швидко худнуть, на місці ін'єкції утворюється виразка, збільшуються пахвинні лімфовузли. При розтині загиблих або забитих морських свинок знаходять казеозні вогнища не лише у згаданих, айв інших лімфовузлах. В збільшених селезінці і печінці відмічають щільні сіруваті або жовтуваті вузлики.

Пташиний тип збудника у морських свинок зумовлює лише утворення на місці введення матеріалу абсцесу і збільшення пахвинного лімфовузла без розвитку змін у внутрішніх органах. Бичачий тип збудника у кролів при внутрішньовенному зараженні призводить до розвитку генералізованого процесу з утворенням дрібних туберкул у внутрішніх органах. Людський тип мікобактерій у кролів найчастіше не викликає змін. Інколи утворюються окремі вузлики в легенях або нирках. Пташиний тип у кролів зумовлює септичний процес, внаслідок чого тварини гинуть через 11-30 діб після зараження. Звертає на себе увагу значне збільшення селезінки.

Серологічні методи діагностики туберкульозу ґрунтуються на виявленні антитіл або антигенів Mycobacterium tuberculosis і включають ІФА та інші імунологічні реакції. Історично застосовувалися РЗК, РПГА, реакція преципітації та радіоімунний аналіз, однак у сучасній практиці їх використовують обмежено через недостатню чутливість і специфічність. Для підвищення точності досліджень у сучасних тест-системах застосовують моноклональні антитіла до антигенів мікобактерій.

***Завдання для самостійної роботи студентів**. Вивчити морфологічні, тинкторіальні та біохімічні властивості мікобактерій, факторами патогенності, методами лабораторної діагностики туберкульозу.*

Питання для самоконтролю

1. Біологічні властивості збудника туберкульозу.
2. Патогенетичні та імунобіологічні особливості туберкульозу.
3. Фактори патогенності мікобактерій туберкульозу.
4. Методи мікробіологічної діагностики туберкульозу.
5. Диференціація мікобактерій від умовно-патогенних і сапрофітних мікобактерій, а також диференціація видів збудника туберкульозу.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ЛЕПТОСПІРОЗУ

***Мета заняття:** ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями, антигенною структурою, резистентністю лептоспір та схемою лабораторної діагностики лептоспірозу.*

***Матеріали та обладнання.** Кров, сеча, спиртівки, маркери, сірники, штатив, мікроскоп з темним полем зору, центрифуга, центрифужні пробірки, ваги, сироваткове середовище на фосфатному буфері, середовище Уленгута, інактивована сироватка крові кроля або барана, фільтр Зейтца, пастерівська піпетка.*

Лептоспіроз – інфекційне захворювання багатьох видів тварин, яке характеризується перемінною гарячкою, жовтухою, анемією, гемоглобінурією, некрозами слизових оболонок і шкіри, абортами, народженням мертвого або нежиттєздатного приплоду. Хворіють лептоспірозом також люди.

Лептоспіри належать до родини *Leptospiraceae* порядку *Spirochaetales* і включають роди *Leptospira*, *Leptonema* та *Turneriella*, з яких основне медико-ветеринарне значення має рід *Leptospira*. Згідно з сучасною молекулярно-генетичною класифікацією, цей рід налічує понад 60 видів, які поділяють на три групи: патогенні, сапрофітні та проміжні (з невизначеною патогенністю). Важливе епізоотологічне значення має також поділ на серогрупи та серовари.

До основних патогенних видів роду Leptospira належать: *Leptospira interrogans, Leptospira borgpetersenii, Leptospira kirschneri, Leptospira noguchii, Leptospira santarosai, Leptospira weilii, Leptospira alexanderi, Leptospira kmetyi, Leptospira alstonii, Leptospira mayottensis*.

Найбільш епізоотологічно та клінічно значущими є: *Leptospira interrogans, Leptospira borgpetersenii, Leptospira kirschneri*.

Найпоширеніші серовари лептоспір: *Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippotyphosa*.

Патогенні і сапрофітні види різняться між собою. Наприклад, ріст патогенних штамів пригнічується пуриновим аналогом 8-азагуаніну, тоді як сапрофіти нормально ростуть за наявності цієї сполуки. Так само *L. biflexa*, на відміну від *L. interrogans*, може рости за низької температури навколишнього середовища (11–13 °С).

Згідно із серологічною класифікацією, лептоспіри поділяють на серовари на основі антигенної неоднорідності ліпополісахариду (О-антигену) клітинної стінки Leptospira. На сьогодні описано понад 300 сероварів, об'єднаних у серогрупи. Генетична класифікація лептоспір не збігається з серологічною, оскільки серовари однієї серогрупи можуть належати до різних видів. Незважаючи на це, серологічну класифікацію широко використовують у практиці, оскільки вона має важливе епізоотологічне та діагностичне значення.

Лептоспіри – звивисті мікроорганізми довжиною 7–15 і шириною 0,1–0,25 мкм, що мають центральну осьову нитку з «накрученою» навколо неї цитоплазмою (рис. 2.48). Кінці клітин зігнуті у вигляді гачків. Лептоспіри активно рухаються за рахунок скорочення осьової нитки, набувають С- або S-форми. Не утворюють спор і капсул, аероби, за Грамом фарбуються негативно.

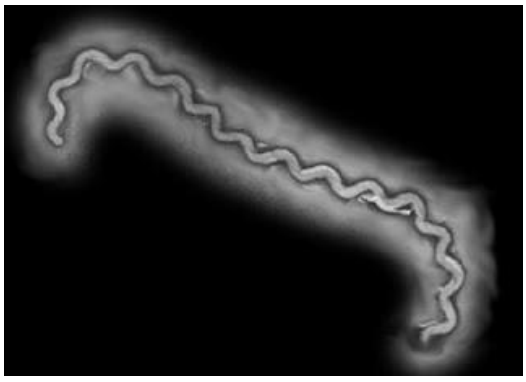


Рис. 2.48. Лептоспіра під електронним мікроскопом
(Джерело: https://studfile.net/html/48080/772/html_1Bu1bUKkFH.8eJx/img-GyJhtZ.jpg)

Діагностика лептоспірозу комплексна й основана на клініко-епізоотологічних, патологоанатомічних даних з обов'язковим проведенням лабораторних досліджень, які об'єднують бактеріологічні, серологічні та гістологічні методи.

Бактеріологічна діагностика захворювання поділяється на два етапи. На початку його виникнення при виразних клінічних ознаках застосовують бактеріологічний метод, який передбачає пряме виявлення лептоспір у патологічному матеріалі і виділенні культури збудника.

При переході хвороби в стаціонарну фазу та її згасанні діагностичне значення має серологічний метод.

Для бактеріологічного дослідження в лабораторію за життя тварин надсилають кров і сечу, які доцільно відбирати в момент підвищення температури. Трупи дрібних тварин відправляють цілими, від великих

відбирають шматочки паренхіматозних органів, серце, транссудат грудної і черевної порожнин, перикардіальну й спинномозкову рідини, сечовий міхур із вмістом. Дрібні абортовані плоди надсилають цілими, від великих відбирають паренхіматозні органи й перев'язаний шлунок.

Влітку матеріал доставляють у лабораторію не пізніше 6 годин і при умові охолодження – упродовж 10–12 годин. Враховуючи нетривале виживання лептоспір у сечі, її мікроскопують безпосередньо в господарстві.

Мікроскопія. Сечу досліджують безпосередньо після взяття. Сторонні частки видаляють центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 10 хв. Кров змішують з подвійною кількістю 1,5 % розчину лимоннокислого натрію, центрифугують при 2000–3000 об/хв. протягом 5 хв. і досліджують прозорий шар.

Із нирок і печінки на основі фізіологічного розчину готують суспензію, яку відстоюють у холодильнику 1–2 години і досліджують верхній прозорий шар. Від абортованих плодів відбирають усі внутрішні органи, з яких готують аналогічну суспензію.

Із досліджуваних матеріалів готують препарати типу «роздавлена крапля», які досліджують під мікроскопом за методом темного поля при збільшеннях 40х7–10 або 40х10–15. У кожному препараті необхідно продивитись не менше 50 полів зору.

Лептоспіри виявляють завдяки характерній формі і рухливості. Можна помітити сріблясті, спіралеподібні короткі нитки з потовщеннями на одному чи обох кінцях, які прямолінійно рухаються, обертаються, звиваються (рис. 2.49).

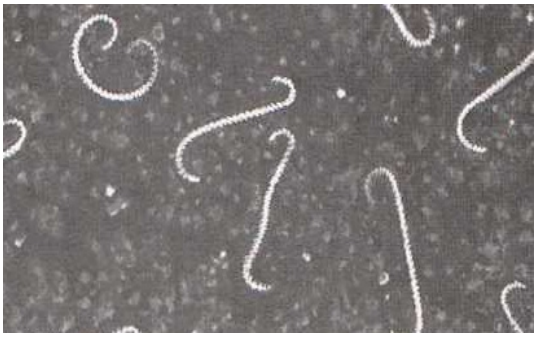


Рис. 2.49. Лептоспіри у темному полі мікроскопа

У сечі лептоспіри виявляють у кількості 1–2, рідше – 10–15 особин у полі зору. В інших матеріалах їх кількість аналогічна, проте в окремих випадках може бути 20–50 клітин і більше.

Лептоспіри слід відрізняти від ниток фібрину, уламків сперматозоїдів й спірилоподібних мікроорганізмів, а у кнурів – ще й від інтерспір.

Виділення чистої культури. З цією метою використовують спеціальні живильні середовища. Найчастіше застосовують сироваткове середовище на фосфатному буфері (до стерильного фосфатного буфера додають 5–10 % інактивованої сироватки крові кроля або барана, суміш фільтрують через фільтр Зейтца й розфасовують у стерильні пробірки); середовище Уленгута (у звичайну стерильну воду в об'ємі 5 мл додають 0,5 мл свіжої інактивованої сироватки крові кроля. Для перевірки на стерильність витримують у термостаті протягом 3–5 днів).

Для виділення лептоспір від хворих тварин в перші 5–7 днів від початку хвороби в момент підвищення температури із яремної вени беруть кров, яку сіють у пробірки з одним із середовищ (по 3–5 крапель). Із патологічного

матеріалу посів здійснюють пастерівською піпеткою, попередньо обробивши поверхню органа гарячим шпателем.

Засіяні пробірки культивують у термостаті при температурі 28–30 °С протягом 3 міс. Лептоспіри в процесі росту не змінюють живильні середовища і для їх вияву через 3, 5, 7, 10, а потім – через кожні 5 днів досліджують краплю середовища в темному полі мікроскопа. Виділені культури ідентифікують в реакції мікроаглютинації за допомогою лептоспірозних аглютинуючих діагностичних сироваток.

Ферментативна активність у лептоспір представлена ліпазами, ферментують високомолекулярні жирні кислоти. Лептоспіри не ферментують амінокислоти та вуглеводи, не утворюють каталазу й оксидазу. Основним джерелом азоту для лептоспір є солі амонію.

Антигенна структура лептоспір неоднорідна. Патогенні лептоспіри мають один полісахаридний антиген, на основі якого їх об'єднали в один вид – *L. interrogans.*

Біопроба. Виділити культури лептоспір можна не лише за допомогою живильних середовищ, а й шляхом зараження лабораторних тварин (золотисті хом'яки, кроленята, плямисті ховрахи, цуценята, морські свинки, білі миші).

Суспензією, приготовленою на основі фізіологічного розчину із паренхіматозних органів абортованого плода, кров'ю чи сечею, хом'яків заражають підшкірно або у черевну порожнину в дозі 0,5–1,0 мл, кроленят – у дозі 2–3 мл. Кожною пробою заражають дві тварини. Одну забивають на 4–5-й день після зараження, другу на 14–16-й день (за умови, що вона не загине). У піддослідних тварин вимірюють температуру тіла і в момент її підвищення беруть проби крові, які використовують для посіву й дослідження на наявність лептоспір у темному полі зору мікроскопа.

Від заражених тварин через кожні сім днів тричі беруть кров для серологічного дослідження. Позитивність біопроби підтверджується наявністю антитіл до одного з 13 серотипів лептоспір.

Серологічна діагностика лептоспірозу основана на виявленні специфічних антитіл у сироватці крові тварин за допомогою реакції мікроаглютинації – лізису (РМАЛ), рідше – реакції макроаглютинації. Компоненти РМАЛ – досліджувана сироватка крові, антигени у вигляді молодих культур лептоспір, фізіологічний розчин (електроліт).

Для постановки реакції придатні свіжі, консервовані, заморожені сироватки крові, які розводять фізіологічним розчином у концентрації 1:50, 1:250, 1:1250. Культури лептоспір, що використовуються як антигени, повинні бути віком 5–15 днів, без ознак спонтанної аглютинації, з концентрацією 70–100 лептоспір у полі зору мікроскопа.

Кожне розведення досліджуваної сироватки вносять мікропіпеткою (по 0,1 мл) у 5–13 лунок аглютинаційних пластин (залежно від кількості антигенів, що використовуються в реакції). Кожну культуру (по 0,1 мл) вносять у три лунки по вертикалі з різними розведеннями сироватки, при цьому розведення сироватки подвоюється (рис. 2.44).

0 0 0	0 0 0	0 0 0	–	розведення сироватки 1:50 по 0,1 мл
0 0 0	0 0 0	0 0 0	–	розведення сироватки 1:250 по 0,1 мл
0 0 0	0 0 0	0 0 0	–	розведення сироватки 1:1250 по 0,1 мл
1 2 3	4 5 6	7 8 9		

1-й вертикальний ряд – культура (антиген) L. *pomona*
2-й вертикальний ряд – культура (антиген) *L. conicola*
3-й вертикальний ряд – культура (антиген) *L. bataviae*

Рис. 2.44. Схема дослідження сироватки крові в РМАЛ з дев'ятьма антигенами лептоспір

Пластину декілька разів обережно струшують і витримують у термостаті при температурі 30 °С протягом години. Результати реакції враховують шляхом мікроскопії краплі суміші в темному полі. Якщо в досліджуваній сироватці будуть присутні антитіла до конкретного серотипулептоспір, то відбудеться аглютинація з утворенням характерних клубочків, «павучків» склеєних лептоспір, які починають розпадатись на окремі фрагменти (рис. 2.50).

Результат реакції оцінюють у хрестах за чотирибальною системою:
(++++) – аглютиновано і лізовано 100% лептоспір;
(+++) – 75% лептоспір;
(++) – 25% лептоспір;
(–) – аглютинація і лізис відсутні.

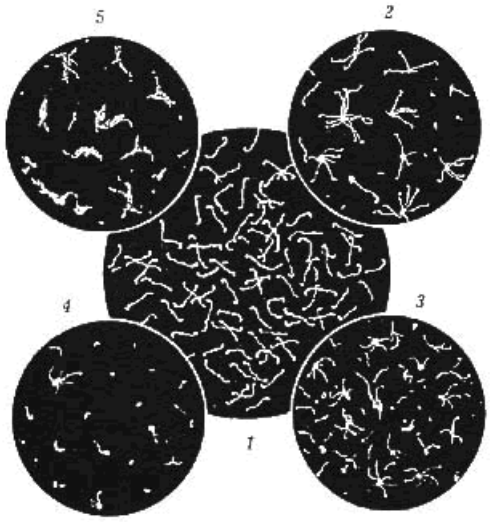


Рис. 2.50. Реакція аглютинації-лізису: 1 – негативна реакція; 2–5 – позитивна реакція (різна ступінь аглютинації і лізису)

В контрольних лунках, що містять фізіологічний розчин з культурою лептоспір, аглютинації не повинно бути.

Діагноз на лептоспіроз на основі даних РМАЛ ставлять тоді, коли в сироватці крові при одноразовому дослідженні виявляють антитіла (у титрі 1:100 і вище) більше, ніж у 25 % обстежених тварин. При повторному

досліджені через 7–10 днів у цих самих тварин наростання титру антитіл повинно бути у п’ять і більше разів.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Вивчити морфологію, культуральні, біохімічними властивості, антигенну структуру збудника лептоспірозу. Вивчити особливості відбору матеріалу, методи лабораторної діагностики лептоспірозу.*

Питання для самоконтролю

1. Назвіть збудники лептоспірозу у різних видів тварин.
2. Біологічні властивості лептоспір.
3. Як виявляють лептоспіри у патологічному матеріалі?
4. Які середовища використовують для культивування лептоспір?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА КАМПІЛОБАКТЕРІОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Мета заняття: *ознайомити студентів з основними видами кампілобактерій, морфологічними, тинкторіальними та біохімічними властивостями збудників, факторами патогенності та методами лабораторної діагностики.*

Матеріали та обладнання. *Термостат, спиртівки, маркери, штатив. спеціальні живильні середовища (напіврідкий м’ясо-печінково пептоновий агар, сафраніно-злізо-новобіоцинове середовище, середовище Кітта–Тароцці без олії, які збагачують дефібринованою кров’ю великої рогатої худоби, овець або кролів, екстрактом із сухих дріжджів та іншими компонентами), 1 % водний розчин основного фуксину, предметні скельця, стерильні чашки Петрі, набір фарб для фарбування за Грамом.*

Кампілобактерії вперше були виділені в 1906 р. у Великій Британії від викидня вівці. Спочатку кампілобактерії вважали вібріонами, згодом вони були віднесені до власного роду разом із *C. fetus* як типовим видом. До кінця 1970-х років стало відомо, що *C. jejuni* та *C. coli* часто є збудниками гострих ентеритів у людей.

Кампілобактеріоз (лат. *Campylobacteriosis*) – інфекційне захворювання переважно великої рогатої худоби, яке характеризується абортами в різні періоди тільності, високим процентом яловості (20–60 %), перегулами, катарально-вузликовими вагінітами і метритами, затримкою посліду. У овець спостерігають масові аборти, які не повторюються при наступному окоті.

Збудник *– Campylobacter foetus veneralis* з двома підтипами – *subspecies I* і *II, Camp, foetus intestinalis* – майже ідентичні бактерії типу вібріонів, які різняться між собою деякими морфологічно-культуральними й біохімічними ознаками (табл. 2.23).

Вібріони, що викликають кампілобактеріоз (вібріоз), мають форму коротких, зігнутих у вигляді коми або літери «S» паличок (рис. 2.51. а). Зустрі-

чаються також довгі спірили, які утворюються в результаті утримання зв'язків між окремими клітинами, що розділились. Величина збудника коливається в межах 1,5–7 х 0,3–0,5 мкм. Палички мають джгутик на одному чи обох кінцях (рис. 2.51. б), за Грамом фарбуються негативно, не утворюють спор і капсул.

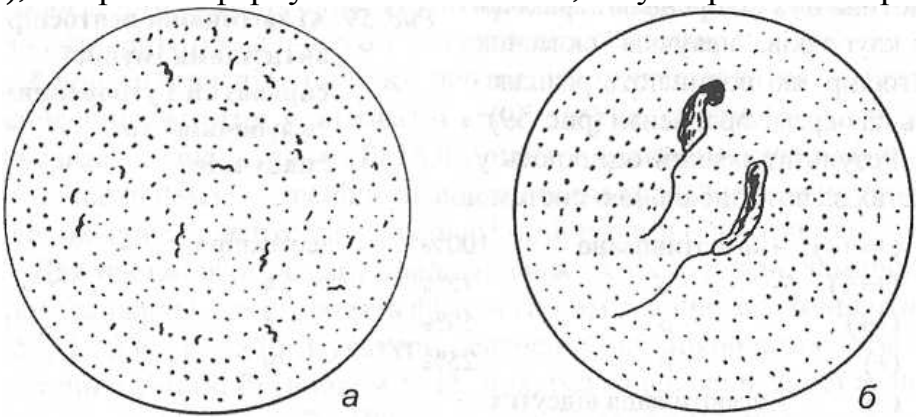


Рис. 2.51. *Campylobacter foetus*:
а – мазок із чистої культури; б – вібріони під електронним мікроскопом

Таблиця 2.23. Диференціація видів вібріонів, виділених від великої рогатої худоби

Вид і тип вібріона	Культурально-біохімічні властивості									Визначення типу моноспе-цифічними сироватками		
	Каталаза	Утворення H_2S		Ріст ПА					Редукція 0,2 % селеніту натрію на альбімі-агарі	*C. foetus veneralis*	*C. foetus intestinalis*	*C. bubulus*
		На МПБ	На ПЖА з 0,02 % цистіїну	з 0,15 % агару	з 0,5 % агару (уколом)	з 8–10 % жовчі	з 1 % гліцирину	з 3,5 % хлористого натрію				
Camp. foetus veneralis	+	–	±	Кільця під поверх-нею	Вгорі	+	–	–	–	+	–	–
Camp. foetus intestinalis	+ або	– ±	+	–		+	+	–	+	–	+	–
Camp. bubulus	–	+	+	Дифузний або кільце під по-верхнею	Ялин-кою по довжині уколу	–	+	+	+	–	–	+

Примітка. (+) – наявність росту, або позитивна реакція; (–) – відсутність росту, або негативна реакція; (±) – слабкий ріст, або сумнівна реакція.

Обидва види збудника утворюють каталазу, не змінюють лакмусове молоко, зумовлюють редукцію нітратів у нітрити, відрізняються за здатністю утворювати на різних середовищах сірководень і характером росту.

Патогенні вібріони відрізняють від сапрофітного виду *Camp, sputorum subsp. bubulus* за здатністю останнього виділяти на всіх середовищах сірководень без утворення каталази.

Бактеріологічна діагностика. Відповідно до діючої інструкції для бактеріологічного дослідження в лабораторію надсилають: від корів, нетелей і вівцематок – абортований плід з оболонками, частину плаценти виділення з родових шляхів; від великих плодів – голову, шлунок, печінку, легені, від бутаїв-плідників – препуційний слиз і сперму, секрет допоміжних статевих залоз; від тварин, забитих з метою діагностики – піхву, матку, лімфовузли тазової порожнини.

Патологічний матеріал доставляють у лабораторію якомога швидше, але не пізніше ніж через 6 годин після відбирання.

Для серологічної діагностики в лабораторію надсилають проби піхвового слизу, який відбирають стерильними тампонами від корів у період статевого спокою.

Мікроскопія. В мазках із патологічного матеріалу, забарвлених за Грамом, Романовським–Гімзою і розведеним 1:5 фуксином Ціля, вібріони мають форму коми або латинської літери “S”. У матеріалі, одержаному від тварин з хронічною формою хвороби, в особливо тих, яких лікували, збудник зустрічається у формі довгих спірил, малозвитих ниток і навіть дрібних коків (рис. 2.52).

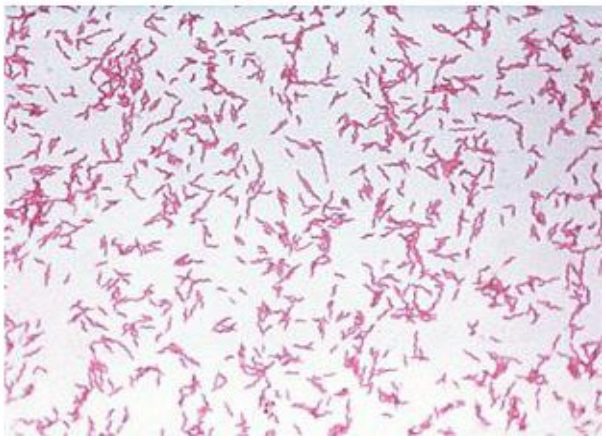


Рис. 2.52. Кампілобактерії у мазку з патологічного матеріалу, фарбування за Грамом

Виділення чистої культури. Чисту культуру збудника одержують за допомогою напіврідких і щільних живильних середовищ типу напіврідкого 0,15–0,2 % м’ясо-печінкового пептонного агару (ППА), сафраніно-залізо-новобіоцинового середовища (СЗН), звичайного МПА, середовища Кітт–Тароцці без олії, які збагачують дефібринованою кров’ю великої рогатої худоби, овець або кролів, екстрактом із сухих дріжджів та іншими компонентами.

Перед посівом рідкий матеріал рекомендують очищати центрифугуванням при 1000 об/хв. протягом 10 хв. або фільтрацією через мембранні фільтри № 5 – № 3 – № 5. Засіяні пробірки вміщують в ексикатор або мікроанаеростат, в яких 10–15 % кисню заміняють на вуглекислий газ і культивують у термостаті при температурі 37 °С протягом 6–10 днів.

Збудник кампілобактеріозу обох видів на напіврідкому агарі під поверхнею середовища не раніше як через 36–48 годин, інколи – на 6–10-ту добу утворює сірувато-блакитний диск товщиною 1–4 мм, причому середовище під і над диском залишається прозорим. При подальшому культивуванні диск поступово піднімається на поверхню.

На щільних середовищах у середньому через 73–96 годин вібріони утворюють дуже дрібні колонії з блакитно-сірим відтінком або суцільне аналогічне за кольором нашарування. S-форми колоній можуть переходити в R-форми через проміжні гладенько-скловидні й мукоїдні варіанти. Виділені культури вібріонів через два – три пересіви вже не потребують мікроаерофільного режиму і можуть культивуватись на напіврідких середовищах у звичайних аеробних умовах.

Біопроба. Нерідко з патологічного матеріалу одночасно з патогенними виділяються й непатогенні вібріони та інші види мікробів. Чисту культуру збудника вібріозу можна виділити двома методами: одержаною сумішшю мікробних культур в дозі 0,5 мл заражають у черевну порожнину або піхву вагітних морських свинок. З абортованих плодів можна виділити чисту культуру *Camp, foetus*. При відсутності аборту через 10–12 днів свинок забивають і роблять посіви із плодів та вмісту матки; мікробну суміш сіють на щільне середовище з наступним відсівом характерних колоній на напіврідке середовище.

Типізацію виділених культур здійснюють за допомогою вібріозної аглютинуючої моноспецифічної сироватки в РА, яку ставлять пробірковим і пластинчастим методами. Антиген для реакції готують із досліджуваних культур, які вирощують протягом 2–3 діб на спеціальному щільному середовищі, змивають формалінізованим (0,3 %) стерильним фізіологічним розчином, дворазово відмивають цим же розчином центрифугуванням при 3000 об/хв. і доводять за оптичним стандартом концентрацію до 1 млрд клітин в 1 мл.

В реакції використовують три моноспецифічні сироватки проти двох патогенних і одного непатогенного видів вібріонів. При постановці РА в пробірках готують розведення по 0,5 мл кожної сироватки на основі 3 % розчину хлористого натрію з додаванням 0,3 % формаліну (1:25, 1:50, 1:100, 1:200). В кожну пробірку вносять по 0,5 мл вібріозного антигену, вміщують у термостат при температурі 37 °С на 10–12 годин, після чого витримують при кімнатній температурі 3–4 години і оцінюють реакцію. Позитивна характеризується повним проясненням рідини й утворенням крихкого осаду, який при струшуванні розбивається на крупинки або пластівці.

Досліджувану культуру відносять до того серотипу, з сироваткою якого одержано позитивну реакцію в найвищому розведенні. РА на склі носить орієнтовний характер і ставиться за відомою класичною схемою.

Експрес-метод діагностики кампілобактеріозу ґрунтується на застосуванні імунофлуоресцентного методу, коли використовують відповідні люмінесціюючі сироватки двох видів: бівалентну – для виявлення *Camp, foetus subspecies I* серотипу і *Camp, foetus intestinales subsp. II* серотипу, а також моновалентну – для виявлення непатогенного виду.

Мазки готують із виділених чистих і змішаних культур, які обробляють діагностичними флуоресціюючими вібріозними сироватками. Вид виділеної культури визначають відповідно до використаної діагностичної люмінесцентної сироватки, яка здатна зумовити специфічне світіння мікробних клітин інтенсивністю не менш як на три хрести (виразна, достатньо яскрава зеленувата люмінесценція морфологічно типових клітин вібріонів з найбільш інтенсивним світінням їх по периферії).

Важливе діагностичне значення має метод імунофлуоресценції при дослідженні мазків безпосередньо з патологічного матеріалу. Якщо в препаратах, оброблених флуоресцентною бівалентною кампілобактеріозною сироваткою, вдається виявити типові для збудника вібріозу клітини, це дає підставу ставити позитивний люмінесцентний діагноз. У господарстві здійснюють комплекс лікувально-профілактичних заходів щодо одержання результатів бактеріологічних досліджень.

Серологічна діагностика кампілобактеріозу основана на використанні РА, РЗК і РДЗК. Серед цих реакцій найважливішою є реакція аглютинації з вагінальним слизом (РАВС). Останній відбирають стерильними тампонами, які потім уміщують в пробірку, додають 5 мл стерильного формалінізованого 3 % розчину кухонної солі й витримують протягом 13–14 годин при температурі 1–4 °С. Тампони віджимають пінцетом, одержану рідину центрифугують при 2500–3000 об/хв. і використовують як основний компонент реакції.

Екстракт вагінального слизу розводять у чотирьох пробірках. В першу і другу наливають по 0,5 мл екстракту, у другу, третю і четверту солі. Із другої пробірки після перемішування вмісту 0,5 мл вносять у третю, із третьої – в четверту, а з останньої 0,5 мл видаляють. У кожну пробірку додають по 0,5 мл кампілобактеріозного антигену в концентрації 1 млрд вібріозних клітин. Пробірки ретельно струшують, вміщують у термостат на 24 години при температурі 37 °С, витримують 3–6 годин при кімнатній температурі й оцінюють результати реакції.

Проводять контроль антигену: а) на спонтанну аглютинацію – до 0,5 мл робочого розведення антигену додають 0,5 мл формалінізованого 3 %-вого розчину кухонної солі; б) на активність – у чотири розведення, починаючи з 1:50, аглютинуючої кампілобактеріозної сироватки вносять по 0,5 мл антигену; в) на специфічність – у дві пробірки вносять по 0,5 мл нормальної сироватки в розведенні 1:100 та 1:20 і додають по 0,5 мл антигену.

РАВС оцінюють за чотирибальною системою у хрестах: (++++) – повне прояснення рідини з утворенням пухкого осаду, який розбивається на крупинки й пластівці; (+++) – до струшування рідина трохи каламутна, осад чітко сформований і розбивається на крупинки; (++) – рідина прояснена наполовину, осад незначний, розбивається на крупинки; (+) – незначне прояснення рідини

при наявності незначного осаду, який при струшуванні розбивається на пластівці; (–) – негативна реакція – рідина каламутна, осад у центрі пробірки має вигляд невеликого диску, який при струшуванні розбивається у рівномірну суспензію. Ті проби екстракту вагінального слизу, які дали реакцію на три або чотири хрести в усіх пробірках або лише в першій і другій, вважають позитивними, тобто такими, які містять антитіла до кампілобактеріозного антигену й походять від хворих тварин.

***Завдання для самостійної роботи студентів**. Вивчитио сновні види кампілобактерій, морфологічні, тинкторіальні та біохімічні властивості збудника, фактори патогенності та методами лабораторної діагностики кампілобактеріозу.*



Питання для самоконтролю

1. Як виявляють кампілобактерії у патологічному матеріалі?
2. Які середовища використовують для культивування кампілобактерій?
3. Які існують методи лабораторної діагностики при підозрі на кампілобактеріоз?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА САПУ

***Мета заняття:** ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями збудника Burkholderia mallei та методами лабораторної діагностики.*

***Матеріали та обладнання:** набір барвників для фарбування препаратів за методом Грама, фарба Романовського-Гімзи, синька Леффлера, бактеріальна культура Burkholderia thailandensis, предметні скельця, імерсійна олія, світлові мікроскопи.*

Сап (анг. *glanders*, лат. *malleus*) – інфекційна хвороба однокопитних тварин (коней, віслюків, мулів), переважно із хронічним перебігом, або іноді, за типом септикопіємії, у гострій формі. Хвороба триває від багатьох місяців до кількох років.

Характерними ознаками є лихоманка, утворення у внутрішніх органах, на слизових оболонках (особливо носової перетинки) та шкірі специфічних вузликів (гранульом), схильних до казеозного розпаду, що розпадаються та утворенням виразок. По локалізації патологічного процесу розрізняють сап легеневий, носовий і шкірний.

Стійкість збудника невисока: у воді та гниючих матеріалах бактерії зберігаються до 30 діб, у висушених носових виділеннях – до 15 діб, у сечі – 4 години. Сонячні промені руйнують бактерії через 24 години, нагрівання до 80 °С – через 5 хвилин. Дезінфекційні засоби надійно інактивують збудника сапу.

Епідеміологічні особливості. Сап є зоонозним захворюванням з контактним механізмом передачі інфекції, досить небезпечне для людини. У природніх умовах на сап хворіють однокопитні тварини: коні, віслюки, мули, лошаки, зрідка – верблюди. Основним д**жерелом збудника інфекції** є хворі коні та тварини з латентним перебігом сапу, які виділяють збудника, переважно, з носовим слизом та секретом шкірних виразок. Зараження, в основному, відбувається, внаслідок прямого попадання гною або слизу від хворої тварини на ушкоджену шкіру або слизову оболонку. Можливе зараження й аліментарним шляхом (інфіковані корми та вода), рідше, аерогенно, та в лабораторних умовах, але при цьому збудник потрапляє через мікроскопічні пошкодження слизових оболонок верхніх відділів травного або респіраторного тракту. Можливе передавання збудника при паруванні.

У людей сап вперше був описаний французьким науковцем П'єр Рейе. Збудника сапу віднесено до тих біологічних агентів, які офіційно визнано чинниками біологічної зброї. Найчастіше зараження має професійний характер – в осіб, пов'язаних з доглядом і лікуванням хворих тварин. Зараження від людини спостерігається зрідка. Сприйнятливість людей до сапу дуже висока. Імунітет не напружений і нетривалий. Хвороба характерна для певної частини Африки і Середнього Сходу.

Збудник хвороби - *Burkholderia mallei* (раніше *Pseudomonas mallei*). Рід – *Corynebacterium*, родина – *Brucellaceae*, вид – *Pseudomonas mallei* – дрібна, (1 – 5) – (0,3 – 0,8) мкм, пряма чи ледь вигнута із заокругленими кінцями паличка – поліморфна, іноді може бути ниткоподібної форми, нерухома, спор і капсул не утворює.

Морфологія і культуральні властивості. У мазках з патологічного матеріалу та поживних середовищ збудник часто має вигляд недовгих ланцюжків чи ниток, добре забарвлюється усіма аніліновими барвниками, за Грамом – негативно. У препаратах, забарвлених за Романовським-Гімзою або синькою Леффлера, прослідковується зернистість внутрішньої структури бактерії. Може виявляти біполярне забарвлення, що надає їй вигляд " шпильки".

Важливе зауваження: оскільки *B. mallei* має схожу морфологію з *B. pseudomallei*, для їхнього точного розрізнення часто потрібні додаткові молекулярні та біохімічні методи.

Burkholderia mallei повільно, але добре росте на поживних середовищах, особливо тих, що містять гліцерин (1 – 5%). Гліцерин сприяє посиленому росту бактерії. Аероб, на гліцериновій картоплі, збудник утворює слизисті колонії (М-форма) брунатно-жовтого або буро-коричневого відтінку (рис. 2.53).

Для виявлення колоній рекомендується інкубація щонайменше 72 години, оскільки ріст повільний, і їх можуть замаскувати швидкоростучі бактерії – контамінанти. На агарі з кров'ю, який містить гліцерин, колонії можуть бути сірувато-білими, округлими та слизовими, з напівпрозорим обідком.

У бульйоні з гліцерином бактерія може утворювати характерну слизову плівку на поверхні.

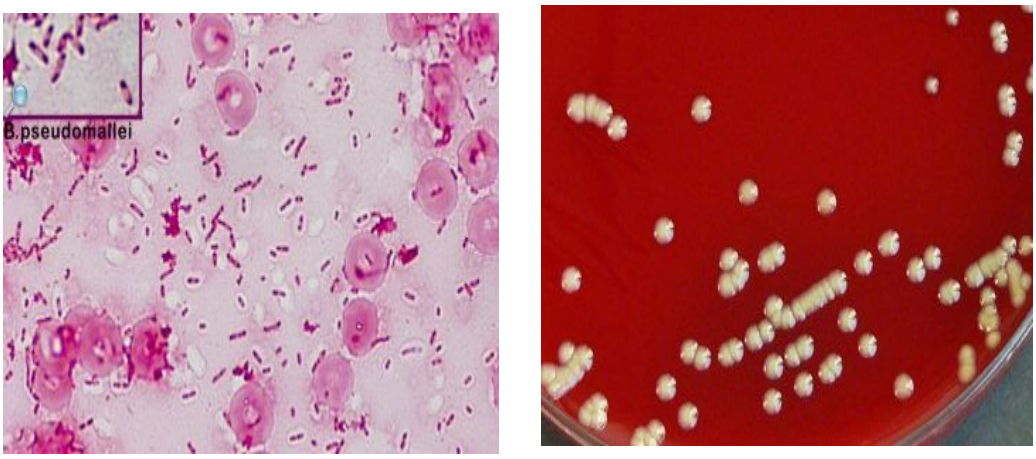


Рис. 2.53. Збудник сапу *Burkholderia mallei* під мікроскопом і на гліцериновому середовищі. *(Джерело: https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/obligate-aerobic-3/oxidase-positive-2/colistin-resistant-4/burkholderia-pseudomallei.html)*

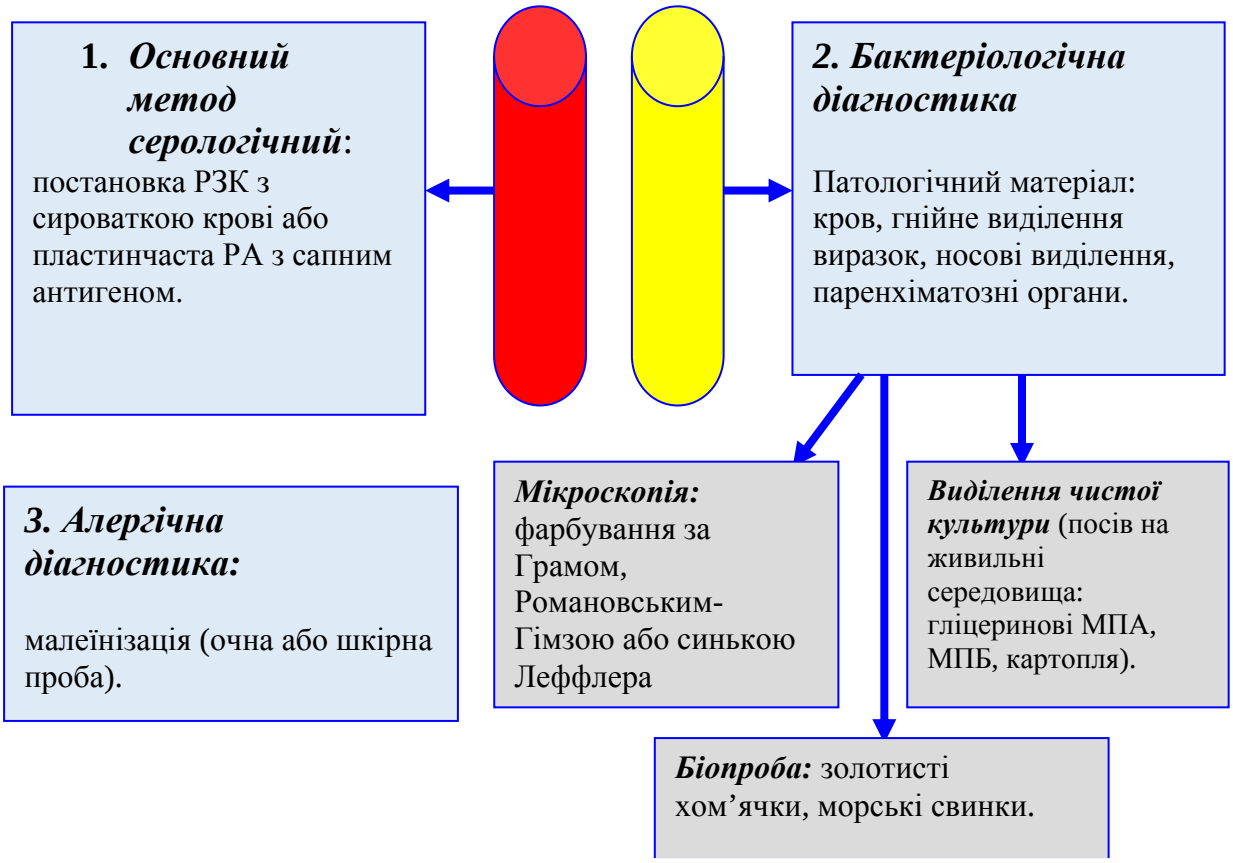


Рис. 2.54. Схема лабораторної діагностики сапу

Діагностика сапу здійснюється за відповідною схемою (рис. 2.54). При постановці діагнозу враховують клініко-епізоотичні показники, патологоанатомічні зміни, а також результати бактеріологічних, серологічних і алергічних досліджень.

Основний метод лабораторної діагностики на сап – *серологічний*, при якому досліджують сироватку крові в РЗК або ставлять пластинчасту РА із

сапним антигеном. На практиці, широко використовують алергічний метод, який базується на застосуванні малеїну.

Бактеріологічний метод діагностики сапу не має практичного значення, і проводиться не часто, оскільки він малонадійний.

Діагноз за гострого перебігу сапу, коли клінічні ознаки хвороби дуже характерні й виражені досить чітко, не викликає труднощів і може здійснюватися на підставі аналізу клініко-епізоотологічних даних.

При діагностиці сапу враховують епідеміологічні дані: контакт з хворими тваринами або, рідше, хворою людиною. З клінічних проявів інформативним є поява виражених запальних змін у ділянці вхідних воріт інфекції.

Діагноз на сап вважають встановленим у таких випадках:

- виявлення характерних для сапу змін у внутрішніх органах і тканинах;
- виділення культури із патологічного матеріалу з властивостями, характерними для збудника сапу;
- отримання позитивних результатів біологічного дослідження, навіть якщо культури збудника із вихідного матеріалу не виділена.

Відбір патматеріалу. Сап є особливо небезпечною інфекцією, тому відбір, транспортування та робота з матеріалом повинні проводитись із суворим дотриманням правил біобезпеки. У випадку особливої необхідності, в лабораторію, у запаяних стерильних пробірках, направляють необхідний патологічний матеріал:

- *за життя* тварин матеріалом для бактеріологічного дослідження є виділення з виразок, носа, кров, пунктати лімфатичних вузлів, гній з абсцесів;
- *після забою або загибелі* від тварин відбирають уражені ділянки внутрішніх органів, лімфатичні вузли, носову перетинку, трахею, бронхи, шматочки легень, печінки, селезінки, особливо з уражених ділянок.

Лабораторне дослідження на сап проводять у лабораторіях, які мають дозвіл на роботу із збудниками 3 та 4-ої груп патогенності (BSL-3, BSL-4). Дослідження матеріалу на сап коней у студентських лабораторіях **категорично заборонено**. Це вкрай небезпечно через високу заразність і летальність збудника для людей, а також через суворі вимоги до біобезпеки, які не можуть бути забезпечені в умовах навчальної лабораторії.

Причини заборони:

1. **Високий ризик зараження:** збудник сапу (*Burkholderia mallei*) може передаватися повітряно-крапельним шляхом і через шкіру (навіть без видимих пошкоджень), що становить смертельну небезпеку для лаборантів. Більшість випадків лабораторного зараження відбувається під час звичайної роботи з культурами, а не лише в результаті аварій.
2. **Загроза біотероризму:** через високу летальність і легкість передачі аерозольним шляхом, *Burkholderia mallei* віднесено до біологічних агентів першої категорії (Tier 1 Select Agents) і може використовуватися, як біологічна зброя. Це вимагає найвищого рівня контролю та безпеки.
3. **Необхідний рівень біобезпеки:** робота з *B. mallei* вимагає використання лабораторій з третім рівнем біобезпеки (BSL-3). Це спеціально обладнані та герметичні приміщення з підвищеними заходами захисту, які зазвичай відсутні

у звичайних навчальних закладах. Навіть у деяких діагностичних лабораторіях, що працюють на другому рівні біобезпеки (BSL-2), зразки, підозрілі на сап, одразу передають до лабораторій BSL-3.

4. **Відсутність лікування:** Хоча існують антибіотики, інфекція може призвести до смерті, навіть якщо її лікувати. Запобігання зараженню є найефективнішим методом контролю.

Мікроскопічне дослідження. Із патологічного матеріалу готують звичайні мазки, які фарбують за Грамом, Романовським-Гімзою або синькою Леффлера. Сапні бактерії поліморфні клітини, розміщуються окремо, парами або ланцюжками із 4 – 6 клітин, фарбуються зернисто (крім методу Грама).

Виділення чистої культури. Чисту культуру збудника сапу можна отримати тільки в разі гострого перебігу хвороби та із значними труднощами.

Ізоляцію збудника доцільно робити із цілісних вузликів. Рекомендують використовувати середовища з гліцерином типу МПГА, МПГБ, на які посів із патологічного матеріалу здійснюють пастерівською піпеткою й інкубують при температурі 37 – 38 °С в аеробних умовах.

На щільному середовищі через 24 – 48 год утворюються напівпрозорі, гладенькі, середні за величиною колонії кремового кольору з перламутровим блиском, які через деякий час зливаються в загальне ослизле нашарування. При тривалому культивуванні, колонії потовщуються і стають темно-коричневими і жорсткими. Бактерія також добре росте на гліцериновому картопляному агарі і у гліцериновому бульйоні. *У гліцериновому бульйоні* спостерігається помутніння, випадає сірувато-білий слизовий осад, який при струшуванні пробірки піднімається у вигляді полум'я свічки.

Ідентифікація виділеної культури. Вивчають морфологічні, культуральні й біохімічні властивості виділеної культури, сіючи на гліцеринову картоплю, молоко, середовище Гіса з глюкозою, лактозою, сахарозою, мальтозою, маннітом. В мазках із культури, вирішеної на МПГА знаходять короткі грамнегативні палички, часто ниткоподібної форми, в мазках із бульйону — короткі товсті палички.

Найбільш типовий ріст збудника сапу спостерігається на гліцериновій картоплі: через 48 – 72 год утворюються дрібні, напівпрозорі, із жовтуватим відтінком колонії, що після злиття формують «медовий» наліт, колір якого змінюється до буро-коричневого і навіть злегка червоного. Остаточну ідентифікацію виділеної культури здійснюють шляхом постановки РА на склі з сапною сироваткою, проте слід мати на увазі, що дана сироватка аглютинує не усі штами збудника.

В біохімічному відношенні мікроб малоактивний: желатину не розріджує, не утворює індолу, повільно коагулює молоко, лактозу і глюкозу ферментує до кислоти без утворення газу.

Біологічна проба. Біологічну пробу проводять на двох-трьох золотистих хом'яках або самцях морської свинки. Із патологічного матеріалу на основі фізіологічного розчину готують суспензію у концентрації 1:10, яку хом'якам вводять підшкірно в дозі 0,5 – 1 мл, а морським свинкам – у черевну порожнину в дозі 3 – 5 мл.

При наявності в досліджуваному матеріалі збудника сапу у хом'яків, через 3 – 4 дні, на місці ін'єкції утворюється абсцес і виразка. Тварини пригнічені, у них спостерігаються риніт, кон'юнктивіт, орхіт. Через 5 – 7 днів хом'яки гинуть. У самців морської свинки, розвивається гнійний орхіт (скротальний феномен Штрауса), і через 8 – 15 днів вони гинуть.

При наявності клінічних ознак хвороби, заражених лабораторних тварин забивають, із зразків внутрішніх органів, здійснюють посіви на живильні середовища.

Біопробу вважають позитивною у випадках, коли вдається виділити типову культуру хоча б від однієї із заражених лабораторних тварин, навіть за умови, що цю культуру не було виділено із патологічного матеріалу, а також при наявності характерних клінічних і патологічних ознак.

Серологічна діагностика (основний метод діагностики сапу).

Серологічна діагностика сапу охоплює постановку пластинчатої реакції аглютинації (РА) із сапним кольоровим антигеном або реакцію зв'язування комплементу (РЗК). Використовують також ПЛР, імуноферментний аналіз (ІФА) або вестерн-блот.

РЗК є найбільш чутливою, її проводять у динаміці методом парних сироваток крові. Реакція зв'язування комплементу (РЗК) ґрунтується на виявленні в сироватці крові хворих тварин специфічних антитіл Досліджувані сироватки розводять фізіологічним розчином у концентрації 1 : 5 та 1 : 10, інактивують у водяній бані протягом 30 хв при температурі 58 – 59 °С для коней і 62 – 63 °С – для ослів і мулів.

Реакцію ставлять за класичним варіантом, інтенсивність якої оцінюють в умовних позначеннях в хрестах – за чотирибальною системою. За діагностичний титр сироватки приймають розведення 1 : 10.

Облік реакції.

- при затримці гемолізу в цьому розведенні на (++++) і (+ + +) реакцію вважають *позитивною*,

- при інтенсивності реакції на (++) і (+) – *сумнівною* за умови, що в розведенні сироватки 1 : 5 спостерігають затримку гемолізу на (+ + + +) або **(+++)**.

РЗК доцільно ставити в період активізації сапного процесу, оскільки в хронічній стадії вона «виявляє» не більше 20 % хворих тварин.

Алергічна діагностика – проводять очну або підшкірну малеїнізацію.

Алергічну діагностику застосовують при масовому обстеженні коней на сап. При цьому, тваринам у кон'юнктивальний мішок *(очна проба)* вводять 3 – 4 краплі, дворазово з інтервалом 5 – 6 діб алергену малеїну (фільтрат вбитої нагріванням культури збудника сапу, вирощеної на гліцериновому МПБ).

Реакція організму тварини на алерген проявляється виділенням ексудату з кутка ока у вигляді своєрідного шнурка. Очна реакція настає через 2 – 3 год після введення малеїну і досягає повного розвитку через 6 – 8 год. Рідше спостерігають запізнілі реакції на 12 – 24-у годину, а іноді й пізніше. Тому перевірку очної реакції після першого введення малеїну проводять через 3 – 6 – 9 – 12 та 24 год.

Позитивна реакція – почервоніння і припухлість повік, слизово-гнійний кон'юнктивіт, що проявляється набряком кон'юнктиви, появою в очній щілині, по краю нижньої повіки значної кількості гною, що спускається у вигляді шнурка з внутрішнього кута ока.

Сумнівна реакція характеризується гіперемією та набряком кон'юнктиви, сльозотечою і незначним скупченням гною в куточку ока.

У разі *негативної реакції* спостерігається слабке почервоніння кон'юнктиви та незначна сльозотеча.

Застереження: в період обстеження, тварин звільняють від роботи, утримують на прив'язі, їм не можна згодовувати сухі корми, що містять багато пилу або плісняви. Очну пробу не можна проводити в разі наявності в обстежуваних тварин кон'юнктивіту чи іншої патології очей. У таких випадках проводять підшкірну малеїнізацію.

У частини коней з латентним перебігом сапу первинне введення малеїну не супроводжується добре вираженою алергічною реакцією, відбувається тільки сенсибілізація кон'юнктиви ока. Лише повторне введення малеїну в те саме око через 5 – 7 діб викликає яскраво виражену алергічну реакцію. Перевірку очної реакції після повторного введення малеїну проводять через 3 – 6 – 9 – 12 год за тими самими показниками, що й після першого введення.

Підшкірна малеїнізація. У разі підшкірної малеїнізації в обстежуваного коня впродовж доби тричі – вранці, вдень і ввечері – вимірюють температуру тіла. Результати всіх вимірів підсумовують і ділять на кількість вимірювань. Добуте число є показником середньої температури, яка не має перевищувати 38,5° С.

Малеїн вводять обстежуваній тварині в дозі 1 мл підшкірно в ділянці середньої третини шиї або підгруддя. Температуру починають вимірювати через 6 – 8 год після введення малеїну, далі – через кожні наступні 2 год упродовж 8 – 10 год, а потім на 24 і 36-у годину.

Перевірку підшкірної малеїнізації проводять за показниками температурної, місцевої та загальної реакції. У сапних коней *температурна реакція* починається з підвищення температури тіла через 6 – 8 год після введення малеїну і досягає максимуму через 12 – 16 год, утримується в межах високих показників упродовж 6 – 8 год, потім починає спадати.

Місцева реакція виражається в розвитку на місці введення малеїну гарячої, болісної, напруженої припухлості, яка досягає до 24 –36-ї години розміру 10 – 20 см у діаметрі. *Загальна реакція* характеризується пригніченням, втратою апетиту, прискоренням пульсу й дихання, фібрилярним скороченням м'язів, прискореним виділенням сечі та калу. В окремих тварин можуть спостерігатися кашель, вологі хрипи, виділення з носа, збільшення підщелепних лімфовузлів.

Реакцію вважають позитивною в разі, коли спостерігається типове підвищення температури до 40 °С і вище за наявності хоча б незначної місцевої реакції. Однаковою мірою реакцію вважають позитивною, коли є яскраво виражена місцева реакція і типовий розвиток температурної кривої.

Сумнівною реакцію визначають у тих випадках, коли температурна крива типова, але температура не підвищується понад 39,6 °С і місцева реакція вира-

жена слабко. Підвищення температури до 39 °С. за відсутності місцевої та загальної реакцій, вважають показником відсутності специфічної реакції на малеїн.

Підшкірний метод малеїнізації за діагностичною цінністю рівноцінний очній пробі, однак складний за технікою виконання і тому до нього вдаються зрідка, лише коли немає можливості провести очну пробу, або її показники не досить чіткі.

Диференційна діагностика передбачає необхідність виключення сепсису, меліоїдозу (несправжній сап), чуми, натуральної віспи, сибірки, фурункульозу, туберкульозу, а також миту від носової форми та епізоотичного лімфангіту від шкірної форми сапу.

Під час захворювання на мит, розвивається гнійне запалення слизової оболонки носової порожнини без утворення виразок, супроводжується абсцедуванням підщелепних лімфовузлів. Під час мікроскопічного дослідження гною виявляють збудника хвороби – *митний стрептокок*. У разі епізоотичного лімфангоїту в досліджуваному гною з виразок виявляють *криптококи*. В усіх сумнівних випадках проводять очну малеїнізацію коней. Малеїнізація нині, є найбільш чутливим надійним і достовірним методом.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Зважаючи на високу заразність і летальність збудника сапу для людей, а також через суворі вимоги до біобезпеки, які не можуть бути забезпечені в умовах навчальної лабораторії студенти:*

1. опрацьовують теоретичний матеріал за темою «Діагностика сапу» та проводять обговорення;

2. вивчають біологію збудника на модельних зразках мікроорганізмів, менш патогенних, але споріднених бактерій, наприклад Burkholderia thailandensis, готують препарати, фарбують за методом Грама, фарбою Романовського-Гімзи, синькою Леффлера;

3. проводять мікроскопію фіксованих (знезаражених) гістологічних зразків;

4. характеристику збудника за морфологічними, тинкторіальними властивостями коротко описують у зошиті.



Питання для самоконтролю

1. Основні біологічні властивості збудника сапу.
2. Назвіть методи діагностики сапу.
3 Які дослідження проводять при бактеріологічній діагностиці сапу?
4. Особливості серологічної діагностики сапу.
5. Особливості алергічної діагностики сапу.
6. Який алерген застосовують при масовому обстеженні тварин на сап?
7. Чому виконання ряду діагностичних робіт на сап можна проводити лише у спеціальних режимних лабораторіях?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ДИЗЕНТЕРІЇ СВИНЕЙ

Мета заняття: *ознайомити студентів з особливостями морфологічних, культурально-біохімічних властивостей збудника Treponema hyodysenteriae та методами лабораторної діагностики.*

Матеріали та обладнання. *Мікроскопи, імерсійна олія, предметні і покривні скельця, фільтрувальний папір, етиловий спирт, фарба Романовського-Гімзи, набір фарб для фарбування препаратів за методом Грама, фуксин Прейфера, фізіологічний розчин, фекалії свиней.*

Дизентерія свиней (лат. *Dysenteria bacterialis suum*) – висококонтагіозне інфекційне захворювання свиней, яке характеризується профузним проносом, часто з домішками крові та великою кількістю слизу у фекаліях (ознаки гострого катарального або катарально-геморагічного коліту), а також некротичними змінами в шлунково-кишковому тракті, переважно в шлунку та товстому відділі кишечника.

Дизентерію свиней також називають «кривавою діареєю». Хворіють, переважно свині старше 2 − 3-х місячного віку (на відгодівельному та фінішному етапах), викликаючи кров'янисті проноси, втрату апетиту, загальний стан виснаження та зменшення приростів, що призводить до значних економічних втрат у свинарстві. У більш ранньому віці поросята хворіють рідше. Для дизентерії характерна зимово-весняна сезонність.

Історична довідка. Дизентерія існує з тих пір, як людина почала займатися розведенням свиней, однак вона мала інші назви. Деякі автори описували цю хворобу під різними назвами: балантидіоз, вібріоз, спірохетоз, амебіаз, кривавий і чорний проноси, геморагічний ентерит тощо. Однак, дизентерію слід вважати специфічним інфекційним захворюванням шлунково-кишкового тракту, часто збудником якого є *Brachyspira hyodysenteriae (грам-негативна анаеробна спірохета.* Вперше під назвою «дизентерія» хвороба описана К. П. Дойлем в США в 1921 р. У наступні роки, її реєстрували майже у всіх країнах світу. У нашій країні, вперше хвороба була зареєстрована в 1938 р. *Збудник дизентерії* як *Treponema hyodysenteria* першим описав Д. Харріс (1972).

Основне місце існування брахіспіри – слизова оболонка товстого кишечника. При виникненні оптимальних умов для розмноження, як правило при запаленні кишечника, швидко заселяє тонкий відділ.

У більшості випадків дизентерія ускладнюється кампілобактеріями, фузобактеріями, лістеріями, клостридіями, ешерихіями і деякими іншими мікроорганізмами, що слід враховувати при діагностиці хвороби. Таким чином, дизентерію можна розглядати, як поліетіологічне захворювання, основним збудником якого є T. hyodysenteriae.

Збудник захворювання. Основний збудник хвороби – бактерія ***Brachyspira hyodysenteriae*** **(раніше *Borrelia hyodysenteriae*)**, а також інші види, як-от *B. hampsonii* і *B. suanatina*. *Brachyspira* – це рід бактерій, що належать до типу *Spirochaetota*. Види *Brachyspira* включають патогени у свиней, птахів, собак і людей.

Морфологія і біохімічні властивості. *Brachyspira hyodysenteriae* – грам-негативна анаеробна спірохета, належить до звивистих форм мікроорганізмів – аскаридоподібного типу з 2 – 6 плавними вигинами із загостреними кінцями. Завдяки такій формі вона здатна здійснювати обертальні рухи. Кількість завитків залежить від довжини клітини й коливається в межах від 3 – 4 до 8 – 12. *Brachyspira hyodysenteriae* не утворює спор і капсул, активно рухається за допомогою центральної осьової нитки. Величина збудника 0,3 – 0,4 х 8 – 10 мкм. Можуть зустрічатись великі (до 20 мкм) й дрібні (до 8 мкм) форми спірохет шириною 0,1 мкм.

Збудник ферментує вуглеводи (глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу), виділяє індол, не утворює каталази, оксидази, лецитинази, уреази і сірководню, не розріджує желатину й не редукує нітрати в нітрити.

Відбір патматеріалу. Для прижиттєвої діагностики в лабораторію, з прямої кишки хворих тварин відбирають фекалії, для посмертної – слизову оболонку великої ободової та сліпої кишок загиблих.

Проби фекалій беруть стерильним ватним тампоном на паличці з прямої кишки з глибини 7 – 8 см. Поміщають у пробірку з 8 – 10 мл фізіологічного розчину. Відібрані матеріали транспортують у лабораторію в термостатах з льодом й досліджують протягом 2 – 4 год, а в умовах холоду – протягом 6 – 8 год.

Діагностика комплексна, базується на: епізоотологічних даних та клінічних ознаках (діарея з кров'ю і слизом), патологоанатомічному дослідженні, лабораторних аналізах (зокрема, ПЛР-діагностика, для виявлення ДНК збудника), мікроскопічних і люмінесцентно-серологічних дослідженнях (РІФ) (рис.2.55).



1. Клінічні ознаки (кровава, слизиста діарея)
2. Посмертні зміни (коліт, кров'янистий і слизистий ексудат)
3. Лабораторні дослідження (мікроскопія…..)

Рис. 2.55.Тріада доказів, яка дозволяє підтвердити діагноз дизентерії свиней

Джерело:https://www.3trzy3.pl/artyku%C5%82y/wyzwania-zwi%C4%85zane-z-%C5%82agodnymi-szczepami-brachyspira-hyodysenteriae_5713/

Лабораторна діагностика. Лабораторне дослідження на дизентерію зводиться переважно до виявлення спірохет у патологічному матеріалі шляхом його мікроскопії. Із слизової оболонки кишечника і фекалій окремо готують суспензію на фізіологічному розчині, а з неї – препарати типу «роздавлена

крапля». При бактеріологічних дослідженнях використовують темнопольну, фазово-контрастну мікроскопію або мікроскопію забарвлених препаратів із вмісту товстого кишечника або його слизової оболонки.

В позитивних випадках в одному полі зору знаходиться 5 – 10 і більше середніх і великих спірохет у вигляді рухливих звивистих ниток з гострими кінцями.

Стаціонарні мазки із суспензії патологічного матеріалу фіксують етиловим спиртом, фарбують за методами Романовського-Гімзи, Грама або фуксином Пфейффера. В таких препаратах спірохети зберігають характерну форму, фарбуються відповідно у блідо-синій і червоний кольори. Діагноз вважають встановленим при виявленні в мазках спірохет характерної форми (більше 5 у полі зору і позитивному результаті РІФ (рис. 2.56).

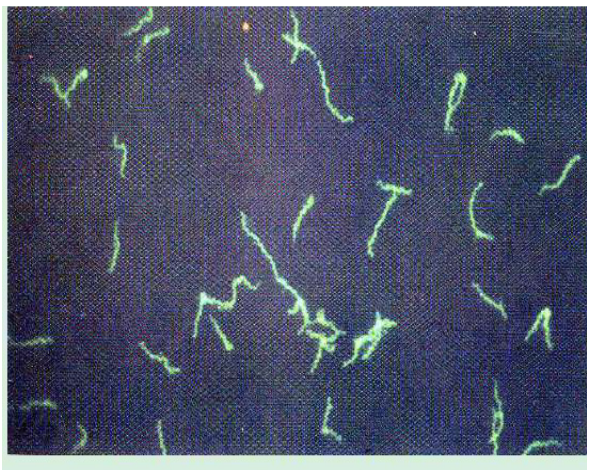


Рис. 2.56. Brachyspira hyodysenteriae (РІФ – позитивний результат).
(Джерело:https://svitppt.com.ua/medicina/patogenni-spiroheti-riketsii.html)

Культивування. *Brachyspira hyodysenteriae* анаероб, однак в лабораторних умовах збудник дизентерії свиней культивується погано, тому вирощування культури на поживних середовищах зазвичай не проводять.

За потребою проведення культивування збудника, кращим живильним середовищем для спірохет є триптикозо-соєвий перевар (ущільнене середовище), до якого додають 10 % свіжої дефібринованої крові барана або великої рогатої худоби. На такому середовищі спірохети утворюють дуже дрібні (0,1- 0,2 мкм), прозорі, плоскі, з рівними краями колонії ослизлої консистенції або формують дуже тонке, ніжне суцільне нашарування.

В мазках із колоній спірохети є малорухливими, короткими, із загостреними кінцями, в окремих колоніях зустрічаються тонкі, змієподібні, довгі, із загостреними кінцями форми.

В процесі культивування спірохет на напіврідкому триптикозо-соєвому агарі було встановлено їх високу чутливість до тіамуліну, трихополу, диметридазолу, ранідазолу, лінкоміцин, пеніциліну, феноксиметилпеніциліну, ампіциліну, фуразолідону, діарексу.

Є окремі повідомлення про успішне виявлення спірохетоподібних мікроорганізмів в мазках із підслизового шару товстих кишок хворих на дизентерію свиней методом імунофлуоресценції. Перспективною в діагностиці захворювання є реакція аглютинації.

Диференційна діагностика від КЧС (класичної чуми свиней), сальмонельозу, кормового отруєння та ентеровірусної інфекції.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти готують препарати типу «роздавленої краплі», досліджують у темному полі мікроскопа; фіксовані мазки, фарбують за методом Грама, Романовського-Гімзи і фуксином Прейфера, проводять мікроскопію та ідентифікацію збудника. Зарисовують та описують морфологічні ознаки збудника в альбом.*



Питання для самоконтролю

1. Визначення дизентерії свиней як захворювання.
2. Збудник хвороби та його біологічні властивості.
3. Які мікроорганізми супроводжують дизентерію свиней?
4. Схема лабораторної діагностики за дизентерії свиней.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА МІКОПЛАЗМОЗІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями мікоплазм та методами лабораторної діагностики мікоплазмозів.*

Матеріали та обладнання. *Музейні готові фарбовані мікропрепарати мікоплазм, культури сапрофітних мікоплазм на щільному середовищі у чашках Петрі (модельний організм для вивчення мікоплазм Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma bovis), мікроскопи, лупа, імерсійна олія, атлас, схема дослідження матеріалу на мікоплазмоз.*

Мікоплазми – це мікроорганізми, які займають проміжне положення між бактеріями та вірусами. Назва «мікоплазми» походить від грецького слова *mykos*, що означає «м'який». Вони не мають ригідної клітинної стінки, мають м'яку оболонку (*mollicutes* – «ніжна шкіра»). Мікоплазми можуть бути паразитами або сапрофітами.

Рівень біобезпеки. Робота з патогенними мікоплазмами зазвичай вимагає лабораторій біобезпеки рівня 2 (BSL-2). Хоча цей рівень є більш доступним, ніж BSL-3 для сапу, він вимагає суворого дотримання протоколів, використання засобів індивідуального захисту (рукавички, халати, захист обличчя) та проведення маніпуляцій у боксах біологічної безпеки.

Таксономія патогенних мікоплазм. Домен – *Bacteria*, відділ – *Firmicutes*, клас – *Mollicutes*, ряд – *Mycoplasmatales*, *родина – Mycoplasmataceae*, рід – *Mycoplasma.*

Родина *Mycoplasmataceae* представлена двома родами: *Mycoplasma (*понад 100 видів мікоплазм) та *Ureoplasma* (близько 10 видів мікоплазм). Мікоплазми, як представники відділу *Firmicutes*, класу *Mollicutes* мають багато відмінностей від решти прокаріотичних бактерій.

Мікоплазми виявлені в ґрунті, стічних водах, на різних субстратах в організмі тварин і людини. Вони дуже специфічні по головному господарю,

деякі інфікують тільки окремі види птиці, тим часом, як деякі інші інфікують декілька видів птиці, тварин, рослин, а також людей.

Етіологію захворювання, спричиненого мікоплазмами (плевропневмонію великої рогатої худоби) вперше вивчав Л. Пастер. Лише у 1893р. Е. Нокар і Е. Ру отримали культуру збудника плевропневмонії і довели, що збудник плевропневмонії може розвиватися на складних живильних середовищах, які не містять клітин культур тканини, а У. Ельфорд за допомогою спеціальних фільтрів, визначив розміри цього мікроорганізму.

Існує понад 100 видів мікоплазм, серед яких є патогенні і непатогенні види. 14 видів мікоплазм поширені в людській популяції і можуть спричиняти інфекційні захворювання у людини, вражаючи, найчастіше, дихальну та сечостатеву системи. В інфекційній патології тварин і людини головним чином мають значення такі види: *Mycoplasma pneumoniae, M. hominis, M. genitalium, M. bovigenitalium, M. bovirhinis, M. agalactiae, M. gallisepticum, M. suipneumoniae, Ureaplasma urealyticum/parvum.*

Мікоплазми (плевропневмонієподібні організми (ПППО), *Pleuropneumoniae like Organisms – PPLO),* відіграють певну роль в інфекційній патології сільськогосподарських тварин. Захворювання реєструють серед великої рогатої худоби, свиней, кіз та птиці. Інфекційний процес може перебігати в гострій, хронічній або латентній (безсимптомній) формі. Спостерігаються катаральне запалення верхніх дихальних шляхів, пневмонія, кератокон'юнктивіт, полісерозит, артрит, ендометрит, мастит, аборти, народження нежиттєздатного приплоду. Можливі як поодинокі, так і групові спалахи захворювання.

Морфологія. Мікоплазми, це – найдрібніші прокаріоти, розмірами 0,3 – 0,8 мкм, виключно поліморфні мікроорганізми (крім звичайних овоїдних клітин, мають паличко-, спірале-, ниткоподібні, зірчасті, гіллясті та інші форми), грам негативні (за винятком спіроплазм). Краще забарвлюються фарбою Романовського-Гімзи. Нерухомі, спор не утворюють (рис. 2.57).

Мікоплазми мають певні особливості, які відрізняють їх від бактерій і вірусів. На відміну від бактерій у них відсутня ригідна клітинна стінка (замість якої є лише пластична тришарова цитоплазматична мембрана завтовшки 7,5 – 10 нм, а отже, нечутлива до деяких груп антибіотиків). Подібно до бактерій, процес розмноження відбувається шляхом бінарного поділу, деякі види здатні брунькуватися. Мають здатність рости на безклітинних поживних середовищах. На пізній фазі росту утворюються ланцюжки кокоподібних тілець.

Подібно до вірусів, мікоплазми, здатні проходити через бактеріальні фільтри. На відміну від вірусів, у цитоплазмі є ДНК і РНК, рибосоми та інші клітинні компоненти, в яких наявний холестерин.

Культивування, поживні середовища для мікоплазм. Через відсутність клітинної стінки мікоплазми є вибагливими до поживних речовин і потребують спеціальних середовищ, які містять сироватку крові, дріжджовий екстракт та інші компоненти. Більшість видів мікоплазм – факультативні анаероби, але зустрічаються й аероби. Для їх росту необхідні білки, стерини, фосфоліпіди, глікопротеїди (муцин), вуглеводи, вітаміни, а також пуринові і піримідинові основи. Патогенні види потребують сироватки крові ссавців.



Рис.2.57. Мікоплазма під мікроскопом
(Джерело: https://lapkins.ru/p/mikoplazmoz-u-koshek/)

Частіше спеціальні живильні середовища готують на основі хоттингерівського ферментативного гідролізату тканин серця великої рогатої худоби та мартенівського – стінки шлунку свині. При культивуванні більшості патогенних мікоплазм у живильне середовище вносять 10 – 20% сироватки крові коня, вівці чи іншої тварини, екстракт з дріжджів тощо. Додавання до живильного середовища холестеролу або інших стеролів, екстрактів дріжджів прискорює ріст мікоплазми. Вони можуть культивуватись і в середовищах, в яких немає сироватки крові, але при наявності 0,02 % гемоглобіну й 0,01 % цистеїну.

Мікоплазми добре розмножуються в хоріоналантоїсній оболонці курячих ембріонів, що розвиваються (5–7 добові ембріони), крім цього, можна культивувати їх і в клітинних культурах.

Спеціальні середовища. SP4-середовище: високоефективне середовище, збагачене настоєм з яловичого серця, пептоном, дріжджовим екстрактом, сироваткою фетального бика та іншими компонентами. Може містити уреазу для диференціації уреаплазм.

PPLO-середовище: застосовується для культивування мікоплазм (*Pleuropneumonia-like organisms*) і уреаплазм.

Модифіковані середовища Фрайса, Фрея і Хейфліка: складні середовища, що використовуються для тестування мікоплазм у фармацевтичній промисловості.

Середовища для конкретних видів: деякі види мікоплазм, як-от *Mycoplasma pneumoniae,* мають особливі вимоги. Для їх ізоляції застосовують двофазне середовище з глюкозою та індикатором феноловим червоним.

Швидкість росту: мікоплазми ростуть дуже повільно, тому для отримання результатів може знадобитися до двох тижнів або навіть довше.

• *На щільних поживних* середовищах мікоплазми формують характерні круглі, дрібні колонії – колонії у формі "смаженого яйця". Це класична форма колоній мікоплазми. Колонії мають щільний непрозорий центр, який глибоко вростає у середовище, і плоску, прозору периферійну зону, що знаходиться на поверхні. Периферійна частина тоненька з ніжним ажурним краєм, за формою нагадують «яєчню». Через 3 – 5 діб інкубації вони іноді стають крупними (1,5 – 2 мм). Часто колонії мікоплазм на агарі настільки малі (50–500 мкм), що їх не видно неозброєним оком. Для їх виявлення потрібен мікроскоп.

• Типові колонії мікоплазм невеликі, дрібні (0,1 – 1 мм), гладенькі, округлі, трохи плоскі, окремі клітини змінюються в розмірі від 0,2 до 0,5 мм. Більшість мікоплазм утворює безбарвні прозорі колонії, проте є й такі, що формують колонії з коричневим відтінком. (рис. 2.58).

Деякі види мікоплазм, зокрема *Mycoplasma hominis*, можуть рости на кров'яному агарі, але більшість потребує спеціальних поживних середовищ. *На кров'яному агарі* навколо колоній є зона гемолізу.

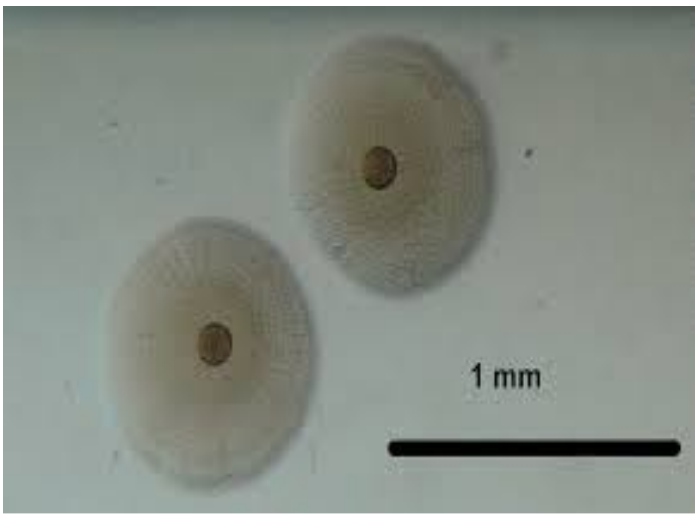


Рис. 2.58.Колонії мікоплазм на щільному середовищі
(*Джерело: https://micropspbgmu.ru/downloads/*)

У рідкому середовищі ріст мікоплазм проявляється від ледь помітної опалесценції, до інтенсивного помутніння. Деякі мікоплазми утворюють на поверхні бульйону тоненьку плівку, інші – дрібнозернистий осад або слиз.

Більшість патогенних для людини та тварин видів мікоплазм, належать до мезофілів, тому їх культивують при температурі 36 – 37 °С (крайні границі 22 – 41 °С) на живильних середовищах, в яких pH 7 – 8, що містять сироватку крові. Крім мезофілів зустрічаються, як психрофіли, так і термофіли. Представники роду термоплазм потребують іншого pH середовища – найкраще розвиваються при pH 1 – 2.

Ферментативні властивості. Процеси метаболізму у мікоплазм дуже варіабельні. Протеолітичних властивостей вони не мають, хоча відомо декілька видів, які розріджують желатин і згортають сироватку крові; більша частина штамів ферментує глюкозу, деякі з них утворюють аргіназу і фосфатазу.

Токсиноутворення. Із мікоплазм виділено гемолізин і термостабільний ендотоксин.

Резистентність. Більшість штамів мікоплазм термолабільні, гинуть при температурі 45 – 55 °С протягом 10 – 15 хв. Надзвичайно чутливі до висушування. Чутливі до більшості дезінфікуючих речовин. Під дією сучасних миючих засобів (мила, мильні порошки) мікоплазми гинуть. Стійкі до сульфаніламідних препаратів і особливо антибіотиків пеніцилінового ряду.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА РЕСПІРАТОРНОГО МІКОПЛАЗМОЗУ ПТИЦІ

Респіраторний мікоплазмоз птиці – це хронічне, зоонозне інфекційне захворювання дихальних шляхів, яке найчастіше викликається бактерією *Mycoplasma gallisepticum* (MG). У курей воно також відоме як хронічна респіраторна хвороба. Характеризується, переважно, ураженням органів дихання (бронхів і легень), можливим пошкодженням плеври, шкіри, репродуктивних

органів і тканин. Захворювання завдає значних економічних збитків у птахівництві, оскільки призводить до зниження продуктивності та погіршення якості м'яса.

Птахи є природними носіями 24 видів мікоплазм (людину інфікують 11 видів). Основними збудниками мікоплазмозної інфекції у птиці є: *Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, M. meleagridis, M. iowae, M. anceris, M. falconis, M. gallinaceum, M. gllycophilum, M. gallopavonia, M. pullorum, M. imitans, M. gallinarum та інші*. Усі ці мікоплазми вражають у птиці дихальні шляхи, суглоби та репродуктивні органи.

Серед птиці, найбільш розповсюдженим є респіраторний мікоплазмоз *(Mycoplasmosis respiratoria avium*). Більш сприйнятливі кури (респіраторний мікоплазмоз курей) та індики (інфекційний синусит індиків), менш сприйнятливі – фазани, цесарки, голуби та інші види птиці. Хворіють усі вікові групи птиці, але частіше молодняк 2–4-х місячного віку. Характерною особливістю респіраторного мікоплазмозу птиці є вірогідність виникнення хвороби без занесення збудника із зовні, коли під дією різних несприятливих факторів (скупчене утримання, транспортування, переохолодження, неповноцінна годівля, щеплення різними живими вакцинами), у здорових курей – мікоплазмоносіїв може відбуватися зниження природної резистентності організму і перехід безсимптомної інфекції в клінічно виражене захворювання.

Морфологія збудника. Збудник – *Mycoplasma gallisepticum* – найменший поліморфний серед відомих видів мікоплазм, належить до умовно-патогенних мікроорганізмів, відкритий Нільсоном (1936). Дуже поширений у природі, локалізується, в основному, на слизовій оболонці верхніх дихальних шляхів здорової птиці, навіть у вільних від мікоплазмозу птахогосподарствах.

Як і усі мікоплазми, *Mycoplasma gallisepticum* поліморфна, буває коко- або паличкоподібної форми, грамнегативна, за Романовським-Гімзою забарвлюються у фіолетовий колір (рис. 2.59).

Діагностика респіраторного мікоплазмозу вимагає комплексного підходу:

Клінічні ознаки: Огляд птиці для виявлення характерних симптомів.

Патологоанатомічний розтин: Дозволяє виявити патологічні зміни в органах дихання, такі як запалення трахеї, бронхів і повітреносних мішків.

Лабораторні дослідження:

ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція): Найбільш чутливий і специфічний метод, що дозволяє виявити генетичний матеріал збудника (ДНК).

Імуноферментний аналіз (ІФА): Виявлення антитіл до *Mycoplasma gallisepticum* у сироватці крові.

Бактеріологічний посів: Виділення та ідентифікація мікоплазми з уражених органів.

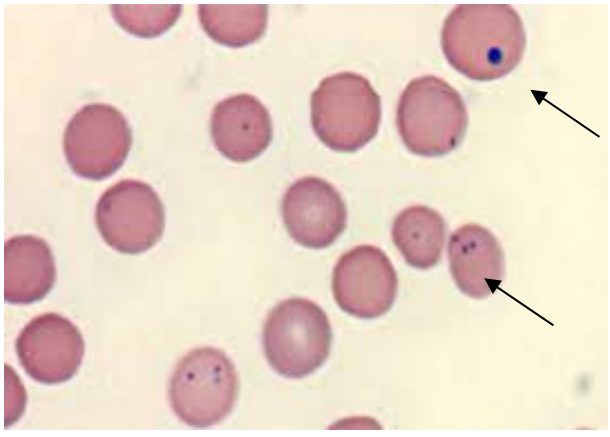


Рис. 2.59 Мікоплазми (мазок із культури фарбований за методом Романовського-Гімзи). (*Джерело: https://uk.wikipedia.org/wiki/*

У сумнівних випадках проводять гістологічні дослідження.

Для диференційної діагностики одночасно проводять дослідження на збудники, які викликають схожу інфекцію (кишкова та гемофільна палички, аспергільоз, інфекційний ларинготрахеїт, пастерельоз, інфекційний бронхіт, віспа, реовірусна інфекція).

Бактеріологічна діагностика. У лабораторію надсилають свіжі трупи птиці. Залежно від клінічних ознак та ступеня ураження, зразками для ізоляції збудника мікоплазмозу можуть бути: мазки з органів або тканин, ексудати, розведені гомогенати тканин, аспірати від очноямкових синусів або суглобових порожнин, матеріал з яєчного жовтка або ембріонів.

Мікроскопія. Для бактеріоскопії готують фіксовані мазки чи мазки-відбитки, фарбують за методом Грама і обов'язково за методом Романовського-Гімзи. Як і усі мікоплазми, *Mycoplasma gallisepticum* мають коко- та паличкоподібні форми, грамнегативні, за Романовським-Гімзою забарвлюються у синій колір. В мазках з патологічного матеріалу мікоплазми знаходяться у вигляді поліморфних сферичних чи кільцеподібних мікрококів розміром 500–800 нм, що розміщуються поодинці, парами, скупченнями.

У процесі вирощування на живильних середовищах з'являються кільце-, шароподібні та інші клітини, величина яких коливається в межах 0,07 – 1,40 мкм

Виділення чистої культури. Mycoplasma gallisepticum розмножуються на спеціальних живильних середовищах із сироватками крові великої рогатої худоби або птахів та екстрактами дріжджів. Культивуються також у жовтковому мішку 9 – 10-денних курячих ембріонів та клітинних культурах.

З перелічених зразків тканин готують суспензію на ізотонічному розчині кухонної солі (1 : 10). До неї додають 500 ОД/мл пеніциліну та ацетат талію (до концентрації 1:2000 – 1:4000). Суспензію залишають при кімнатній температурі на 35 – 40 хв, після чого роблять посіви на спеціальні живильні середовища (Мартена, Едварда, ВІЕВ, УкрНДІЕВ). Посіви інкубують у термостаті при температурі 37 – 38 °С. При первинному виділенні мікроорганізму з патологічного матеріалу часто виникає потреба здійснити 5 – 6 «сліпих» пасажів.

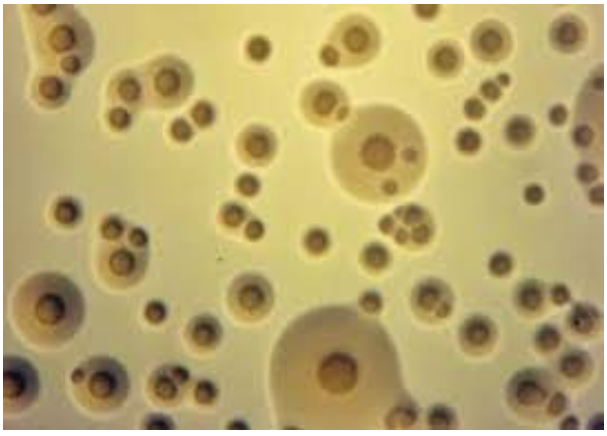


Рис. 2.60. Колонії *Mycoplasma gallisepticum* на щільному середовищі. (*Джерело:*** *https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579121006799)*

На твердих середовищах M. gallisepticum утворює дрібні (0,1 – 0 ,6 мм) округлі прозорі колонії (рис. 2.60).

Біопробу ставлять для визначення патогенності виділених штамів. Заражають ембріони 9-и добового віку на хоріоналантоїсну оболонку, вводячи 0,25 мл бульйонної культури. Інкубують при температурі 38 °С і щоденно проводять овоскопію. При наявності збудника з виразною вірулентністю, ембріони через 48 год після зараження гинуть.

При розтині реєструють відставання у розвитку, крововиливи у підшкірну клітковину голови, на тілі і кінцівках, застійні явища в легенях тощо.

Аналогічними методами можна ставити біопробу безпосередньо з патматеріалом, попередньо звільненим від сторонніх мікроорганізмів.

Серологічний метод діагностики. Наявність інфекції може бути перевірена шляхом постановки серологічних реакцій:

- сироватково-крапельна реакція аглютинації (СКРА);
- реакція аглютинації (РА) з кров'ю;
- імуноферментний аналіз (ІФА);
- визначення титру антитіл, реакція затримки гемаглютинації (РЗГА),

Для постановки РА з кров'ю або кров'яною сироваткою (ККРА і СКРА) використовують антиген біофабричного виробництва. Кров у птиці беруть до або через 5 – 6 год після годівлі. На предметне скло наносять краплю сироватки (крові) і краплю антигену. Результат реакції враховують протягом 2 хв при кімнатній температурі. Обстежують 3 – 5 % стада курей та індиків віком 2 міс. і старше.

Серологічні дослідження через варіації в їх специфічності та чутливості рекомендуються для скринінгових досліджень на рівні стада. Зразки для дослідження повинні братися належним чином з крові добових курчат та індичат, сперми або мазків з трахеї, клоаки чи з повітроносних мішків птиці.

У спеціалізованих лабораторіях для польових матеріалів, мазків і виділених на поживних середовищах культур збудників можуть бути використані методи виявлення ДНК на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Дослідження на виявлення мікоплазмозної інфекції проводять на репрезентативних пробах з метою постійного нагляду за інфекцією у стаді в період вирощування та у продуктивний період птиці, найкраще перед початком яйцекладки, а потім щоквартально.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти вивчають теоретичний матеріал, дають характеристику культуральних властивостей мікоплазм, за допомогою мікроскопа досліджують готові препарати сапрофітних мікоплазм, мікрокартину замальовують в альбом.*

Питання для самоконтролю

1. Структурні особливості мікоплазм.
2. Морфологічні відмінності мікоплазм.
3. Особливості культивування мікоплазм.
4. Принцип лабораторної діагностики мікоплазмозів.
5. Лабораторна діагностика респіраторного мікоплазмозу птиці.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ХЛАМІДІОЗУ

Мета заняття: *ознайомити студентів з морфологією, тинкторіальними, культуральними, ферментативними і патогенними властивостями хламідій та методами лабораторної діагностики хламідіозів у тварин.*

Матеріали та обладнання. *Музейні мікропрепарати, фіксовані (знезаражені) клітинні культури, мікроскопи світлові, люмінесцентний мікроскоп, фарба Романовського-Гімзи, фосфатно-цитратний буфер (pH 3,8), акридиновий оранжевий, предметні скельця, дистильована вода, спирт, імерсійне масло, дезінфікуючий розчин, атлас.*

Хламідіоз (лат. *Chlamydiosis*) **–** небезпечна зоонозна інфекційна хвороба сільськогосподарських, свійських (собаки, коти), диких і лабораторних тварин (кролі, морські свинки, білі миші) та птиці. Доведено, що існує міжвидове зараження (особливо, якщо різні види тварин знаходяться в одному приміщенні). Це захворювання дуже небезпечне і для людини, зараження якої можливе від хворих тварин та птиці. Захворювання розповсюджується в багатьох країнах світу, а також в Україні.

Chlamydia у сільськогосподарських тварин, найчастіше, викликає аборти, на останніх термінах вагітності, народження слабкого нежиттєздатного молодняку та його загибель в період відлучення. Молодняк, який перехворів, відстає у рості. Крім того, спостерігаються кератокон´юнктивіти, поліартрити, бронхопневмонії, енцефаломієліти, некрози вух, кінцівок. У дорослих кнурів, бугаїв спостерігаються орхіти, зниження якості сперми, у дорослих самок – безпліддя

Хламідіоз небезпечний тим, що в стаціонарно неблагополучних господарствах у дорослих тварин досить часто перебігає без симптомів, але вони є носіями збудника, джерелом зараження. Племінні тварини-носії – основне джерело занесення збудника в благополучне стадо.

Людина є найбільш сприйнятливою до збудника хламідіозу тварин, особливо до *Chl.psittaci,* які зумовлюють трахому, венеричну лімфогранульому, урогенітальну інфекцію.

Хламідіоз необхідно диференціювати від бруцельозу, лептоспірозу, сальмонельозу.

Хламідіоз у птиці (орнітоз) – природно-вогнищева інфекція, при якій величезним неконтрольованим резервуаром збудника в природі є численні види диких птахів. За останньою класифікацією орнітоз віднесений до найважливіших природно-антропургічних зоонозів. Природна осередковість орнітозу встановлена ще в 60-ті роки минулого сторіччя, але до сьогодні недостатньо вивчені фактори активності, стійкості природних осередків орнітозу, умови їхнього формування та тривалого функціонування, роль в епізоотичному та епідемічному процесах. В сучасних умовах загрози біотероризму важливість вивчення зазначеної проблеми полягає також у тому, що збудник зоонозних хламідіозів *Chlamydophila psittaci* (*Cp. psittaci*) може бути використаний як потенційний агент біологічної зброї.

Збудник хламідіозу – облігатний внутрішньо-клітинний мікроорганізм, який відносять до дрібних бактерій *родини Chlamydiaceae,* яка поділяється на два роди: *Chlamydia* та *Chlamydophila.*

До роду *Chlamydia* належать такі види: *C. trachomatis, C. suis, C. muridarum.* Рід *Chlamydophila* об'єднує шість видів: *Cp. psittaci, Cp. pneumoniae, Cp. pecorum, Cp. caviae, Cp. felis, Cp. abortus.*

Chlamydia trachomatis викликає у людей трахому, урогенітальний хламідіоз і лімфогранульому, проктити, синовіти, артрити та пневмонії.

Chlamydia suis найчастіше викликає аборти, артрити, пневмонії і енцефаломієліти у свиней. Різні штами цього мікроорганізму мають підвищену резистентність до сульфаніламідів та тетрациклінів.

Chlamydia muridarum є збудником гризунів родини *Muridae* (миші, хом'яки й ін.). Найважливішою фенотипічною особливістю представників роду Chlamydia є їх здатність накопичувати глікоген у включеннях.

Chlamydophila psittaci викликає псітакози (орнітози) птахів, аборти, орхіти, баланопостити, поліартрити, пневмонії, ентерити, енцефаломієліти і кон'юнктивіти різних видів тварин.

Chlamydophila pneumoniae розглядається в основному, як респіраторний збудник, що найчастіше викликає гострі і хронічні бронхіти та пневмонії.

Chlamydophila pecorum є винятково збудником захворювань тварин, найчастіше овець, великої рогатої худоби і свиней, вражаючи нервову систему, респіраторний і шлунково-кишковий тракти. Також, цей вид збудника хламідіозу виділений у сумчастих (коала), викликаючи у них ураження сечостатевої системи, безпліддя.

Chlamydophila caviae вперше виділена із кон'юнктиви гвінейської свині.

Chlamydophila felis викликає кон'юнктивіти і риніти у домашніх котів. Відомі випадки зараження людини, при цьому відзначалися симптоми кон'юнктивіту.

Chlamydophila abortus – збудник найчастіше розповсюджений серед жуйних, вражає переважно плаценту.

Оскільки хламідії знаходяться всередині клітин організму (внутрішньо-клітинні паразити), це підвищує їх стійкість до лікувальних препаратів, тобто відкриті шляхи для хронічного перебігу хвороби. Хламідії дрібні, поліморфні мікроорганізми, мають кулясту або овальну форму, діаметром 0,2 – 1,5 мкм, не утворюють спор і капсул, за Грамом фарбуються негативно. Культивуються, як і віруси, тільки в живих чутливих клітинних системах: організмі тварин, у курячих ембріонах, що розвиваються, деяких клітинних культурах.

Збудники хламідіозу містять ДНК і РНК та мають унікальний цикл внутрішньоклітинного розвитку, що включає дві стадії життєвого циклу існування мікроорганізму: ***елементарне тільце*** – високопатогенна форма збудника розміром 250-300 нм і ***ретикулярне (ініціальне) тільце*** – малоінфекційна форма розміром 600-1500 нм. Також існують перехідні тільця – проміжні форми існування хламідій.

Хламідії можуть приймати три різні життєво важливі форми:

• *перша* – хламідія у формі активної бактерії, яка живе на слизовій оболонці, викликаючи запалення;

• *друга* – розмножується в клітині хазяїна, використовуючи структури цієї клітини. Цим хламідії подібні до вірусів. Це одні з найменших бактерій, адже мають поміщатися в маленькому мішечку (вакуолі) всередині клітини. Новоутворені хламідії (перша форма) розривають клітину і йдуть інфікувати інші — в тому самому чи новому організмі;

• *Третя форма,* неактивна, подібна до спор, утворюється в клітині хазяїна, якщо умови не дозволяють їй розмножуватися. Може існувати довго, аж поки не почне розмножуватися. Хронічна інфекція підтримується завдяки цій формі, вона ж викликає реактивний артрит. Це причина того, чому буває складно позбутись хламідійної інфекції.

Лабораторна діагностики хламідіозу

Лабораторна діагностика хламідіозу у тварин базується на виявленні збудника (*Chlamydia spp.*) або антитіл до нього. "Золотим стандартом" є ПЛР-діагностика (мазки кон'юнктиви, носоглотки, змиви), що забезпечує найвищу точність. Також використовують серологічні методи (ІФА) для пошуку антитіл.

Ризики роботи з хламідіями:

Інфекційна небезпека: деякі види *Chlamydia*, зокрема *C. Trachomatis* (збудник урогенітальних інфекцій) та *C. psittaci* (спричиняє орнітоз), є патогенними для людини і можуть викликати серйозні захворювання.

Рівень біобезпеки: для роботи з живими культурами хламідій, особливо висококонцентрованими, необхідні лабораторії біобезпеки рівня 2 (BSL-2) або 3 (BSL-3), залежно від серовару. Навчальні лабораторії не завжди відповідають цим вимогам.

Робота із збудником хламідійних інфекцій також може проводитись у ПЛР-лабораторіях із попередньо інактивованим матеріалом, прогрітим при 70-80°С протягом 10 хв. або залитим 0,5 %-м розчином фенолу чи гуанідінізотіоціонатом у концентрації 5,3 М/дм^3 або 5 %-м робочим розчином реагенту “Chelex-100”.

Складність культивування: хламідії є облігатними внутрішньоклітинними паразитами, тому їх культивування вимагає наявності клітинних культур (наприклад, клітин HeLa або McCoy), що робить процес складним і витратним;.

Зараження через аерозолі: особливо небезпечними є процедури, що можуть призвести до утворення аерозолів (центрифугування, сонікація). Такі маніпуляції з живими культурами мають проводитися в боксі біологічної безпеки (BSC).

Діагноз на хламідіоз встановлюється комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних ознак хвороби, патолого-анатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Усі методи діагностики хламідіозу умовно розділяють на дві групи: *прямі методи* (безпосереднє виявлення збудника) і *непрямі методи,* які спрямовані на визначення наявності антитіл у сироватці крові (табл. 2.24).

Таблиця 2.24. Методи дослідження хламідійних інфекцій

Методи	Рекомендації	Час обстеження, год	Коментарі
Бактеріоскопічний	Трахома, кон'юнктивіт зі включеннями	1	Нечутливий при урогенітальних інфекціях
Визначення антигенів: пряма імунофлуоресценція (ПІФ), непряма імунофлуоресценція (НІФ), ІФА	***Зразки:*** урогенітальні, кон'юнктивні; ректальні, назофарингіальні	0,5 2−5	Зразки зберігаються до 7 днів Зразки зберігаються до 2 тижнів
Бактеріологічний (культура тканини)	Всі хламідійні захворювання, крім періодів антибіотикотерапії	48−72	"Золотий стандарт", застосовується при контролі вилікування
Серологічний (РЗК, РНЗК, РНГА)	Інвазивні хламідійні захворювання	1,5−3	При безплідді, артритах, хронічних захворюваннях органів малого тазу, пневмоніях новонароджених
Молекулярно-біологічні методи (ПЛР)	Будь-які зразки, у тому числі сироватка крові та секрети	2	Можливе тривале зберігання матеріалу

Основні методи лабораторної діагностики хламідіозу тварин:

ПЛР-аналіз (полімеразна ланцюгова реакція): найшвидший і найточніший метод виявлення ДНК хламідій (зокрема *Chlamydia felis* у кішок). Матеріал: зішкряби з кон'юнктиви, носоглотки, статевих шляхів, змиви.

Серологічні методи (ІФА, РЗК, РНГА): виявляють антитіла (IgM, IgG) у сироватці крові. Дозволяють діагностувати попередні контакти та хронічні інфекції, але результати можуть бути утруднені через тривалу персистенцію антитіл. Виявлення антитіл класів IgM (свідчать про гостру фазу) та IgG (вказують на хронічний перебіг або раніше перенесене захворювання)

Експрес-тести (ІХА): швидке виявлення антигенів у секретах (наприклад, FASTest® CHLAM Ag Укрбіопрепарат). Використовуються для швидкого виявлення антигену безпосередньо у ветеринарній клініці (результат за 10–15 хвилин).

Мікросокпія (цитологія): забарвлення мазків-відбитків (за Романовським-Гімзою) для виявлення внутрішньоклітинних включень, проте метод має низьку чутливість.

Культуральний метод (бакпосів): вирощування збудника на курячих ембріонах або культурах клітин. **Бактеріологічний метод с**кладний і тривалий процес, оскільки хламідії є облігатними внутрішньоклітинними паразитами і ростуть лише на живих клітинних культурах або курячих ембріонах.

Ізоляція хламідій на курячих ембріонах, лабораторних тваринах, культурах клітин із наступною ідентифікацією методами світлової мікроскопії, в реакції імунофлуоресценції, ІФА, ПЛР.

Значення мікроскопії при діагностиці хламідіозу.

Зображення хламідій під мікроскопом є унікальним, оскільки ці бактерії є облігатними внутрішньоклітинними паразитами й існують *у двох різних морфологічних формах* протягом свого життєвого циклу:

А) Елементарні тільця (ЕТ):

1. Це інфекційна, метаболічно неактивна форма бактерії.
2. Мають сферичну форму і невеликий розмір — від 0,2 до 0,4 мкм, що робить їх важкорозрізнюваними у світловому мікроскопі.
3. Мають щільну клітинну стінку, що дозволяє їм виживати поза клітиною-господарем.
4. При мікроскопії їх зазвичай виявляють за допомогою методів імунофлуоресцентної діагностики (ДІФ), де вони світяться під флуоресцентним мікроскопом, або за допомогою електронної мікроскопії, де їх видно як щільні, компактні структури.

Б) Ретикулярні тільця (РТ):

1. Це внутрішньоклітинна, реплікативна форма бактерії.
2. Вони більші за ЕТ (0,6–1,5 мкм), мають більш тендітну клітинну стінку та меншу електронну щільність.
3. Вони діляться бінарним поділом всередині вакуолі в клітині-господарі, відомої як **включення**.
4. Ці включення є найбільш характерною ознакою хламідійної інфекції під світловим мікроскопом.

Мікроскопічна картина при хламідіозі. При мікроскопії мазка з інфікованого матеріалу (наприклад, з уретри або кон'юнктиви) можна побачити такі ознаки:

Включення: у цитоплазмі клітин-господарів (наприклад, епітеліальних клітин) спостерігаються характерні включення — скупчення ретикулярних тілець, що знаходяться у вакуолі. Ці включення можуть мати різні розміри і забарвлення залежно від стадії інфекції та методу фарбування. Наприклад, при фарбуванні за Романовським-Гімзою вони виглядають як темно-сині гранули.

Двофазний цикл: у мазку можуть бути помітні обидві форми – дрібні ЕТ, що звільнилися з клітин, і великі включення з РТ усередині клітин.

Зміни в клітинах-господарях: хламідійна інфекція викликає дистрофічні зміни в епітеліальних клітинах, такі як утворення вакуолей в цитоплазмі, що також помітно під мікроскопом.

Висновки щодо мікроскопії

Звичайна світлова мікроскопія для діагностики хламідіозу не дуже ефективна, оскільки бактерії дуже малі і їх важко розрізнити.

Сучасні методи діагностики, такі як ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) та імунофлуоресцентні тести, є більш чутливими та специфічними для виявлення хламідій.

Електронна мікроскопія, навпаки, дозволяє детально роздивитися структури елементарних та ретикулярних тілець, що допомагає в наукових дослідженнях.

Особливості діагностики у різних видів тварин:

Сільськогосподарські тварини: особлива увага приділяється дослідженню патологічного матеріалу після абортів (плацента, органи плода) для диференціації від бруцельозу та лептоспірозу.

Коти та собаки: хвороба часто протікає хронічно або безсимптомно, тому рекомендується поєднувати ПЛР-тестування зі змивів та серологічні дослідження крові.

Матеріал для дослідження

Вибір біоматеріалу при підозрі на хламідійну інфекцію залежить від клінічних проявів захворювання:

При кон'юнктивіті: змиви або зішкріби з кон'юнктиви (беруть затупленим очним скальпелем після анестезії 0,5 %-м розчином дикаїну).

При репродуктивних порушеннях: мазки з уретри, вагіни, препуція; *від тварин, які абортували* – ділянки плаценти, аборт-плоди, сечовий міхур або паренхіматозні органи абортованих плодів, виділення з родових шляхів маток після аборту чи патологічних родів; *проби еякуляту (не менше 1 мл) чи замороженої сперми бугаїв-плідників* (в рідкому азоті або сухому льоді) – не менше 4 гранули.

- **При респіраторній формі**: виділення з носа, бронхоальвеолярний лаваж.
- **Для серології**: сироватка крові. *Кров від тварин, які абортували, хворих або підозрілих у захворюванні*, для серологічних досліджень відбирають дворазово (у перші дні хвороби і повторно через 2-4 тижні). Сироватку крові (2-3 мл) направляють у лабораторію не пізніше 20–24 години з моменту відбору зразків;
- **Патологічний матеріал від загиблих або вимушено забитих хворих тварин** (шматочки головного мозку, легень, паренхіматозних органів, лімфатичні вузлики, яєчники, сім‘яники*)*.

Для відбору епітеліальних зіскрібків слід застосовувати спеціальні урогенітальні одноразові мультизонди “Medscand Medical”, “Акцелон”, “DNC Med” тощо.

Патологічний матеріал відбирають не пізніше двох годин після загибелі чи забою тварини. Флакони з патматеріалом транспортують у термосі з льодом, заморожену сперму в контейнері з рідким азотом у день відбору матеріалу, але не пізніше ніж через 24 години після відбору.

При відсутності можливості швидкого пересилання, матеріал консервують середовищем: № 199 з 5 %-м фетальної сироватки великої рогатої худоби або сахарозо-фосфатним буферним розчином з 5 – 10 % тієї ж сироватки. В обох випадках додають антибіотики: стрептоміцин (100 – 200 мкг/мл), ністатин (25) і канаміцин (100 мкг/мл). Інша комбінація антибіотиків така: гентаміцин – 20 мкг/мл, ністатин – 25 мкг/мл, ванкоміцин – 100 мкг/мл; pH середовища – 7,0 – 7,1).

Відбір і доставка матеріалу в лабораторію повинна проводитись з дотриманням заходів, які суворо попереджують поширення збудника інфекції.

Бактеріологічна діагностика. Із патологічного матеріалу, особливо з плаценти маток, що абортували, *готують звичайні мазки або мазки-відбитки*, які фіксують сумішшю Никифорова, абсолютним метиловим спиртом або холодним абсолютним ацетоном і фарбують за методами Романовського-Гімзи, Стемпа, Маккіавелло для звичайної світлової мікроскопії і акридиновим оранжевим – для люмінесцентної мікроскопії.

Метод Романовського-Гімзи. На кожний мілілітр фосфатно-буферного розчину (pH 7,2) додають 2 – 4 краплі маточного розчину фарби, після цього, фіксовані мазки вертикально опускають у барвник і витримують їх при кімнатній температурі протягом 20 – 24 год. Після промивання дистильованою водою препарати диференціюють підкисленим етанолом близько 10 с, знову промивають, висушують і досліджують з використанням світлового мікроскопа.

Мікроскопічна картина. Елементарні тільця хламідій – червоно-фіолетові, проміжні форми набувають фіолетового кольору. Хламідії розміщуються у цитоплазмі уражених клітин компактними скупченнями, а також за межами клітин поодиноко, парами, скупченнями різної величини, інколи – по чотири (рис. 2.61).

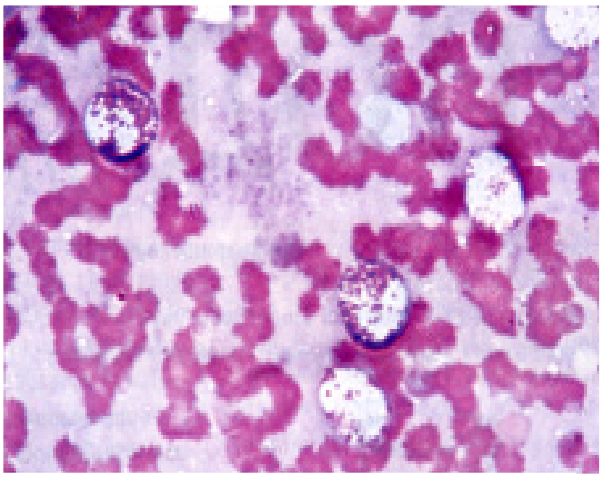


Рис. 2.61. Мікрокартина *Chlamydiae suis*
(Джерело: https://vukladach.pp.ua/MyWeb/manual/wetmed/bakter_xvor_svuney/Bakteriihvorobusv

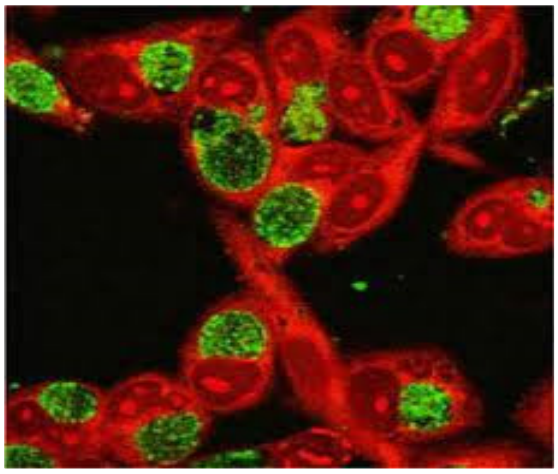


Рис. 2.62. ЕТ хламідій-люмінесцентна мікроскопія
(Джерело:http://www.mif-ua.com/archive/article/38303)

Фарбування акридиновим оранжевим. Мазки фіксують рідиною Корнуа протягом 5 хв, дворазово відмивають фосфатно-цитратним буфером (pH 3,8) по 2 – 4 хв й обробляють розчином акридинового оранжевого (1 : 10 – 1 : 20 тис.) на цьому ж буфері протягом 10 – 20 хв. Після триразового відмивання буфером мазки досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Елементарні тільця хламідій світяться яскравим зеленим світлом, проміжні їх форми зумовлюють флуоресценцію від жовтого до оранжевого кольорів.

Імунофуоресцентний метод (РІФ). Ефективним є застосування прямого (ПІФ) і непрямого методів імунофлуоресценції (НІФ). У зв'язку з дефіцитом діагностикумів для прямого методу з метою виявлення хламідій у різних видів

тварин використовують імунні глобуліни проти хламідій овечого й козиного походження.

При прямому методі, спочатку мазки фіксують холодним ацетоном, потім наносять робочий розчин хламідійної флуоресціюючої сироватки, міченої ФІТЦ і витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 45 хв. Після цього, їх ретельно відмивають фосфатно-сольовим буферним розчином й досліджують в люмінесцентному мікроскопі при комбінації світлофільтрів ФС-1-2, БС-8-2, СЗС-7-2 й блокуючому фільтрі ЖС-18.

Мікроскопічна картина. Елементарні тільця хламідій і скупчення їх проміжних форм світяться яскравим зеленим світлом на темно-сірому фоні препарату (рис. 2.62).

Серологічна діагностика.

Для серодіагностики хламідіозу в даний час найчастіше використовують ***імуноферментний аналіз (ІФА)*** на виявлення антитіл (IgM, IgG) у сироватці крові.

Загальний принцип ІФА: антиген фіксується на твердій поверхні, обробляється випробуваною сироваткою, а потім антивидовим імуноглобуліном, пов'язаним із ферментом, що візуалізується після додавання субстрату. Імуноферментні методи аналізу (ІФА) засновані на виявленні в сироватці крові специфічних антихламідійних антитіл – імуноглобулінів (в основному, IgM і IgG), що продукуються організмом у відповідь на інфікування.

Останніми роками для діагностики хламідіозу широкого застосування набув ***імунопероксидазний метод*** (для виявлення збудника і його антигену, визначення наявності специфічних антитіл у досліджуваних зразках сироватки крові). Безперечною перевагою цього методу є стабільність фарбування антигенів і тривале збереження препаратів, можливість кореляції спостережень у світловому й електронному мікроскопах.

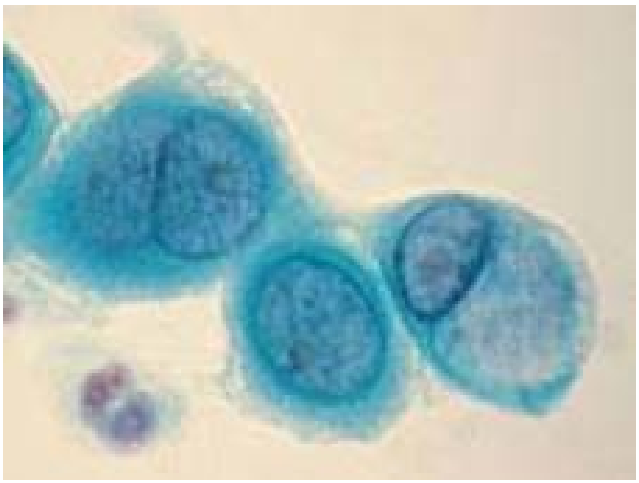


Рис. 2.63. ЕТ хламідій з локалізацією в цитоплазмі клітин (електронна мікроскопія)

(Джерело: https://vukladach.pp.ua/MyWeb/manual/wetmed/)bakter_xvor_svuney/Bakteriihvorobusvuney/15/15.htm)

У сучасних лабораторіях, великого значення надають ***методу електронної мікроскопії,*** який дає змогу із значною достовірністю виявити хламідії в первинних матеріалах (рис. 2.63).

Із внутрішніх органів (особливо печінки й селезінки) тварин, що підозрівались у захворюванні на хламідіоз, вирізають шматочки товщиною 1 – 1,5 і довжиною 3–5 мм, які після спеціальної обробки поміщають у полімеризаційні блоки. В ультратонких зрізах хламідії виявляються в цитоплазмі клітин у вигляді скупчень різної величини.

Будова зрілого елементарного тільця хламідій не відрізняється від

структури грамнегативних бактерій: оболонка клітини складається з двох тришарових мембран – зовнішньої клітинної стінки і внутрішньої цитоплазматичної мембрани. В цитоплазмі знаходяться гранули типу рибосом, нуклеоїд найчастіше розміщений ексцентрично.

Виділення чистої культури. Із патологічного матеріалу на основі фізіологічного розчину або розчину Хенкса готують суспензію (15–20 %-у), яку попередньо звільняють від грубих часток шляхом центрифугування при 3000 об/хв протягом 30 хв. До надосадової рідини додають стрептоміцин і гентаміцин (орієнтовно 8 – 10 мг/мл). Для контролю стерильності робочої суспензії, роблять посів на живильні середовища.

Після звільнення матеріалу від бактерій і грибів, ним заражають курячі ембріони у жовтковий міхур в дозі 0,3–0,4 мл. При наявності в матеріалі хламідій в першому пасажі ембріони (30–40 %) гинуть на 4–12-й день після зараження. В наступних пасажах ембріони гинуть інтенсивніше (на 4 – 6-й день летальність в середньому досягає 100 %).

В мазках із стінок жовткового міхура за допомогою звичайного й люмінесцентного мікроскопів знаходять типові форми хламідій. Первинне виділення останніх можна здійснювати також шляхом зараження молодих білих мишей, яким матеріал вводять у черевну порожнину та інтраназально. Миші гинуть на 5–7-й день після зараження. При розтині, звертає на себе увагу значне збільшення селезінки у тварин. В мазках із внутрішніх органів, особливо печінки й селезінки, знаходять елементарні та проміжні тільця хламідій.

Первинне виділення хламідій у клітинних культурах потребує спеціальних режимів адаптації і культивування.

Для контролю ефективності лікування тварин застосовують культуральний (бактеріологічний) метод із застосуванням клітинних культур.

Метод заснований на здатності хламідій до розмноження на перещеплюваних клітинних лініях ссавців або клітин жовткових мішків курячих ембріонів. Після зараження субстрат витримується деякий час (3 – 14 діб) у певних умовах, потім досліджується на наявність хламідійних колоній (рис. 2.64).

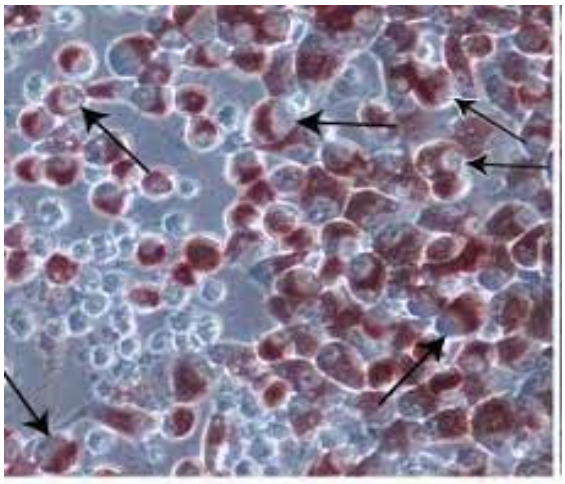


Рис. 2.64. Включення хламідій у культурі клітин *(Джерело: https://repo.knmu.edu.ua/server/api/core)/bitstreams/47d1dacd-ce34-492d-aac5-6d62a22d8475/content*

Метод діагностики хламідійних інфекцій з використанням культур клітин вважається "золотим стандартом" з умовною чутливістю 100 % (в дійсності – не більше 80 %). Чутливість інших методів прийнято виражати у відсотках по відношенню до культурального методу.

Метод виділення хламідій у культурі клітин може бути використаний протягом усього періоду захворювання, за винятком періоду антибіотикотерапії і протягом місяця після нього. Однак, у даний час метод культуральної діагностики в

основному застосовується при контролі лікування для виявлення хламідій, здатних здійснювати повний цикл розвитку.

Серологічна діагностика. Сироватку крові тварин досліджують за допомогою РЗК з хламідійним антигеном. Сироватки від свиней рекомендують досліджувати в інгібіторній РЗК.

Облік результатів реакції. Виявлення антитіл у сироватках крові в титрах 1:5, 1:10 і вище є підставою для підозри на хламідійну інфекцію.

Титри антитіл у межах 1 : 8 – 1:16 свідчать про латентний перебіг хвороби, а 1:32 – 1:128 - про активну фазу хламідіозу. В окремих тварин антитіла можна виявити у розведеннях сироваток 1: 512 і вище.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти вивчають теоретичний матеріал з питань* морфології, патогенезу, клінічних проявів хламідіозів та епідеміології;

- *правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом та опановують навички відбору і транспортування матеріалу для дослідження за підозри на інфекцію обумовлену хламідіями;*
- *опрацьовують основні методи дослідження матеріалу, який надійшов від хворої тварини з підозрою на хламідіоз;.*
- *мікроскопія знешкоджених зразків: дослідження фіксованих, тобто знезаражених, клітинних культур, інфікованих хламідіями. Студенти можуть виявляти характерні включення в цитоплазмі клітин за допомогою фарбування методом Романовського-Гімзи або з використанням методів прямої імунофлуоресценції.*

Питання для самоконтролю

1. Загальна характеристика хламідій їх таксономічне положення.
2. Які захворювання у тварин викликають хламідії?
3. Яка різниця між бактеріями, вірусами й хламідіями?
4. Правила відбору і транспортування патматеріалу в лабораторію для лабораторної діагностики хламідіозів.
5. Етапи досліджень, які проводяться при лабораторній діагностиці хламідіозів.
6. Чому хламідії не культивуються на бактеріальних середовищах?

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА РИКЕТСІОЗІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів з принциповими відмінностями рикетсій від інших прокаріотів, з біологічними властивостями рикетсій. Ознайомити з методами мікробіологічної діагностики рикетсіозів.*

Матеріали та обладнання. *Готові фіксовані нефарбовані препарати рикетсій (вакцинний штам) і фарбовані за методом Романовського-Гімзи, рикетсіозний антиген для РА, схема проведення мікробіологічної діагностики рикетсіозів, мікроскопи, імерсійна олія.*

Рикетсіо́зи (англ. *Rickettsiosis, Rickettsial Infection*) – велика група гострих трансмісивних інфекційних захворювань причиною яких є внутрішньоклітинні мікроорганізми (паразити) – рикетсії. Ці мікроорганізми є облігатними внутрішньоклітинними паразитами, тобто можуть жити та розмножуватися лише всередині клітин іншого організму-господаря.

Рикетсіози можуть вражати різні види тварин, але найчастіше зустрічаються у собак, кіз, овець та великої рогатої худоби. У тварин рикетсіози переносяться переважно кліщами, блохами та вошами.

Переносники та резервуари збудника:

Кліщі: є найпоширенішими переносниками рикетсіозів. Вони передають бактерії, в момент укусу тварин або людей.

Гризуни та інші дикі тварини: слугують природними резервуарами інфекції, утримуючи циркуляцію рикетсій у природі.

Домашні та сільськогосподарські тварини: можуть заражатися, коли їх кусають інфіковані кліщі, і, своєю чергою, можуть виступати джерелом зараження для людей.

Біологічна класифікація рикетсій: Домен бактерія *(Bacteria*), тип протеобактерія *(Proteobacteria)*, клас альфа-протеобактерія *(α- Proteobacteria)*, ряд *Rickettsiales*, родина *Rickettsiaceae*, роди *Rickettsia*,*Orientia, Wolbachia*.

Під терміном «рикетсії» умовно розуміють групу мікроорганізмів типу *Proteobacteria*, що включає види рикетсій, орієнцій, ерліхій, коксієл та бартонел.

Засновник вчення про рикетсії та рикетсіози бразильський учений Енріке да Роше Ліма назвав виділений ним збудник висипного тифу рикетсією на честь американського мікробіолога Г. Риккетса. Пізніше назва «рикетсії» була використана для позначення групи патогенних і непатогенних рикетсіоподіб-них мікроорганізмів (симбіонтів) членистоногих.

Сьогочасний поділ рикетсій значно відрізняється від того, що існував у XX столітті. Класифікацію рикетсій постійно змінюють через удосконалення методів ідентифікації та підходів до критерію роду та видів. У родині *Rickettsiaceae* на сучасному етапі виділяють рід *Rickettsia*, який включає щонайменше 22 види, що спричинюють хвороби у людей.

Більшість видів рикетсій (близько 40) непатогенні. Вони мешкають у членистоногих і не викликають патології у ссавців. Патогенних рикетсій значно

менше. Останні не тільки мешкають у членистоногих, але можуть проникати в організм людини та інших ссавців, викликаючи у них характерну патологію.

Патогенні для людини і тварин рикетсії відносять до родини *Rickettsiaceae (*роди: *Rickettsia, Orientia)* та *Anaplasmataceae (*роди *Ehrlichia, Anaplasma, Neoreckettsia, Wolbachia).* Рід *Coxiella* виключений з родини *Rickettsiaceae* і віднесений до класу гамма-протеобактерій.

До роду *Rickettsia* входять наступні види патогенних рикетсій:

1) *Rickettsia prowazekii* – збудник епідемічного висипного тифу та хвороби Брилла;

2) *Rickettsia typhi* – збудник ендемічного висипного тифу;

3) *Rickettsia rickettsii* – збудник плямистої лихоманки Скелястих гір і його різновид *R. braziliensis,* яка викликає злоякісну форму плямистої лихоманки Скелястих гір;

4) *Rickettsia conorii* – збудник марсельської лихоманки;

5) *Rickettsia australis* – збудник австралійського кліщового рикетсіозу;

6) *Rickettsia sibirica* – збудник північноазіатского кліщового рикетсіозу;

7) *Rickettsia acari* – збудник везикулярного або віспоподібного рикетсіозу;

8) *Rickettsia tsutsugamushi* – збудник лихоманки цуцугамуши;

9) *Rickettsia japonica* – збудник японської плямистої лихоманки.

Рід *Rickettsia* поповнено новим видом збудника – *R. felis,* який проявляє вірулентність не тільки відносно кішок, але й людей, і є відповідальним за виникнення у них хвороби «тифу котячих бліх». Не виключено, що саме цей вид рикетсій, близький за своїми антигенними і біологічним характеристикам до *R. prowazekii, R. typhi,* був прабатьком висипно-тифозних рикетсій при розширенні своєї екологічної ніші за рахунок вошей людини. За своїми молекулярно-генетичними характеристиками *R. felis* відноситься до групи збудників висипного тифу, а не кліщових рикетсіозів.

З роду *Rickettsia* виведена *Rochalimea quintana,* що викликає волинську або окопну лихоманку, разом зі збудником котячих подряпин, що увійшли до родини *Bartonellaceae*. Крім названих рикетсій з триби *Rickettsieae,* є ще кілька видів збудників з триби *Ehrlicheae,* які викликають хвороби у людини і у деяких тварин.

У складі роду *Coxiella* є єдиний вид – *Coxiella burnetii,* що викликає у людей і тварин Ку-лихоманку, яку у XX столітті розглядали в особливій групі пневмотропних рикетсіозів.

Рикетсії – це група плеоморфних бактеріоподібних організмів, типовий рід родини, *Rickettsia* представлений, частіше, кокоподібними або паличкоподібними, нерухомими клітинами.

Плеоморфізм рикетсій залежить від фази інфекційного процесу і його інтенсивності. В оптимальних умовах клітини представників родини мають форму коротких паличок розміром в середньому 0,2 – 0,6 × 0,4 – 2,0 мікрон. Їхня форма і розміри можуть декілька разів змінюватися, залежно від фази росту (наприклад, логарифмічної або стаціонарної фази). При зміні умов росту вони легко утворюють клітини неправильної або ниткоподібної форми. На

поверхні зовнішньої мембрани формується капсулоподібний слизовий покрив і мікрокапсула, які містять специфічний до групи «розчинний» антиген.

В еволюційно-біологічному аспекті займають проміжне положення між бактеріями і вірусами. Це стає очевидним при розгляді таких властивостей рикетсій, як морфологія, морфогенез, фізіологія, особливості їх розвитку і розмноження. Розмножуються ці бактерії шляхом бінарного поділу, володіють незалежним від клітини-хазяїна метаболізмом. Здатні індукувати свій фагоцитоз клітиною еукаріотів.

Бінарне ділення збудників рикетсіозів й коксієл Бернета, як типовий спосіб їх репродукування, повна аналогія структурної організації окремих її корпускул морфологічній будові бактеріальних клітин з наявністю в їхніх клітинних стінках мурамової і дипімелінової кислот, зовнішньої мембрани, набування форм, що не розмножуються в несприятливих умовах культивування та інша інформація дозволили в 70-і роки остаточно відокремити рикетсії в незалежну від хламідій і вірусів групу (Weiss E., 1992). Рикетсії за рядом ознак подібні до хламідій, у зв'язку, з чим подано критерії їх диференціації (табл.2.25).

Таблиця 2.25. Ознаки диференціації рикетсій і хламідій

Показник	Рикетсії	Хламідії
Форма і величина клітин	Паличко-, кокоподібні, нитчасті (0,3х2,5 – 0,2 – 0,3 мкм)	Сферичні, овальні, елементарні тільця – 0,2 – 0,3 мкм, ініціальні тільця - 0,5 – 0,7, гігантські тільця 1 – 3 мкм
Цикл розвитку	Поперечний поділ, відсутність регулярного циклу: від дрібних через проміжні форми знову до дрібних.	Унікальний, який не має аналогії з іншими прокаріотами. Трансформація зрілих тілець в ініціальні (ретикулярні), бінарний поділ проміжних форм, розмноження брунькуванням або внутрішньою фрагментацією, зворотний розвиток до елементарних тілець.
Метаболічна активність	Виробляють аденозин-трифосфат, містять цитохром, розщеплюють глутамат	Не виробляють і не використовують макроергічні сполуки, не мають цитохрому.
Наявність спільних антигенів	Немає	Немає
Роль членистоногих в трансмісії	Істотна майже для усіх видів	Дуже незначна або відсутня
Інфекційність	Усі форми	Лише зрілі елементарні тільця
Локалізація в клітині	Розміщуються вільно	На початку циклу розвитку локалізуються в особливих везикулах (аутофагосомах)

Діагностика. Діагностика рикетсіозів у тварин базується на комплексному підході, є складною, оскільки симптоми часто неспецифічні і можуть бути

схожими на інші захворювання. Вона зазвичай включає: клінічний огляд (симптоми: лихоманка, млявість та біль) і лабораторні дослідження.

Лабораторна діагностика рикетсіозів у тварин базується на виявленні збудника (ПЛР, мікроскопія) або специфічних антитіл (ІФА, РЗК). Основні методи включають молекулярно-генетичні дослідження крові, тканин (селезінка, печінка) або кліщів-переносників. Найбільш достовірними є ПЛР та серологічні тести в динаміці (парні сироватки).

Основні методи лабораторної діагностики рикетсій:

І. Молекулярно-генетичні методи (ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція): це метод дослідження для ранньої діагностики з найвищої чутливості та специфічності, підтверджує діагноз у перші дні захворювання. Дозволяє виявити ДНК збудника у крові, біоптатах шкіри або мазках.

ДНК-ПЛР (Polymerase Chain Reaction): є найбільш швидким, чутливим та специфічним методом для виявлення ДНК рикетсій у крові, сироватці або тканинах (біоптатах), особливо у гострій фазі захворювання.

ПЛР у реальному часі (Real-time PCR): дозволяє кількісно оцінити рівень інфекції та швидко диференціювати різні види рикетсій.

ІІ. Серологічні методи (виявлення антитіл):

1. **Імуноферментний аналіз (ІФА / ELISA):** використовується для виявлення специфічних антитіл у сироватці крові тварин (IgM (ранні) та IgG (пізні). *Діагностичним вважається зростання титру антитіл у 4 і більше разів*.

2. **Реакція зв'язування комплементу (РЗК) (метод парних сироваток крові):** класичний метод для визначення зростання титру антитіл у парних сироватках (взяті на 1-му та 2 – 3-му тижні хвороби). **З**ростання титру антитіл у 4 і більше разів, свідчить про активну інфекцію.

ІІІ. Мікроскопічний аналіз:

1. Забарвлення мазків крові або відбитків тканин (печінка, селезінка) за Романовським-Гімзою, Макіавелло або Здродовським. Рикетсії виявляються у вигляді дрібних кокоподібних або паличкоподібних структур. Через низьку чутливість метод застосовується рідко.

ІV. Біологічний (біопроба) та культуральний методи:

Зараження лабораторних тварин (морські свинки, білі миші) або курячих ембріонів патологічним матеріалом від хворої тварини. Метод тривалий, але дозволяє виділити чисту культуру збудника.

Через складність, високу небезпеку (вимагає лабораторій BSL-3). В клінічній практиці використовується рідко.

Матеріал для дослідження: цільна кров із антикоагулянтом (гостра фаза), сироватка крові, а також паренхіматозні органи загиблих тварин (печінка, селезінка), кліщі-переносники (для дослідження на носійство).

Вимоги до біобезпеки:

- Вивчати живі рикетсії у звичайних студентських лабораторіях категорично заборонено, оскільки більшість видів рикетсій є патогенами 3-ї групи ризику, що вимагає найсуворіших умов біобезпеки.

- Робота з живими культурами рикетсій, як правило, вимагає лабораторій біобезпеки рівня 3 (BSL-3). Лабораторії BSL-3 — це спеціальні ізольовані приміщення з герметичним контролем повітря, доступу та утилізації відходів.

Морфологія і тинкторіальні властивості рикетсій. Морфологічно, рикетсії є дрібними поліморфними мікроорганізми, можуть бути паличкоподібної, кулястої або ниткоподібної форми, довжиною 0,3 – 2,5, шириною – 0,2 – 0,3 мкм.

Встановлено, що ниткоподібні форми відповідають найбільш ранній фазі розвитку рикетсій, тоді як кокоподібні й короткі паличкоподібні форми представляють кінцеву стадію. Усі описані вище форми рикетсій є нормальними формами їх розвитку і мають однакову вірулентність.

Рикетсії нерухомі (за винятком деяких видів збудників кліщових рикетсіозів (*R. conorii, R. sibirica*), спор і капсул не утворюють, грам негативні. На відміну від бактерій погано фарбуються звичайними основними аніліновими барвниками, і тому для їх забарвлення використовують метод Романовського–Гімзи або Ціль-Нільсена.

Кокоподібні рикетсії за Романовським-Гімза і Цілем-Нільсеном забарвлюються у червоний колір; паличко - і ниткоподібні - у червоно-блакитний (зерна-гранули – червоні, цитоплазма між ними блакитна), за Здродовським - у червоний колір (рис. 2.65).

Крім того, для забарвлення мікроорганізмів використовується *методи Гіменеса і Макіавеллі,* які широко застосовуються в зарубіжній практиці.

У нашій країні частіше застосовується метод Макіавеллі в модифікації П. Ф. Здродовского, який у зв'язку з наявністю у складі рикетсій великої кількості ліпоїдів рекомендує забарвлювати їх не фуксином Макіавеллі, а звичайним розведеним карболовим фуксином (основний фуксин – 1 г, фенол – 5 г, спирт – 10 мл, дистильована вода – 100 мл). При такому методі рикетсії фарбуються в яскраво-рожевий або рубіново-червоний колір, протоплазма клітин – у блакитний, а ядра – в синій. Їх добре видно при звичайній світловій мікроскопії при збільшенні в 1 000 разів.

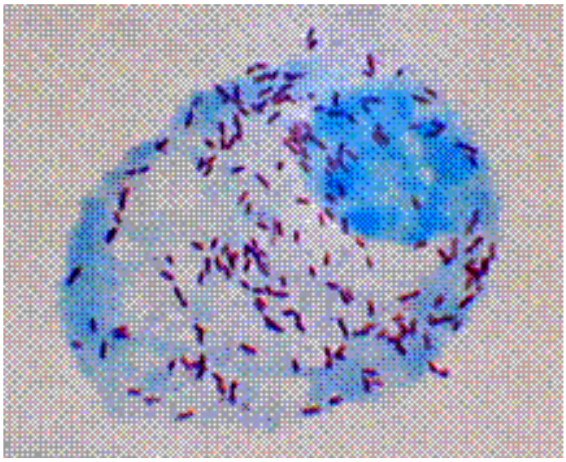


Рис. 2.65. Рикетсії
(фарбування за методом Ціля-Нільсена в модифікації П. Ф. Здродовского)
(Джерело:https://repo.knmu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/ccef47a7-1f8a-4c84-b963-76b2d8344d27/content)

За ультраструктурою рикетсії подібні до бактерій – мають оболонку завтовшки 7-8 нм; ядрова речовина розміщена дифузно або у вигляді гранул. У цитоплазмі знаходять нуклеоїд, який має спіралеподібну або гранулярну структуру, а також ДНК і РНК, рибосоми. Дихальна система рикетсій аналогічна прокаріотам.

Приготування і фарбування мазка. Із патологічного матеріалу (внутрішні органи, кров, кон'юнктива) готують мазки, які фарбують за методами Романовського-Гімзи, Ціля-Нільсена в модифікації

Здродовського та ін. При застосуванні останнього методу тонкі мазки фіксують полум'ям і фарбують розведеним фуксином Ціля (10 – 15 крапель фарби на 10 мл бідистильованої води) протягом 5 хв. Після промивання водою препарати диференціюють протягом 3 с 0,5 %-ю лимонною, 0,05 %-ю сірчаною або 0,15 %-ю оцтовою кислотами, промивають водою і дофарбовують 0,5 %-м розчином метиленового синього протягом 10–20 с, знову промивають водою і висушують.

Рикетсії набувають червоного кольору, фон мазка, клітини патологічного матеріалу — світло-синього.

Біопроба. Оскільки рикетсії не ростуть на штучних живильних середовищах, то в умовах лабораторії їх культивують в оболонці жовткового мішка курячих ембріонів, у культурах клітин або в організмі лабораторних тварин. Для цього суспензію патологічного матеріалу, звільнену від бактерій і грибів, вводять курячим ембріонам у жовтковий міхур в дозі 0,3 – 0,4 мл. Таким чином, вдається виділити культуру рикетсій і підтримувати її існування.

Серологічна діагностика рикетсіозів ґрунтується на виявленні специфічних антитіл у сироватці крові тварин за допомогою РЗК, РП, РА. В усіх реакціях використовують специфічні рикетсіозні антигени. Для індикації збудника використовують Р1Ф, РІА, ІФА, ПЛР.

В ряді випадків (при діагностиці Ку-лихоманки, гідроперикардиту жуйних тощо) ставлять біопробу на морських свинках, хом'яках, ховрахах. Після забою і розтину із внутрішніх органів тварин, особливо з печінки і селезінки, виділяють рикетсії.

Експрес-метод діагностики рикетсіозів здійснюють методом імунофлуоресценції, який дає змогу швидко й надійно виявити збудника у патологічному матеріалі.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА КУ-ЛИХОМАНКИ У ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Ку-лихоманка (англ. *Q-fever*, від першої букви англ. *Query* – неясний, незрозумілий, сумнівний, англ. *Fever* – гарячка). Основний синонім: коксієльоз, застаріле – пневморикетсіоз, Ку-рикетсіоз, гарячка боєнь, хвороба Дерріка-Бернета, австралійська гарячка, балканський грип, гарячка 9-ої милі) – це зооонозне інфекційне захворювання великої рогатої худоби.

Характерними ознаками є: безсимптомний перебіг, тобто має субклінічну або латентну форму, але у разі загострення може призвести до абортів на різних періодах тільності (частіше в другому й третьому триместрах), короткочасне підвищення температури тіла, загальне пригнічення, наявність запального процесу у плаценті (плацентиту). Рідше проявляється втратою апетиту, пневмонією, плевритом, кон’юнктивітом, кератитом, ринітом, орхітом, маститами, і це все на тлі зниження продуктивності, а також народженням нежиттєздатних та слаборозвинених телят, які часто гинуть у перший тиждень життя від пневмонії.

Найбільш сприйнятливою та вразливою до Ку-лихоманки є велика рогата худоба, хоча може вражатися і хворіти величезна кількість видів тварин і птиця (вівці, кози, свині, коні, верблюди, буйволи, собаки, кури, гуси, голуби).

Ку-лихоманка була вперше описана у 1937 р. в Квінсленді (Північна Австралія). Пізніше її спостерігали також в США (Девіс і Кокс, 1938). Під час другої світової війни захворювання на Ку-лихоманку спостерігались серед військ і цивільного населення на Балканах та Середземноморському узбережжі. Після другої світової війни було встановлено, що Ку-лихоманку поширена в багатьох місцевостях земної кулі. В колишньому СРСР це захворювання вперше виявлено в Узбецькій РСР, де спочатку його було названо термезькою гарячкою. *Природні спалахи Ку-лихоманки зареєстровані в усіх областях України.*

Джерело та резервуар інфекції. Основним джерелом та резервуаром збудника служать понад 60 видів ссавців, близько 50 видів птахів, окремі рептилії і більше 70 видів кліщів. За кількістю видів кліщів, що залучаються до інфекційного процесу, коксієльоз не має собі рівних серед інфекційних хвороб. Це обумовлює його таке найширше розповсюдження в світі серед усіх природно-осередкових хвороб.

Існують два види осередків: природні та антропургічні. В природних осередках головними джерелами та резервуарами слугують дрібні гризуни, птахи та кліщі. Носійство збудника в умовах природної інфекції може тривати від 2 місяців й до 3 років. У кліщів інфекція перебігає безсимптомно і тривало. Для них коксієла Бернета не смертельна, живуть вони з нею «добре» і коксієльозом не хворіють, у їхньому організмі коксієли можуть зберігатися роками.

Зараження тварин відбувається трансмісивно – через укуси кліщів, а ще аліментарно – через забруднені екскретами хворих тварин корми та воду, а за спільного утримання хворих і здорових тварин збудник Ку-лихоманки може передаватися навіть аерогенно й за прямого контакту. Виділення збудника з організму хворої тварини відбувається різними шляхами: з секретом верхніх дихальних шляхів, кров'ю, фекаліями, сечею, слиною, спермою та молоком. Особливо сильно інфіковані оболонки плода і навколоплідна рідина, тому людина найчастіше заражається саме у разі надання допомоги під час отелень. Крім того, людина може заразитися і у разі контакту з контамінованою тваринною сировиною: м'ясо, шкіра, молоко.

Резистентність. Коксієли дуже стійкі в зовнішньому середовищі та продуктах тваринного походження, що забезпечує їх збереження, особливо за низьких температур. На сухій поверхні зберігаються протягом 15 діб, понад 1 рік залишаються життєздатними на вовні при температурі 4–6° С, у сухих фекаліях кліщів – 586 діб, у питній воді – до 100 днів, у коров'ячому молоці за кімнатної температури – 125 днів, під час кип'ятіння гинуть за 10 хвилин. Більшість застарілих і сучасних засобів дезінфекції інактивують збудник лише за 1–2 години.

При пастеризації контамінованого коксієлами молока їх кількість зменшується, однак повного знезараження не відбувається. Вони залишаються

неушкодженими в свіжому кефірі, в сирі та інших молочнокислих продуктах протягом 30 днів. Приблизно стільки ж зберігається збудник і в свіжому м'ясі заражених тварин при температурі 4 – 8° С, а в замороженому вигляді і більш тривалий термін. В солоному м'ясі, при збереженні його в 10%-му розчині кухонної солі в умовах заморозки до 150 днів. У маслі, виготовленому з інфікованого молока, при зберіганні його в холодильнику збудник виживає протягом 41 дня.

Цю хворобу вважають на даний момент одним з найпоширених зоонозів в світі. Для аерогенного зараження людини достатньо лише 10 мікробних тіл, що обумовлює можливість застосування коксієл Бернета, як біологічної зброї в так званому списку В (збудник II групи патогенності).

Збудник хвороби – *Coxiella burnetii* є внутрішньоклітинним паразитом із вираженим тропізмом до тканин легень, плаценти та молочної залози. Нині виведений з роду *Rickettsiella* та віднесений до особливого роду *Coxiella*, родини *Coxiellaceae*, *порядку* Legionellales, класу *γ-Proteobacteria.*

Coxiella burnetii є унікальною бактерією за своїми біологічними властивостями, поєднуючи облігатний внутрішньоклітинний паразитизм з адаптацією до кислого значення pH в фаголізосомах чутливих клітин-мішеней та розвитком популяції шляхом поперечного бінарного поділу. Паразитує лише в цитоплазмі клітин, має проникну клітинну стінку й утворює характерні, часто парні включення.

Морфологія. Коксієли поліморфні мікроорганізми, мають вигляд коків, паличок. Грамнегативні, нерухомі. Утворюють спори. Подібно до вірусів, проходять крізь бактеріальні ультрафільтри, що не властиве, до речі, для рикетсій (рис.2.66).

Морфологічно виділяють так звані спорові і вегетативні форми коксієл. При електронній мікроскопії у вегетативних форм, тобто форм активного росту і розмноження, виявляється виразна тришарова оболонка, до якої зсередини прилягає шар гранулярної цитоплазми з ліпополісахаридом, обмежений плазматичною мембраною.

При подальшому розвитку інфекційного процесу, з виснаженням можливостей для подальшого росту і розмноження інфікованої клітинної культури, коксієли переходять в спорову форму, яка характеризуються ущільненням всіх елементів збудника, потовщенням оболонки його, згортанням генетичного матеріалу. Спорові форми зазвичай опиняються за межами зруйнованих клітин хазяїна, тобто в навколишньому середовищі. У подальшому вони можуть бути знову фагоцитовані і знову почати свій цикл внутрішньоклітинного розвитку.

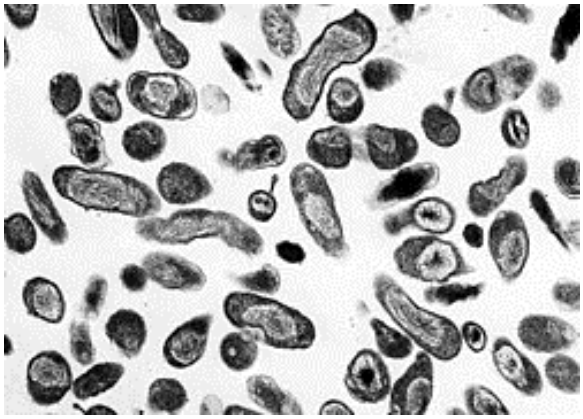


Рис. 2.66. Мікрофотознімок *Coxiella burnetii* *(Джерело: https://uk.wikipedia.org/wiki/)*

Культуральні властивості. Культивувати коксієли в лабораторних умовах, можна тільки на клітинних середовищах (найчастіше – у жовткових мішках курячих ембріонів, які розвиваються). З лабораторних тварин найбільш чутливі морські свинки.

Розрізняють 6 штамів *C. burnetii: Hamilton, Vacca, Rasche, Biotzere, Corazon, Dod.* Є певні антигенні відмінності між коксієлами, поширеними в Старому і Новому Світі. Однак антигенна активність коксієл Бернета не є величиною стабільною. Існує зміна антигенної активності в реакції зв'язування комплементу (РЗК), яке назване *фазовою варіацією або мінливістю*, що в даний час пов'язується з наявністю у коксієл антигенів I і II фази.

Культура коксієл, антиген з яких у РЗК виявляв антитіла в сироватках лише в пізньому періоді реконвалесценції, була віднесена до I фази, а культури коксієл, антиген з яких в РЗК виявляв антитіла в сироватках, як раннього, так і пізнього періоду реконвалесценції, отримав назву II фази.

Коксієли мають поверхневий та глибинний антигени і в такому вигляді вони виявляються в організмі хворих людей й тварин. У II фазі вони мають тільки глибинний антиген, який превалює при пасажах на курячих ембріонах, де вони втрачають поверхневий антиген. При розмноженні в культурах клітин мишачих ембріонів і макрофагоподібних клітинах відзначено «асиметричний» тип ділення клітин-мішеней. Виникаючі дочірні клітини стають нерівно цінними. Одні з них, як і раніше, залишаються інфікованими коксієллами, тоді як інші – вільні від збудника. Такий механізм забезпечує персистенцію коксієлл в культурі клітин, оскільки відповідно заражена клітинна культура не гине. Імовірно такою особливістю взаємин чутливої клітини і коксієлл можна пояснити хронізацію коксієльозу в організмі людини.

Діагностика Ку-лихоманки (коксієльозу) у великої рогатої худоби (ВРХ) базується на комплексному підході: клінічні ознаки (аборти, затримання посліду) підтверджуються лабораторно за допомогою ПЛР (виявлення збудника *C. burnetii* у молоці, плаценті) або серологічними методами (ІФА, РНІФ) для визначення антитіл.

Матеріал для дослідження. У лабораторію для досліджень надсилають: Сироватку крові (парні сироватки крові) від хворих тварин або тих, що абортували. Плаценту (послід), навколоплідні води **та** органи абортованого плода (печінка, легені, вміст сичуга), консервовані 50 %-м розчином гліцерину. Проби молока хворих корів (особливо при підозрі на приховане носійство)

Методи лабораторної діагностики КУ-лихоманки:

- **Пряма мікроскопія мазків** з крові, молока, поверхні котиледонів, плаценти, забарвлених за Романовським-Гімзою;
  - **ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція):** найефективніша у перші 2 тижні інфікування або при хронічному перебігу, виявляє ДНК збудника в молоці, плаценті, абортах, крові або вагінальних виділеннях сироватці, спинномозковій рідині.
  - **Серологічні дослідження:**
  - **1) ІФА (імуноферментний аналіз:** використовується для виявлення антитіл у сироватці крові.

- **2). РНІФ (реакція непрямої імунофлуоресценції):** високочутливий метод. Використовується найчастіше.
- **Біопроба:** зараження лабораторних тварин: морські свинки і курячі ембріони.

- **Бактеріологічний метод:** посів крові, який проводиться рідко через високу небезпеку зараження персоналу (потребує лабораторій з високим рівнем захисту).
- **Патологоанатомічний метод:** Дослідження плаценти (характерні зміни – потовщення, некроз).

Клінічна діагностика:

- Звертають увагу на масові аборти (переважно в другій половині вагітності), затримання посліду, метроїти, народження слабкого або мртвого приплоду; часто перебігає безсимптомно, інфекція може набувати хронічної форми.

Важливі зауваження:

- Через безсимптомний перебіг у багатьох корів, діагноз ставлять на основі виключення інших причин абортів (бруцельоз, лептоспіроз, хламідіоз).
- Використання РЗК (реакції зв'язування комплементу) менш популярне через нижчу чутливість.

Під час серологічного дослідження з 7 – 13-ї доби хвороби виявляються специфічні антитіла в діагностичних титрах 1 : 16 і вище.

Молоко від підозрюваних у зараженні тварин можна досліджувати на наявність рикетсій за допомогою біопроби на морських свинках. Для одержання чистої культури рикетсій патологічний матеріал від загиблих заражених морських свинок пасажують на курячих ембріонах.

У всьому світі це захворювання контролюють за допомогою моніторингу випадків абортів й саме серед жуйних тварин.

Для встановлення діагнозу враховують епізоотологічне обстеження місцевості, особливо на наявність кліщів, які є основними переносниками збудника Ку-лихоманки, епідеміологічних даних: аналіз випадків захворювання людей, а також, важливими будуть клінічні ознаки хвороби. Крім цього, враховують, наявність абортів, плацентиту, ретенцій плаценти, народження нежиттєздатних та слаборозвинених телят, які невдовзі гинуть від пневмоній, ну й, звісно, ж лабораторна діагностика.

Диференційна діагностика КУ-лихоманки *с*прямована, в першу чергу, на виключення усіх захворювань, які проявляються або можуть проявити себе *абортами, оскільки клінічні ознаки не є специфічними:*

1) У жуйних тварин (включаючи овець, кіз та велику рогату худобу): лептоспіроз, бруцельоз, сальмонельоз, лістеріоз, хламідіоз, вірусна діарея великої рогатої худоби, неінфекційні причини абортів;

- **вірусні інфекції***:* катаральна гарячка овець (блутанг) або вірусна діарея великої рогатої худоби;
- **неінфекційні причини** абортів, як-от генетичні розлади, дефіцит поживних речовин або ендокринопатії та інші рикетсіозні інфекції**;**

2) ***У дрібних тварин (собаки коти):*** бруцельоз, бартонєльоз, герпесвірусні інфекції, лептоспіроз, неоспороз, чума м'ясоїдних, парвовірусна інфекція, неінфекційні причини втрати вагітності**.**

3) ***У всіх видів тварин:*** грип (на ранніх стадіях, до появи легеневих симптомів), атипові пневмонії (бактеріальні та мікоплазменні), бабезіоз (особливо у великої рогатої худоби), сибірка, ботулізм.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти проглядають за допомогою мікроскопа готові препарати фарбовані за методом Романовського-Гімзи, мікрокартину замальовують в альбом і описують будову збудника.*

Питання для самоконтролю

1. Загальна характеристика патогенних рикетсій.
2. Ознаки диференціації рикетсій від хламідій.
4. Правила відбору і транспортування патматеріалу в лабораторію для лабораторної діагностики хламідіозів
5. Морфологія і тинкторіальні властивості рикетсій.
6. Методи діагностики рикетсіозів.
7. Характеристики збудника Ку-лихоманки ВРХ.
8. Особливості лабораторної діагностики Ку-лихоманки ВРХ.
9. Диференціальна діагностика Ку-лихоманки.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ДЕРМАТОМІКОЗІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів з правилами відбору патологічного матеріалу і методами мікологічного дослідження на дерматомікози (трихофітія, мікроспорія), кандидоз і плісеневі мікози.*

Матеріали та обладнання. *Культури грибів (Trichophyton. Verrucosum, Microsporum canis, Candida albicans) вирощені на середовищі Сабуро або іншому), патологічний матеріал: зразки шерсті тварин, 10-20%-й розчин NaOH або KOH, розчин спирт-гліцерину, спиртівки. препарувальні голки, мікологічні крючки, предметні і покривні скельця, атлас, світлові мікроскопи.*

Мікóзи (лат. *mycoses*, однина *mycosis*; від грец. μύκης — «гриб» + *-os-* — суфікс на означення захворювання незапального характеру). Це інфекційні захворювання тварин і людей, а рідше рослин, що спричиняються мікроскопічними грибами, які активно паразитують в організмі.

У наукових публікаціях із медицини та ветеринарії використовують понад 3400 назв грибів – збудників мікозів, що належать до відділів *Zygomycota, Ascomycota і Basidiomycota.*

До групи мікозів відносять: дерматомікози (трихофітія, мікроспорія, парша), аспергільоз, кандидомікоз, епізоотичний лімфангоїт, ріноспоридіоз,

споротрихоз, гістоплазмоз, північно-американський бластомікоз, криптококоз, мукоромікоз, сапролегніоз і бранхіомікоз риб, аспергільоз, меланоз бджіл, мускардини тутового шовкопряда.

Відповідно до класифікації мікозів за етіологічними ознаками розрізняють:

▪ **дерматофітні мікози (дерматомікози) –** хвороби шкіри та її похідних, які викликаються патогенними грибами родів *Trichophyton, Microsporum, Achorion;*

▪ **дріжджові мікози –** мікози, які викликаються грибами *Candida (C.albicans, C.tropicalis, C.parapsilosis);*

▪ **плісеневі мікози –** хронічні захворювання шкіри та інших органів, які викликаються грибами родів *Penicilium, Aspergillus, Cephalosporum, Sporolariopsis, Hendersonula, Alternaria, Fusarium.*

Збудники мікозів належать до нижчих і вищих грибів, а також до актиноміцетів, які широко поширені в природі. Природним резервуаром збудників мікозів є ґрунт. В організмі тварин можуть викликати патологічний процес з локалізацією переважно в шкірі, волосяному покриві, органах дихання, шлунково-кишкового тракту, сечостатевих органах і навіть у мозковій тканині. Мікози спостерігаються круглий рік, але частіше в осінньо-зимовий період.

У ветеринарії найбільш поширеними є дерматомікози (трихофітія, мікроспорія, фавус), а також, мікози, що викликаються аспергіловими, пеніциловими і мукоровими грибами, кандідами, актиноміцетами.

ЗБУДНИКИ ДЕРМАТОМІКОЗІВ

Дерматомікози – заразні хвороби шкіри та її похідних, що викликаються патогенними грибами *дерматоміцетами (дерматофітами).* Уражаються усі сільськогосподарські тварини, собаки, хутрові звірі, гризуни, птиця і навіть риби багатьох видів. Хворіє і людина.

Збудники – вищі недосконалі гриби *(клас Deuteromycetes, Fungi imperfecti).* В залежності від роду грибів розрізняють мікроспорію, трихофітію, фавус або паршу, які тривалий час були відомі під загальною назвою «стригучий лишай». Зона паразитування збудників обмежена тканинами, в яких є кератин.

Таксономічна класифікація. Згідно сучасної таксономічної класифікації збудниками дерматомікозів, є гриби родів *Trichophyton, Microsporum, Achorion,* які належать до Домену *Eucaria,* Типу *Ascomycota,* Класу *Ascomycetes,* Порядку *Onygenales.*

За епідемічними критеріями виділяють *геофільні* дерматофіти, життєвий цикл яких відбувається у ґрунті, через який заражається людина. *Зоофільні* дерматофіти паразитують у тварин, людина найчастіше заражається від котів, собак, домашньої рогатої худоби. *Антропофільні* дерматофіти, які паразитують тільки у людей, зараження відбувається контактним способом.

Збудники дерматомікозів дуже стійкі до дії дезінфікуючих засобів, тривало зберігаються в зовнішньому середовищі. Вони можуть розмножуватися не тільки на шкірі та її придатках, а й у ґрунті, соломі, гною та інших мертвих субстратах.

Захворювання, що спричиняються патогенними грибками, відомі з давніх часів. Заразність хвороби встановлено у коней на початку IX ст., у великої рогатої худоби й собак – у другій половині XX ст. У цей самий час було доведено можливість зараження стригучим лишаєм людини від хворих тварин.

У 1845 р. Грубі і Мальмстем відкрили й описали збудника трихофітії, а французький дослідник Сабуро запропонував класифікацію збудників дерматомікозів.

Діагностика дерматомікозів. Для точної діагностики ветеринарний лікар проводить комплексне обстеження, що може включати:

Візуальний огляд: оцінка стану шкіри та шерсті.

Зішкріб зі шкіри: матеріал з ураженої ділянки досліджується під мікроскопом.

Посів на живильне середовище: зразок культивують для виявлення та ідентифікації збудника.

Лампа Вуда: у деяких випадках ураження, спричинені *Microsporum*, можуть світитися зеленим флуоресцентним світлом.

ПЛР-тестування: метод для виявлення ДНК грибка.

Трихофітія *(Trichophytia, трихофітоз, стригучий лишай)* – це контагіозна хронічна грибкова інфекція шкіри та її похідних, що викликається грибами роду *Trichophyton*. Проявляється округлими вогнищами безволосих плям, вкритих жовто-сірими лусочками і пухкими азбестоподібними кірочками, або тяжким гнійним запаленням шкіри й утворенням товстих висівкоподібних кірок, які локалізуються, переважно, на голові, шиї та спині. Хвороба поширена у великої рогатої худоби (особливо телят), собак, котів та небезпечна для людей (зооноз).

Перебіг захворювання може бути у трьох клінічних формах: *дисемінованій, плямистій і везикулярній.:*

- *дисемінована форма* – окремі осередки, збільшуючись, зливаються й утворюють більші);

- *плямиста* – окремі вогнища уражень являють собою чітко окреслені плями від 1 до 5 см в діаметрі (можливе самоодужання);

- *везикулярна* – (зустрічається дуже рідко), супроводжується формуванням пухирців, які швидко лопаються, а ексудат, що витікає, підсихає у вигляді лусочок.

Збудники – гриби *роду Trichophyton*, зокрема, *Tr. verrucosum* (син. *Tr. faviforme*) є основним збудником трихофітії у великої рогатої худоби, буйволів, зебу, оленів. В інших видів тварин захворювання зумовлюють *Tr. mentagrophytes* (син. *Tr.gypseum), Tr. equinum, Tr. gallinae.*

Трихофітія частіше діагностується у великої рогатої худоби. Хворіють також вівці, коні, хутрові звірі, собаки, коти, птахи. Із лабораторних тварин до трихофітії сприйнятливі морські свинки та кролі.

Стійкість. Збудники трихофітії надзвичайно стійкі у зовнішньому середовищі. В уражених волоссі й лусочках шкіри зберігаються впродовж 7 років, у патологічному матеріалі – 1,5 року. В заражених приміщеннях, предметах догляду за тваринами, кормах залишаються життєздатними 4–8

років, у гною та гноївці – 3–8 міс, у ґрунті – 3–4 міс. Стійкі проти заморожування, висушування та дії сонячного випромінювання. При кип'ятінні інактивуються через 2 хв, при нагріванні до 80 °С – через 7 – 10 хв. Під дією сухої пари при 110°С гинуть через 1 год, при 80 °С – через 2 год. Руйнуються лугами (1 – 3%-й розчин), формальдегідом (1 – 3%-й розчин), сірчано-карболовою сумішшю (5%-й розчин), хлоридом йоду (10%-й розчин) – через 15 – 30 хв.

Діагностика трихофітії. Діагностика трихофітії (стригучого лишаю) у тварин є комплексною і базується на клінічному огляді, використанні спеціального обладнання та лабораторних дослідженнях.

Відбір матеріалу для дослідження. Для підтвердження діагнозу на трихофітію у лабораторію надсилають обламані шерстинки разом із шматочками шкіри, які відбирають пінцетом на межі здорової й ураженої ділянок шкіри від тварин, яких не лікували. Матеріал поміщають в стерильні пробірки або бактеріологічні чашки, чи пластиковий контейнер.

Основні методи діагностики:

Клінічний огляд: Виявлення круглих безволосих плям, вкритих сірими лусочками або скоринками, переважно на голові, шиї та кінцівках (при огляді, обов’язково використовувати рукавички).

Люмінесцентна діагностика (лампа Вуда): це попередній метод огляду в темній кімнаті під ультрафіолетовим світлом. Хоча цей метод частіше використовують для мікроспорії (вона світиться зеленим), при трихофітії свічення може бути відсутнім або слабким, тому метод не є вирішальним.

Мікроскопічне дослідження: дослідження зішкрібів шкіри та волосин під мікроскопом для виявлення спор грибка (Trichophyton spp.) навколо і в середині волосся.

З уражених ділянок (на межі зі здоровою шкірою) беруть зішкріб шкіри та зразки волосся. Матеріал обробляють лугом (10–20% розчин KOH або NaOH) для розчинення кератину. Під мікроскопом виявляють спори грибка всередині волосся (тип *endothrix*) або навколо нього (тип *ectothrix*), а також нитки міцелію.

Культуральний метод (посів): найбільш точний метод, що дозволяє визначити вид грибка. Зразки висівають на спеціальні поживні середовища (наприклад, середовище Сабуро). Грибки роду *Trichophyton* ростуть повільно — від 5 до 30 діб при температурі 26 – 28ºС.

Диференціальна діагностика: трихофітію важливо відрізняти від інших захворювань зі схожими симптомами: мікроспорія (інший вид грибка), демодекоз (підшкірний кліщ), піодермія (бактеріальне ураження шкіри), алергічні дерматити.

***Мікроскопічне дослідження*.** Мікроскопічне дослідження патологічного матеріалу на гриби проводять у нативних і фарбованих препаратах.

Для більш чіткого виявлення елементів гриба частину матеріалу перед мікроскопією освітлюють 10–20 %-м розчином їдкого калі або натру при слабкому підігріванні над полум'ям спиртівки (або заливають гарячим розчином і залишають на 20–30 хв). Луг розчиняє епідермальні лусочки, слиз, гній, просвітлює пігмент волосу і робить гриби доступними для дослідження.

Після обробки матеріалу, кірочки, лусочки з шерстинками поміщають на предметне скло, розрівнюють препарувальними голками, додають краплю спирту-гліцерину, накривають покривним склом й досліджують під малим і середнім збільшеннями мікроскопа.

Для приготування фарбованого препарату використовують 5%-й розчин метиленового синього або інший барвник.

Результат мікроскопії. В уражених шерстинках *гіфи міцелію трихофітонів – прямі, з перетинками, розміщуються рядами вздовж волосини, ззовні або із середини* (рис. 2.67).

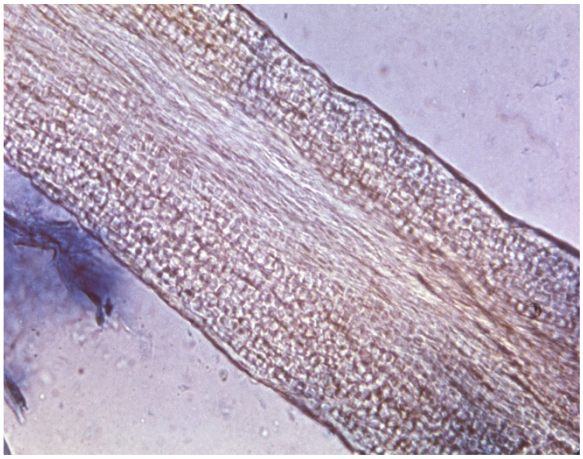


Рис. 2.67. Ланцюжки спор збудника трихофітії в ураженій волосині

Розташування спор всередині волосини називається *endothrix.* Розташування спор на поверхні – *ectothrix.* Якщо спори гриба розташовані в середині і на поверхні волосини (обов'язково вздовж і правильними рядами), їх положення називається *neoendothrix.*

При розпаді міцелію утворюються одноклітинні круглі або овальні спори, які розміщуються в шерстинці ланцюжками, а в його основі формують своєрідний чохол із спор (рис. 2.68).

Виділення чистої культури. Гриби з роду *Trichophyton* – добре культивуються на спеціальних селективних і диференціально-діагностичних живильних середовищах типу: сусло-агара, агара Сабуро або м'ясо–пептонно – гліцеринового агару з 2% глюкози (МПГА), середовище Dermakit, DSM. Для посіву патматеріал подрібнюють, 5–6 частинок поміщають на поверхню агарового середовища на відстані 1–2 см, культивують в аеробних умовах, при оптимальній температурі 25–28 °С. Ріст грибів повільний, колонії з'являються на 5 – 30-й день після посіву, утворюючи різного кольору пігменти.

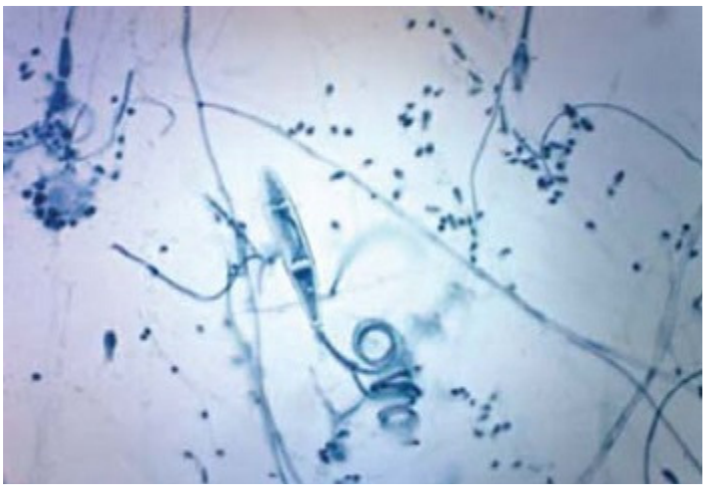


Рис. 2.68. Спори *Tr. mentagrophytes* (дрібні –3- 4 мкм і макроконідії)

(Джерело:https://studymicrobio.com/trichophyton-mentagrophytes-laboratory-diagnosis/#google_vignette)

Колонії *Tr. verrucosum (Tr. faviforme*) щільні, складчасті, піднімаються над середовищем, сірувато-білого кольору. Гриб повільно-ростучий. Ознаки росту, зазвичай з'являються на 10 – 15-й день або дещо пізніше. Субстрат ний міцелій проростає вглиб і щільно з'єднується із середовищем.

Tr. mentagrophytes (син. Tr.gypseum), росте швидше, перші ознаки росту спостерігаються на 3–5-й день. Колонії рівні, плоскі, з характерним гудзикоподібним ущільненням у центрі, білі, зверху, ніби то посипані гіпсом або мукою. Старі колонії жовтіють, зворотня сторона на середовищі Сабуро набуває червоно-коричневого відтінку. Одним із характерних ознак гриба є утворення спіралей (рис. 2.69).

Tr. equinum – колонії бархатисті, білого кольору, з радіальними заглибленнями. Протилежний бік колонії забарвлений у жовтий колір.

При мікроскопічному дослідженні колоній виявляють септований рівний міцелій, гіфи якого шириною 2,5 – 4,0 мкм. Характерними є макро- і мікроконідії, хламідоспори, а також округлі і чотирикутні клітини, що утворюють ланцюжки. Окремі гіфи деяких трихофітонів закручено у спіраль або кільця (рис. 2.70, 2.71).

Крім стандартних, класичних загальновживаних середовищ, для виділення чистої культури патогенних грибів, використовують також сучасні (нові) селективні середовища Dermakit і Megacor, які забезпечують швидку ідентифікацію дерматофітів. Dermakit є селективним середовищем для дерматофітів – Dermatophyte Selective Medium (DSM), використовується для виділення та загальної ідентифікації дерматофітів, містить спеціальні поживні середовища, які сприяють росту дерматофітів, селективні антибіотики, які інгібують ріст непатогенних сапрофітних міцетів і бактерій та індикатор pH, який реагує при наявності дерматофітів.

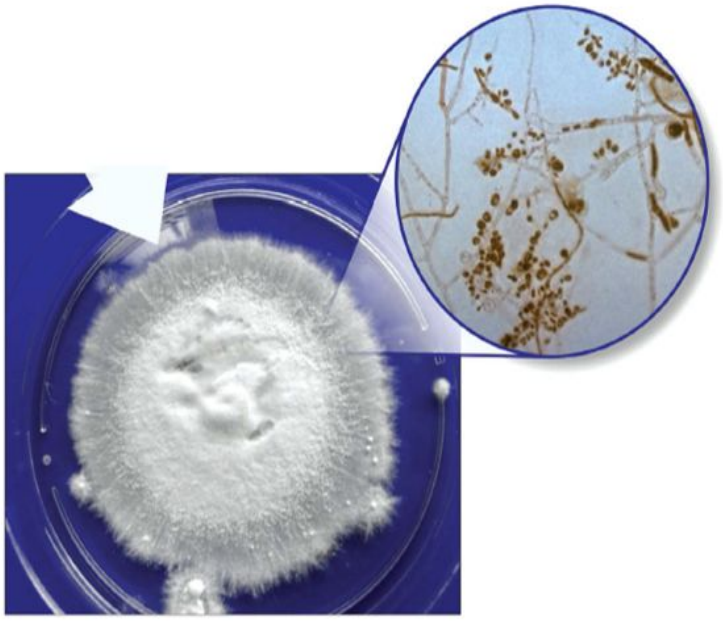


Рис. 2.69. Колонії *Tr.mentagrophytes*
(*Джерело (https://milkua.info/uk/post/ak-zapobigti-ta-likuvati-trihofitiu-u-vrh)*

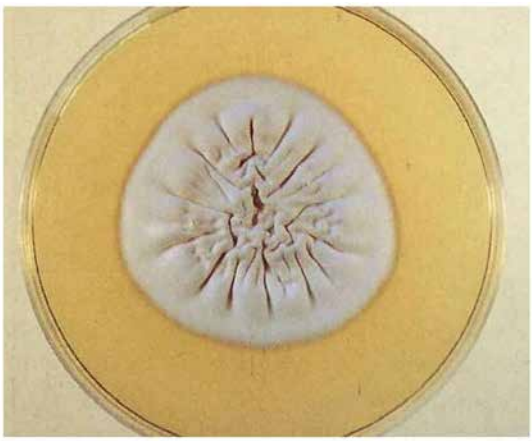


Рис. 2.70. Ріст колоній *Tr. equinum на 14-16 день.*
(*Джерело (https://studfile.net/preview/1152822/)*

Його дія проявляється у зміні кольору на червоний, в результаті росту *Microsporum, Trichophyton і Epidermophyton*, які виробляють лужні метаболіти.

Середовища Dermakit і Megacor призначені для диференціальної діагностики дерматологічних захворювань у собак, котів, кроликів і коней. Dermakit є

швидким, простим і легким у виконанні аналізу, який дозволяє ветеринарному лікарю діагностувати інфекцію та розпочати протигрибкове лікування.

Диференційна діагностика мікроспорії, трихофітії і фавуса ґрунтується тільки на даних лабораторних досліджень і як допоміжний тест – люмінесцентна мікроскопія.

При дослідженні посівів із патологічного матеріалу диференціальними особливостями є показники швидкості і характеру росту культури, біохімічні властивості, морфологія грибів та інші показники.

Існує ряд захворювань котів та собак, які імітують дерматомікози, оскільки за зовнішніми ознаками останні можуть бути дуже різноманітними, зокрема: *трихофітію слід диференціювати від*: мікроспорії, міжпальцевої екземи, міжпальцевих мікозів, гепатозних дерматитів, нейродерматитів, алергічних реакцій з виникненням алергічних дерматитів, ендокринних змін, що супроводжуються дерматитами, гіповітамінозів А і групи В, ектопаразитарних інвазій (демодекоз, розчухи вух при отодектозі, гематопіноз, афоніптерози, саркоптоз та ін.).

Мікроспорія (Мікроспороз) – хронічне висококонтагіозне грибкове захворювання шкіри, при якому спостерігається осередкове поверхневе запалення шкіри (почервоніння, лущення), ламкість шерсті, а іноді й кігтів.

Мікроспорія найчастіше зустрічається у коней, котів, собак, свиней, кролів, хутрових звірів, лабораторних, а також деяких диких тварин, найбільш вразливі до мікроспорії молоді тварини (кошенята, цуценята), тварини з ослабленим імунітетом, а також ті, хто утримується в неналежних умовах, дуже небезпечна для людини. Захворювання реєструється в усіх країнах світу.

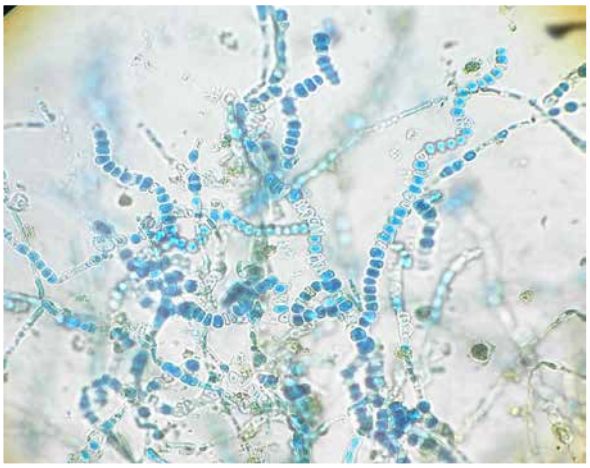


Рис. 2.71. *Tr. equinum (мікроскопія)* *(Джерело (https://studfile.net/preview/1152822/)*

Плямиста і дисемінована форми клінічно подібні до трихофітії. При атиповій та субклінічній формах ексудативні і запальні явища виражені слабо. Можуть бути ураженими лише окремі шерстинки без утворення лусочок та кірочок. Гриб уражує шкіру та її похідні, тобто зона паразитування обмежена тканинами, в яких є кератин.

Мікробіологічна характеристика збудника мікроспорії. Збудник мікроспорії вперше був відкритий чеським вченим Гурбі у 1841 році, а в 1896 році у Великобританії вчені Фокс та Блехел виділили збудника мікроспорії із шерсті котів. У Франції в 1897 році ветеринарні лікарі Боден та Альмі виявили собак, хворих на мікроспорію та описали цю хворобу. Пізніше було виділено чисту культуру збудника.

Збудники стійкі в довкіллі. В ураженому волосі зберігаються до 6 – 8 років, у ґрунті – до 140 днів, у гноївці та гної – до 3– 8-ми міс., у воді – 6 міс.

Основними збудниками хвороби є патогенні грибки з роду *Microsporum*:

▪ у коней – *Microsporum equinum, Microsporum canis, Microsporum gypseum;*

▪ у собак, котів, кролів, свиней, хутрових та хижих звірів, морських свинок, оленів, мавп – *Microsporum lanosum (M. canis, M. pelineum);*

▪ у котів, собак, коней, телят, морських свинок, щурів, мишей – *Microsporum gypseum (Achorion gypseum, M. lanosum Bodin);*

▪ у кролів – *M. canis*і*M. ajelloi;*

▪ у свиней – *Microsporum nanum.*

У патологічному матеріалі гриби роду *Microsporum* знаходяться всередині ураженої волосини у вигляді септованого міцелію та округлих одноклітинних спор, здатних різко заломлювати світло, діаметром 2 – 4,4 мкм, що *розміщуються хаотично-мозаїчно* як усередині волосу, так і у вигляді чохла біля основи зовнішнього боку волосу (рис. 2.72).



Рис. 2.72. Уражена волосина - гриби роду *Microsporum*
(*Джерело:https://vethealth.sumy.ua/lishaj-u-koshek-i-sobak/*)

Мікроспоруми утворюють товстостінні або тонкостінні макроконідії, які складаються з 8–15 (*M. canis*) або 4 – 6 (*M. gypseum*) клітин. Їх колонії пофарбовані в жовто-оранжевий колір.

Культуральні властивості. Гриби роду *Microsporum* легко культивуються в лабораторних умовах на глюкозовому агарі Сабуро та сусло-агарі за температури 26 – 28^{o} С, в аеробних умовах. В більшості грибів ріст колоній проявляється на 5-й день. При *мікроскопічному дослідженні* виділених культур виявляють розгалужений міцелій з септами, у деяких видів – з ракетоподібними потовщеннями. Іноді знаходять велику кількість макроконідій із заокругленими кінцями й декількома перетинками, хламідоспори та мікроконідії.

M. gypseum утворює плоскі, згодом борошнисті колонії жовто-брунатного кольору, із невеликим заглибленням у центрі. Під час мікроскопічного дослідження колоній виявляється рівний септований ракетоподібний міцелій, а також мікроконідії грушоподібної форми або видовжені, розміром 3–5 х 2,5–3,5 мкм. Макроконідії багатокамерні, товстостінні, мають овальну або веретеноподібну форму (рис. 2.73).

Уражений грибом волос флуоресціює, що пов’язано з продукуванням флуоресціюючого пігменту інтеридину.

Ріст ***M. equinum*** спостерігається на 6–7-му добу після посіву у вигляді складчастих, сірувато-жовтих колоній, які щільно прилягають до середовища і вкриті сіро-білим повітряним міцелієм. Під час мікроскопічного дослідження колоній виявляється гіллястий септований міцелій, поодинокі грушоподібні багатокамерні мікроконідії розміром 1–2 х 3–5 мкм. Макроконідії багато-

клітинні, мають овальну або веретеноподібну форму з 2 – 3-ма перетинками, розміром 5–8 х 15–35 мкм. Хламідоспори інтеркалярні, рідше термінальні.

M. lanosum на 3–5-ту добу після посіву формує округлі з концентричними колами сірувато-білі або жовті колонії з борошнистим центром, які стеляться пухким міцелієм. Під час мікроскопічного дослідження колоній виявляється гіллястий септований міцелій, а також мікроконідії розміром 1–3х1,5–5 мкм, які мають овально-грушоподібну форму. Макроконідії численні, веретеноподібної форми, ворсинчасті або із шипоподібною двоконтурною стінкою, багато камерні, звужені з обох кінців, розміром 11–16 х 53–85 мкм.

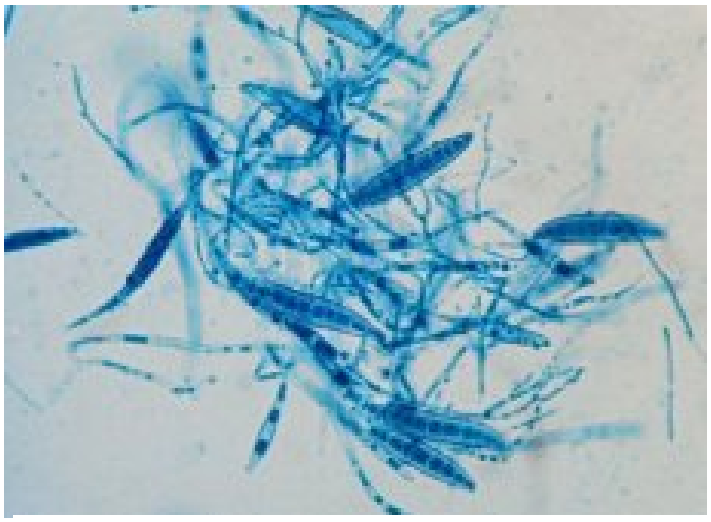


Рис. 2.73. *M.gypseum* (макро- і мікроконідії)
(Джерело:https://ua.iliveok.com/health/zbudnyky-mikrosporiyi-microsporum_70338i16099.html)

M. canis – колонії гриба швидко ростуть, драглеподібні й пухкі, сіро-білі, нечасто – жовтувато-рожеві. Зрілі культури більш борошнисті, іноді з неглибокими складками. Зворотний бік колонії темно-коричневий. Міцелій – 2,5–3,5 мкм, рівний, іноді бамбукоподібний. Макроконідії – 40–90 х 7–12 мкм, складаються з 4–12 клітин. У зрілих культурах зустрічаються округлі хламідоспори розміром 8–12 мкм. Грушоподібні або округлі мікроспоридії розміром 3–6 х 2,6–3,5 мкм зустрічаються нечасто.

M. nanum утворює жовтуваті або темно-червоні, пухкі в центрі колонії. Під час мікроскопічного дослідження виявляється септований ракетоподібний міцелій, мікроконідії поодинокі, овальні або видовжені, розміром 4–5 х 1,5–2 мкм. Макроконідії рясні, грушоподібної або овальної форми, багатокамерні, розміром 12–20 х 4–14 мкм.

В країнах Європи провідним збудником мікроспорії є *Microsporum canis,* який у котів становить 65–98,7 і 45–88,3% – у собак. Тому особливий інтерес у грибкових захворюваннях тварин займає мікроспорія, а саме – мікроспорія котів, на яку припадає 90% всіх шкірних захворювань.

Діагностика.

Діагноз мікроспорії комплексний, встановлюють на підставі клініко-епізоотологічних даних та результатах лабораторних досліджень.

Основні методи діагностики мікроспорії:

Клінічний огляд: Оцінка характеру уражень шкіри – червоні плями, локальне випадання шерсті (алопеції), лущення, скоринки, найчастіше на голові, вухах або лапах.

Люмінесцентна діагностика (лампа Вуда): Експрес-метод, при якому уражені грибком *Microsporum canis* волосся світяться яскравим смарагдово-

зеленим кольором. Однак не всі види грибків світяться, тому метод не є 100% точним.

Мікроскопія зішкріба: лабораторне дослідження лусочок шкіри та шерсті під мікроскопом для виявлення спор та міцелію грибка.

Бактеріологічний посів (культуральне дослідження): найбільш надійний метод, при якому матеріал (шерсть, лусочки) поміщають у поживне середовище для вирощування колоній грибів та їх точної ідентифікації.

Трихоскопія: Огляд волосин під мікроскопом для виявлення пошкоджень, характерних для дерматофітозів.

Матеріал для дослідження. До лабораторії ветеринарної медицини в пробірках із пробками або в невеликих целофанових пакетах, чи пластикових контейнерах надсилають волос, лусочки, кірочки, а також зіскрібки з країв різних уражених ділянок шкіри, які не піддавались лікуванню.

Обробка матеріалу і схема дослідження аналогічна, як і при трихофітії.

Мікроскопічна картина: в уражених шерстинках знаходять прямі, розгалужені гіфи міцелію з рідкими перетинками. При розпаді останнього утворюються округлі одноклітинні спори, що розміщуються хаотично (у вигляді «сотоподібних скупчень»). Ця особливість враховується при диференціації трихофітії від мікроспорії (при трихофітії спостерігається ланцюжкове розміщення спор вздовж волосини).

Враховують також культуральні й морфологічні властивості представників обох родів.

У разі підозри мікроспорії у собак і котів, особливо з атиповою чи скритою формою мікроспорії, застосовують метод люмінесцентного дослідження, як діагностичний тест дерматофітозів ранньої діагностики.

Люмінесцентний аналіз досить важливий при дослідженні матеріалу, відібраного від тварин з атиповим перебігом захворювання.

Суть методу зводиться до того, що шерстинки, уражені грибами роду Microsporum, здатні зумовлювати смарагдово-зелене світіння в ультрафіолетових променях (за трихофітії такого світіння не спостерігається). Для цього, досліджуваний матеріал поміщають у бактеріологічну чашку і оглядають під ультрафіолетовими променями ртутно-кварцової лампи ПРК'2 із світлофільтром УСФФЗ (фільтр Вуда) на відстані 20 см в затемненій кімнаті (рис. 2.74).

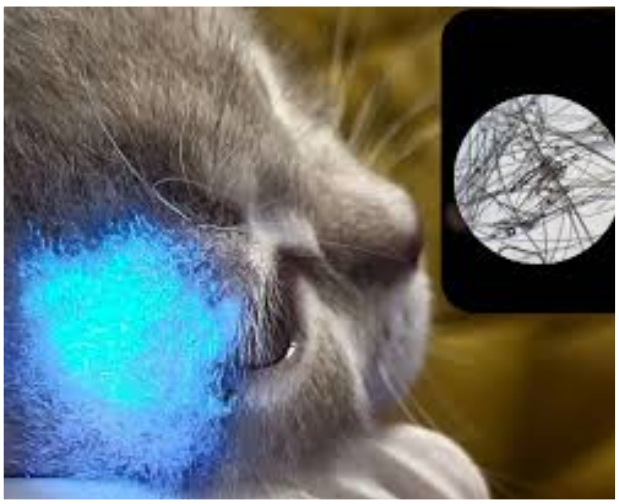


Рис. 2.74. Ураження шерсті грибами роду *Microsporum*
(люмінесцентний аналіз). (*Джерело: https://www.instagram.com/p/DPYav3HiOL1)*

Було встановлено, що світіння залежить від пігменту птиридину, який продукується здебільшого філаментами грибів роду *Microsporum*. Пізніше визначили, що не усі види грибів цього роду можуть зумовлювати свічення.

Наприклад, у хворих на мікроспорію тварин, які мають чорне забарвлення хутра, свічення не спостерігають. Крім того, необхідно враховувати й те, що деякі лікарські препарати (саліцилова кислота, риванол, вазелін тощо) також можуть давати флуоресценцію, тому, люмінесцентний аналіз проводять до лікування.

Диференційна діагностика.

Мікроспорію диференціюють від трихофітії, корости, гіповітамінозу А, дерматитів інфекційного походження на підставі лабораторних і клініко-епізоотологічних відомостей.

За гіповітамінозу А, дерматитів не виявляють збудників у мазках із патматеріалу, *корости* – виявляють кліщів. Люмінесцентний метод дозволяє диференціювати мікроспорію від *трихофітії і фавусу*, за яких уражений волос не дає зеленого світіння. Під час проведення діагностичних досліджень слід звертати увагу на можливість асоційованого перебігу мікроспорозу та альтернаріозу (хутрових звірів, кролів, собак, коней).

Фавус (парша, білий гребінь, трихофітія) – хронічне, інфекційне захворювання птиці, рідко – ссавців, а також людини, яке характеризується ураженням шкіри, пір'я, кігтів, волосся, внутрішніх органів. В природних умовах найчастіше хворіють кури, качки, індики. Можливе ураження і ссавців. Із лабораторних тварин до фавусу чутливими є білі миші, морські свинки та кролі (зараження проводять через скарифікацію шкіри).

Фавус у птиці характеризується появою на гребені, сережках і навколо дзьоба невеличких плям, які, зливаючись, утворюють сірувато-білі зони, вкриті кірочками *(скутулами*). Через деякий час гребінь і сережки вкриваються суцільним, сіро-білим, товстим, сухим нашаруванням (струпом), яке важко відділяється. В інших місцях, біля основи пір'їн, утворюється чохол із спор збудника, внаслідок чого пір'я випадає. Часто спостерігається генералізована форма, при якій захоплюється значна поверхня опіреної частини голови, тулуба. Також уражаються носоглотка, зоб і тонкий відділ кишечнику.

Вперше етіологічну роль патогенного гриба при фавусі встановили німецькі вчені Шьонлейн у 1839 році та Грюббі у 1841 році. Фавус, як інфекційне захворювання птиці, був зареєстрований у Франції, Великобританії, Туреччині, США, Новій Зеландії, Австралії та Росії.

Збудники захворювання *– гриби роду Achorion (син. Trichophyton),* зокрема A. gallinae, A. quinckeanum, A. schoenleinii). Останній є збудником дерматомікозу у людини.

Для діагностики в лабораторію надсилають зіскрібки з уражених ділянок шкіри.

Основні методи лабораторної діагностики

Мікроскопія: дослідження зішкрібів шкіри, волосся або частинок скутул, оброблених 10-20% розчином лугу (KOH).

При *мікроскопії* препаратів із патологічного матеріалу знаходять тонкий міцелій з рідкими септами, в гіфах якого видно прямокутні клітини з двоконтурною оболонкою. Спори гриба розміщено рядами або групами всередині волосини (*Endothrix),* мають округлу або багатогранну форму, діаметром 4 – 8

мкм. Гіфи гриба розміщуються вздовж пір'їн і часто оточено пухирцями повітря. Кінці гіф мають веретеноподібні утворення (рис. 2.75).

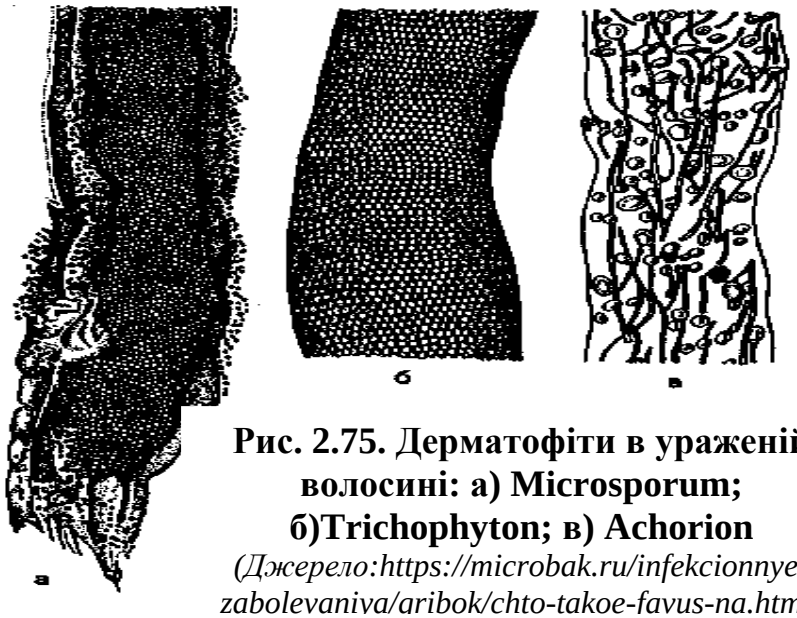


Рис. 2.75. Дерматофіти в ураженій волосині: а) Microsporum; б)Trichophyton; в) Achorion
(Джерело:https://microbak.ru/infekcionnye-zabolevaniva/aribok/chto-takoe-favus-na.html)

Люмінесцентна діагностика (Лампа Вуда): деякі види збудників фавусу можуть давати слабке зеленувате свічення, проте цей метод не є 100% надійним для парші, тому потребує перевірки іншими способами.

Дослідження культуральних властивостей (посів): вирощування гриба на поживних середовищах. Це "золотий стандарт", який дозволяє точно визначити вид збудника, хоча ріст гриба може тривати від 2 до 4 тижнів.

Для культивування грибів, представників роду *Achorion* використовують ті ж середовища, що й для інших грибів. Гриб росте повільно, починаючи з 4 – 5-го дня. На агарі Сабуро *A. gallinae* утворює гладенькі білі колонії, які пізніше набувають рожевого чи червоного кольору, робляться складчастими й борошнистими. Міцелій товщиною 1,5 – 2 мкм, у дозрілому стані колоній – схожий на ланцюжки.

Диференційна діагностика

Фавус важливо відрізняти від інших захворювань зі схожими симптомами:

Трихофітія та мікроспорія: відсутність характерних скутул та інший тип ураження волосся.

Екзема та дерматити: відсутність грибкового міцелію при лабораторному дослідженні.

Короста (nsoroptes, sarcoptes): виявляється за наявністю мікроскопічних кліщів у зішкрібах.

Завдання для самостійної роботи студентів. *Студенти знайомляться з морфологічними властивостями збудників трихофітії, мікроспорії і фавусу. При цьому готують препарати методом роздавленої краплі з патматеріалу і культур грибів. За допомогою мікроскопа або лупи досліджують культуральні властивості тест-культур – колоній грибів, які виросли на середовищах. Вивчають морфологічні і культуральні властивості збудника кандидамікозу.*

Питання для самоконтролю

1. Які захворювання називають мікозами?
2. Основні збудники дерматомікозів
3. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію при уточненні діагнозу на трихофітію?
4. Лабораторна діагностика дерматомікозів.
5. Як диференціюють збудників трихофітії, мікроспорії та фавуса?
6. Культуральні властивості збудників дерматомікозів.
7. Відмінні особливості збудників дерматомікозів.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА МІКОТОКСИКОЗІВ

Мета заняття: *ознайомити студентів з основними морфологічними, культурально-біохімічними характеристиками збудників мікотоксикозів, правилами відбору матеріалу для дослідження і методами лабораторної діагностики мікотоксикозів.*

Матеріали та обладнання: *культури грибів родів Stachybotrys, Fusarium, Aspergillus, Penicillium, Dendrodochium на агарі Чапека в чашках Петрі; препарувальні голки або мікологічні крючки, предметні і покривні скельця, таблиці, слайди за даною темою.*

Мікотоксикози – це група незаразних хвороб сільськогосподарських тварин, які виникають в результаті поїдання кормів, уражених плісеневими грибами, що містять продукти їхньої життєдіяльності — мікотоксини. До цією групи захворювань відносять: *ерготизм, клавіцепстоксикоз, аспергілотоксикоз, стахіботріотоксикоз, фузаріотоксикоз, дендродіхіотоксикоз, фальціальну екзему овець та ін.*

Захворювання часто мають субклінічний характер, і їх важко діагностувати. Слід зауважити, що у мікотоксикозів практично не буває сезонності, оскільки вони можуть зустрічатися, як при утриманні худоби на пасовищі, так і в приміщенні. До впливу мікотоксинів чутливі всі сільськогосподарські тварини та птиця.

Гострі або хронічні токсикози можуть бути результатом впливу кормів або підстилки, забрудненої токсинами, що утворюються під час росту різних сапрофітних або фітопатогенних грибів або плісняви на зернових, сіні, соломі, чи будь-якому іншому кормі. Гриби, які продукують мікотоксини, можуть уражати зернові, бобові, олійні культури, горіхи, фрукти та інші продукти як у полі, так і під час зберігання

Що характерно для мікотоксикозів:

- не можливо відразу визначити причину;.
- немає контактного способу зараження;
- лікування медикаментами чи антибіотиками мало впливає на перебіг захворювання;

▪ спалахи отруєнь, часто мають сезонний характер, оскільки певні кліматичні зміни можуть сприяти росту грибів і виробленню токсинів;

▪ дослідження вказують на специфічний зв'язок з певним кормом;

▪ велика кількість грибів або їх спор, знайдених під час огляду кормів, не обов'язково вказує на вироблення токсинів.

Однак відсутність плісняви не виключає мікотоксикозу, оскільки умови зберігання або приготування корму, наприклад, кислотна обробка або високий рівень гранулювання, можуть знищити цвіль, поки термостійкий мікотоксин зберігається.

Мікотоксикози зустрічаються практично в усіх сільськогосподарських тварин, але чутливість їх до мікотоксинів неоднакова і залежить від виду, віку, стану природної резистентності організму та деяких інших факторів. Наприклад, велика рогата худоба більш чутлива до фузаріотоксикозу ніж вівці, проте вона стійкіша проти стахіботріотоксикозу порівняно з кіньми.

Штами та види грибів і токсинів. Майже 100 видів плісеневих грибів мешкають на рослинах, а відповідно – на кормових культурах. Залежно від часу ураження рослин. Їх поділяють на польові, які активно розвиваються під час вегетації, і амбарні штами – у період зберігання. Відомо понад 400 різних видів мікотоксинів, однак, найчастіше мікотоксини продукують цвілеві (мікроскопічні) гриби родів *Aspergillus, Penicillium та Fusarium.*

Найбільш небезпечні мікотоксини для тварин:

- Афлатоксини *(Aspergillus)*
- Дезоксиніваленон, зеараленон, фумонізини *(Fusarium)*
- Охратоксини *(Aspergillus, Penicillium)*
- Стахіботріотоксин *(Stachybotrys)*

Як видно з таблиці, кукурудза є дуже сприятливим субстратом для розвитку токсигенних грибів. Тому кукурудзяне зерно, комбікорми та силос можуть містити широкий спектр мікотоксинів. Найменування мікотоксикозу походить від назви токсину або гриба-продуцента токсину. Найбільш поширені та небезпечні мікотоксини зазначені у таблиці 2.26.

Таблиця 2.26. Найбільш поширені та небезпечні мікотоксини

Мікотоксин	**Гриби продуценти**	**Контаміновані продукти**
Афлатоксини	*Aspergillus flavus , A. parasiticus*	Кукурудза, арахіс, лісові горіхи, колосові злаки, молоко
Фумонізини	*Fusarium verticilloides (F.proliferatum)*	Кукурудза
Охратоксин А	*Aspergillus ochraceus, A.carbonarius, Penicillium verrucosum*	Кукурудза, колосові злаки, фрукти та соки, кава, вино
Трихоцетини (DON, T-2)	*Fusarium sporotrichioides , F. culmorum , F. graminearum , F.crookwellense, F.acuminatum, F.sporotrichioides*	Кукурудза, колосові злаки
Зеареленон	*Fusarium culmorum, F.graminearum*	Кукурудза, колосові злаки

Мікотоксикози, збудники та джерела зараження наведені в таблиці 2.27.

Таблиця 2.27. Мікотоксикози, збудники, джерела зараження та чутливі тварини

Захворювання/токсин	Гриби або цвіль	Заражені токсичні харчові продукти	Уражені тварини
Афлатоксикоз /Афлатоксини	*Aspergillus flavus* , *A parasiticus*	Заплісняві арахіс, соєві боби, насіння бавовни, рис, сорго, кукурудза (кукуруд-за), інші злаки	Вся птиця, свині, велика рогата худоба, вівці, собаки
Ерготизм /Алкалоїди оману	*Claviceps purpurea*	Насіннєві головки багатьох трав, зернових	Велика рогата худоба, коні, свині, птиця
Естрогенізм і вульвовагініт /Зеараленон	*Fusarium graminearum* Ідеальний стан: *Gibberella zeae*	Заплісняві кукуру-дза (кукурудза) і гра-нульовані зернові корми, кукурудза стояча, кукурудзяний силос, інші зерна	Свині, велика рогата худоба, вівці, птиця
Екзема обличчя (пітомікотоксикоз) /Споридеміни	*Pithomyces chartarum*	Токсичні спори на підстилці пасовищ	Вівці, велика рогата худоба, вирощені олені
Фузаріотоксикоз, блювота і відмова від корму у свиней /Немакроциклічні трихотецени	*Fusarium sporotrichioides* , *F. culmorum* , *F. graminearum* , *F nivale*; інші види грибів	Зернові культури, заплісняві грубі корми	Свині, велика рогата худоба, коні, птиця
Мікотоксичний люпіноз /Фомопсини	*Фомопсис лептостроміформний*	Насіння, стручки, солома, і бадилля люпину	Вівці, зрідка велика рогата худоба, коні, свині
Міротеціотоксикоз, дендродохіотоксикоз /Макроциклічні трихотецени (веррукарини, ророідини тощо)	*Myrothecium verrucaria* , *M. roridum*	Заплісняві житня стерня, солома	Вівці, велика рогата худоба, коні
Охратоксикоз / Охратоксин, цитринін	*Aspergillus ochraceus* та інші, *Penicillium viridicatum* , *P. citrinum*	Пліснявий ячмінь, кукурудза (кукурудза), пшениця	Свині, домашня птиця
Треморгени, асоційовані з пеніциліями /Пенітрем А	*P. crustosum* , *P. cyclopium* , *P. commune*	Зернові злаки, сир, фрукти, м’ясо, горіхи, охолоджені продукти; компост	Велика рогата худоба, собаки, коні, вівці

Набряк легенів у свиней / Фумонізин B_1 і Фумонізин B_2	*Fusarium verticilloides*	Кукурудза	Свині
Стахіботріотоксикоз /Макроциклічні трихотецени (сатратоксин, роридин, веррукарин)	*Stachybotrys atra (S. alternans)*	Заплісняві грубі корми, інші забруднені корми	Коні, велика рогата худоба, вівці, свині

Діагностика мікотоксикозів у тварин є **комплексним процесом,** оскільки симптоми часто неспецифічні й можуть нагадувати інші інфекційні або незаразні хвороби. Основним завданням є підтвердження зв'язку між споживанням корму та появою клінічних ознак.

Основні методи діагностики:

1. **Аналіз кормів (ключовий етап).** Оскільки мікотоксини потрапляють в організм переважно з їжею, дослідження кормової бази є обов'язковим:

2. **Імуноферментний аналіз (ІФА/ELISA):** найпоширеніший метод для швидкого кількісного визначення основних токсинів (афлатоксини, зеараленон, дезоксиніваленол тощо).

3. **Експрес-тести:** використовуються для оперативного скринінгу кормової сировини безпосередньо в господарствах.

4. **Хроматографічні методи (РХ, ГХ):** застосовуються в арбітражних випадках для високої точності визначення концентрації токсинів.

Комплексний підхід до діагностики:

Епізоотологічні дані: встановлення зв'язку між використанням нової партії корму та масовим захворюванням тварин, що не піддається лікуванню антибіотиками.

Клінічні ознаки: залежать від типу токсину, але загальними є зниження продуктивності, діарея, паралічі, відмова від корму, блідість слизових оболонок, зміни в репродуктивній системі (особливо у свиней — вульвовагініти, аборти).

Патологоанатомічний розтин: Виявляє збільшену печінку, крововиливи у внутрішніх органах, некротичні зміни.

Основні методи досліджень включають швидкі експрес-тести (ІФА) та високоточні лабораторні дослідження (ВЕРХ, ГХ-МС) для виявлення афлатоксинів, зеараленону, Т-2 токсину тощо.

Лабораторні дослідження (ключовий етап): включає: біологічні, мікологічні й фізико-хімічні дослідження. Особливу увагу приділяють виявленню токсину, їх природи і концентрації, оскільки гриб-продуцент в більшості випадків до моменту дослідження гине, і, крім того, один і той же мікотоксин може синтезуватися різними видами грибів.

Мікологічний аналіз кормів включає виділення та ідентифікацію грибів-продуцентів мікотоксинів. З цією метою, із відібраних зразків корму здійснюють посів у чашки Петрі з агаром Чапека, сусло-агаром або рідке середовище для грибів. Токсичність виділених культур визначають методом шкірної проби на кроликах чи іншим методом.

При біологічному дослідженні визначають токсичність корму на різних моделях: кроликах, акваріумних рибах гуппі породи Винер, білих мишах або сільськогосподарських тваринах.

Фізико-хімічний аналіз проводять з метою якісного і кількісного визначення мікотоксинів у кормах та інших матеріалах (люмінесцентний аналіз, хроматографія тощо).

Діагноз вважається підтвердженим, якщо клінічні симптоми збігаються з результатами виявлення високих концентрацій мікотоксинів у кормах.

Матеріалом для дослідження на мікотоксикози є зразки усіх кормів, які входили у добовий раціон тварини протягом одного місяця, до появи клінічних ознак хвороби, а також залишки кормів із годівниць, вміст шлунково-кишкового тракту тварин, які загинули.

Відбір зразків. В лабораторію надсилають зразки корму масою 1-2 кг.

Із зерна беруть не менше трьох зразків по вертикалі з різних місць. Висипають на рівну поверхню, ретельно перемішують лопаткою, розрівнюють у вигляді плоскої піраміди, яку ділять на чотири частини по діагоналі. Дві протилежні відкидають, решту з'єднують, знову перемішують. Так роблять доти, поки не залишиться потрібна для аналізу кількість, тобто 1-2 кг.

Вага зразка соковитих кормів повинна бути в межах 0,5-1,0 кг, грубих – 100-200 г (грубі корми загортають у папір). Ці зразки також відбирають із середнього зразка відповідного корму.

Зернові корми та їх різновиди поміщають у скляні банки, які герметично закривають (у поліетиленових пакетах корми швидко псуються).

Етапи дослідження. Перший етап досліджень передбачає проведення органолептичного аналізу для визначення кольору і запаху корму, після чого визначають його токсичність. З цією метою ставлять біопроби на кролях, акваріумних рибках гуппі, білих мишах, в деяких випадках – на сільськогосподарських тваринах. Обов'язково оформляється супровідний документ, в якому зазначається мета дослідження, вид корму, масу всієї партії корму, місце відбору зразка, основні клінічні ознаки у хворої тварини тощо. В разі загибелі тварини, прикріплюють копію акту розтину трупа.

Проба на кролях за П. Д. Ятелем. 50 г подрібненого корму заливають 150 мл діетилового або петролейного ефіру, ацетону і екстрагують на шюттель апараті при кімнатній температурі протягом 3 год. Після фільтрації розчинник повністю випарюють, а нашарування, що залишилось, розчиняють у невеликій кількості ефіру. Одержану рідину наносять на вистрижену поверхню шкіри кроля (площею 6х6 см) дворазово, з інтервалом у 24 год. За піддослідними тваринами спостерігають протягом 3 – 5 днів.

Залежно від кількості токсину в кормі реакція буде неоднаковою:

- при наявності ознак злущування, незначного набряку, гіперемії і болючості корм визнають як *слабо-токсичний*.
- якщо ж названі ознаки різко виражені, а після набряку на шкірі з'являються тріщини, аж до некрозу з утворенням виразок, то корм вважають **високотоксичним.**

Повторно кролів, що були в експерименті, не використовують, бо у них розвивається анергія або гіперергія до мікотоксинів.

Пробу на акваріумних рибках гуппі породи Вінер застосовують переважно для визначення токсичності зернофуражу й комбікорму.

Із відповідного зразка корму ацетоном екстрагують мікотоксин, який концентрують через випарювання розчинника і наступного розведення залишку в 5 мл ацетону, який вносять в 500 мл води з п'ятьма рибками гуппі. Спостереження здійснюють протягом 24 год. Якщо за цей час загине одна рибка, корм вважають нетоксичним, при загибелі 2 – 4 особин — слаботоксичним і при загибелі усіх рибок – токсичним.

Проба на білих мишах. Досліджуваний корм згодовують 10 білим мишам або тварин напувають водною витяжкою із відповідного зразка. Спостереження ведуть 10 днів. При відсутності летальних випадків мишей забивають. Якщо при патологоанатомічному розтині змін не виявляють, то корм оцінюють, як нетоксичний. При наявності геморагічного гастроентериту корм відносять до слаботоксичного. Токсичний корм викликає загибель значної кількості мишей, у яких виявляють геморагічні процеси не лише в шлунку, а й у паренхіматозних органах.

Загальні принципи мікологічного аналізу кормів. Мікологічний аналіз передбачає безпосереднє виявлення токсиноутворюючих грибів у досліджуваних кормах (переважно грубих) і виділення їх в чистих культурах. За морфологічними та культуральними властивостями у більшості випадків диференціюють гриби різних видів.

Для виготовлення препаратів для мікроскопії з уражених соломинок скальпелем або лезом безпечної бритви зскрібають міцеліальну масу гриба на предметне скло, додають краплю суміші спирту-гліцерину, накривають покривним склом й досліджують під малим і середнім збільшеннями мікроскопа.

Аналогічні препарати готують також із колоній грибів, вирощених на спеціальних живильних середовищах, таких, як агар Чапека, сусло-агар, агар Сабуро тощо. Ряд грибів культивують на стерильному фільтрувальному папері, змоченому у середовищі Ван-Ітерсона. Для пригнічення росту бактеріальної флори до середовищ додають антибіотики, зокрема пеніцилін і стрептоміцин.

СТАХІОБОТРІОТОКСИКОЗ

Стахіботріотоксикоз — це небезпечне отруєння сільськогосподарських тварин (коней, ВРХ, свиней), спричинене поїданням кормів (частіше, сіно, солома, полова тощо), уражених грибком *Stachybotrys chartarum*. Токсини уражають травний тракт, викликаючи некрози слизових оболонок, крововиливи, серцеву та печінкову недостатність, що часто призводить до високої смертності.

Перебіг захворювання важкий, може бути гострим або підгострим. В Україні хворобу вперше було виявлено в 1930 р. у коней.

Люди також можуть хворіти на **пневмотоксикоз**, якщо вдихають пил від зараженої соломи або сіна (конідії та фрагменти міцелію гриба). Це проявляється запаленням дихальних шляхів, кашлем та болем у грудях.

Розвивається гриб на клітковині грубих кормів, утворюючи при цьому токсичні речовини. Токсин цього грибка має властивість місцевої припікаючої дії, і крім того, може швидко всмоктуватись у кров, де він накопичується і проявляє свою кумулятивну дію на важливі паренхіматозні органи та центральну, периферичну і вегетативну нервову систему. При цьому в серці, нирках та печінці виникає дистрофія. Характерними ознаками для хвороби є некротичні вогнища на слизовій рота, щоках, носі, на боках язика, м'якому піднебінні, органах травної системи.

Комулятивна дія цього токсину призводить до тромбопенії і лейкопенії. На слизових оболонках виникає багато некротичних осередків внаслідок нейротрофічних розладів, які не пов'язані з механічним пошкодженням. Вони часто симетричні, більш глибокі і ареактивні, швидко збільшуються.

До стахіоботріотоксикозу найчутливіші коні, велика рогата худоба, менш чутливі вівці, свині, буйволи й курчата. В умовах експерименту, захворювання було відтворене у собак, голубів, котів, морських свинок і кролів. Із лабораторних тварин, найбільш чутливі кролики.

У коней захворювання починається появою кірочок і тріщин на губах, спостерігаються кон'юнктивіти, риніт, набряк морди, дещо пізніше з'являються некрози слизової оболонки рота, геморагічне запалення шлунково-кишкового тракту. Незадовго до загибелі у тварин підвищується температура тіла.

У великої рогатої худоби можливий профузний пронос з домішкою крові, утворюються виразки на губах і носовому дзеркалі, втрачається секреція молока. Більшість тварин гинуть.

Збудник хвороби – мікроскопічний гриб ***Stachybotrys alternans***, що належить до недосконалих грибів ***класу Deuteromycetes, роду Stachybotrus.*** Назва вперше опублікована 1837 року. Існують токсичні і нетоксичні варіанти.

***Б*іологічна класифікація.** Домен – ядерні **(**Eukaryota), Царство – гриби (Fungi), Відділ – Аскомікотові гриби (*Ascomycota),* Порядок – Гіпокрейні (*Hypocreales*), Родина – *Stachybotryaceae*, Рід – *Stachybotrys.*У природних умовах міститься в ґрунті, а також на вологих рослинних субстратах, уражає солому, полову, відмираючі бур'яни та стерню, добре розвивається за вологості понад 40 % і температурі близько 27 °С.

Уражені корми набувають оливково-коричневого або чорного кольору, через 7–12 діб на них утворюється чорний із зеленуватим відтінком наліт, як сажа.

У процесі життєдіяльності *St. alternans* продукує сильний *стахіботріотоксин*, який відноситься до групи трихоцетинів. Токсин поступово утворюється в стеригмах, конідіях, конідієносцях і накопичується в субстраті. Він не руйнується під час переміщення через шлунок і кишки тварин, стійкий до дії різних органічних та неорганічних кислот, до нагрівання і навіть до автоклавування, однак швидко знешкоджується під дією лугів і хлору (наприклад: 0,5%-м розчином гідроксиду калію або натрію, 5 %-м розчином вапна).

Спори гриба можуть до 6 місяців зберігатися в ґрунті, скиртах соломи та стеблах рослин, не гинуть під дією температури мінус 35 °С, сонячного, рентгенівського та ультрафіолетового випромінювання.

Культурально-морфологічні особливості. Stachybotrys alternans – аероб, добре розвивається на природних субстратах збагачених клітковиною (солома, сіно, зерно) і на штучних спеціальних поживних середовищах: Ван-Ітерсона, на агарі Чапека або сусло-агарі.

У чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому середовищем Ван-Ітерсона, Stachybotrys alternans утворює колонії від темно-сірого до чорного кольору.

На агарі Чапека гриб утворює округлі колонії з двома зонами. Центральна зона у вигляді складок, чорного кольору, периферія має білу прозору кайомку. Колір середовища навкруг колоній коричневий, часто з темно-вишневим відтінком (рис. 2.76).

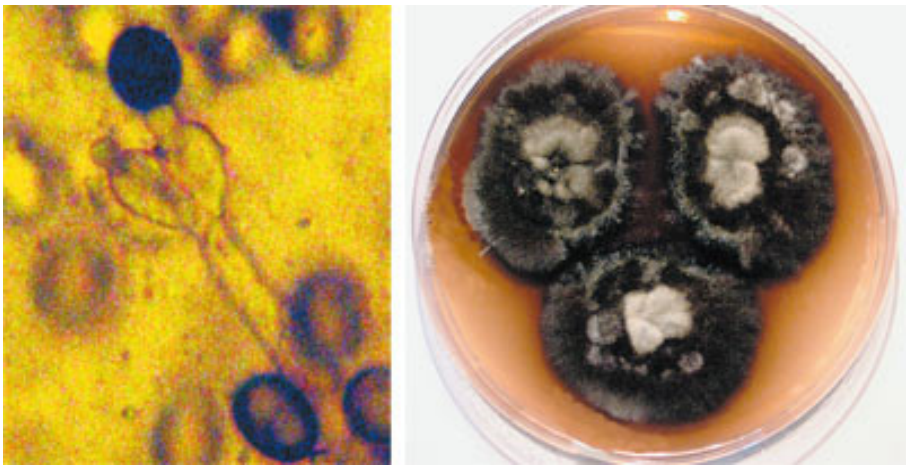


Рис. 2.76. Мікрокартина і колонії гриба *Stachybotrys alternans* на агарі Чапека. (*Джерело: https://ppt-online.org/1181893)*

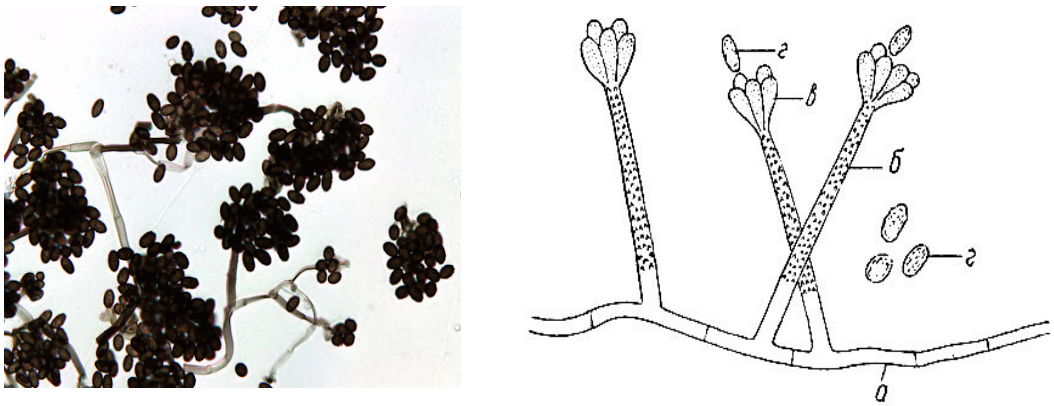


Рис. 2.77. Конідієносці і конідії *Stachybotrys alternans*
(Джерело: http://www.iam-europa.com/schimmelpilze-a-bis-z/stachybotrys/)

На сусло-агарі *Stachybotrys alternans* утворює чорні колонії з борозенками, які радіально розходяться від центру.

Міцелій гриба септований. Колір міцелію молодої культури світло-оливковий, з віком стає оливково-бурим. Конідієносці також змінюються залежно від віку і можуть бути простими і розгалуженими з рідкими перегородками. На верхівці конідієносців утворюються яйцеподібні стеригми,

які зростаються біля основи. У молодої культури вони гладенькі, світло-оливкового кольору. Зрілі конідії мають шиповидно-бородавчасту форму, непрозорі, чорного кольору. Кожна стеригма утворює по 3 – 7 конідій. Вони склеюються слизом і утворюють голівку на пучку стеригми (рис. 2.77).

Лабораторна діагностика.

Лабораторна діагностика стахіботріотоксикозу у тварин є комплексною та включає мікологічні, токсикологічні, гематологічні і гістопатологічні дослідження (табл.2.28).

Таблиця 2.28. Узагальнена таблиця методів діагностики стахіоботріотоксикозу

Тип дослідження	Об'єкт дослідження	Метод	Результат
Мікологічний	Корми	Виділення та ідентифікація збудника (гриба)	Виявлення токсичного гриба роду *Stachybotrys*
Токсикологічний	Корми	LC/MS-MS	Виявлення токсинів (Макроциклічні трихотецени: роридин, сатратоксин, веррукарин)
Гематологічний	Кров	Загальний аналіз крові	Лейкопенія, нейтропенія
Гістопатологічний	Органи і тканини	Мікроскопія	Запальні та некротичні зміни
Молекулярно-біологічний	Корми	ПЛР	Ідентифікація генів для *S. chartarum S.alternans*

Для підтвердження діагнозу відбирають зразки уражених кормів (які вкриті чорним сажистим нальотом), а також біологічний матеріал від хворих або загиблих тварин.

Дослідження кормів

Візуальний огляд: Важливо оглянути грубі корми (солому, полову, сіно), що могли бути уражені плісеневим грибом роду *Stachybotrys* який виробляє токсичні речовини. Уражені корми можуть мати цвілий, злежаний або затхлий запах та вигляд (чорного кольору).

Мікологічне дослідження: Дозволяє виділити та ідентифікувати гриби роду *Stachybotrys*. Зразки відправляють у лабораторію, де проводять їхній посів на живильні середовища. Ідентифікація може бути проведена за морфологічними ознаками, або за допомогою сучасних методів, таких як ПЛР.

Токсикологічний аналіз: Використовується для виявлення сатратоксинів. Для цього застосовують високочутливі методи, зокрема рідинну хроматографію з тандемною мас-спектрометрією (LC/MS-MS).

Мікологічний аналіз грубих кормів. Для виготовлення препарату із зразків уражених соломинок, гострим скальпелем знімають міцеліальну масу гриба (у вигляді темного нашарування) й кладуть на предметне скло, в краплю розчину

спирту-гліцерину (1:1) або 50%-го водного розчину гліцерину, накривають покривним скельцем і досліджують під середнім збільшенням мікроскопа.

Аналогічні препарати готують також із колоній грибів, вирощених на спеціальних живильних середовищах, таких як агар Чапека, сусло-агар, агар Сабуро тощо.

Мікроскопічна картина: конідієносці гриба гіллясті, з перетинками; кожна гілка закінчується пучком стеригм, на яких в один шар розміщуються конідії. Останні – темно-коричневого кольору, овальні, з шипами.

Культивування. Для одержання культур гриба використовують різні штучні живильні середовища типу Чапека, сусло-агар, агар Сабуро, Ваксмана. Для пригнічення росту бактеріальної флори до середовищ додають антибіотики, зокрема пеніцилін і стрептоміцин. Гриб добре розвивається на стерильному фільтрувальному папері, зволоженому середовищем Ван-Ітерсона. Колонії гриба – від темно-сірого до чорного кольору. На інших середовищах токсичні і нетоксичні варіанти колоній стахіботриса дещо відрізняються.

Колонії токсиноутворюючих варіантів оточено ніжним міцеліальним кільцем, більш широким, ніж у нетоксичних різновидів. Центр колоній складчастий, з радіальними борозенками чорного кольору. Середовище навколо колоній – бурого або темно-вишневого кольору, причому його інтенсивність вища у токсичних варіантів.

Біопроба. Токсичність, як самого ураженого корму, так і міцеліальної маси колоній підтверджується шкірною пробою на кролях. При наявності в екстракті токсину через 48 – 72 год розвивається запальна реакція, яка характеризується гіперемією, набряком з наступним розвитком некрозу.

Стахіботріотоксин належить до стероїдів і поділяється на три фракції: перші дві нагромаджуються в міцелії, третя – в культуральній рідині. Токсин термостабільний, проте нейтралізується 0,5 %-м розчином їдкого натру та хлором.

Дослідження біологічного матеріалу

Відбір зразків: Від живих тварин відбирають кров, а від загиблих – шматочки уражених органів і тканин (печінка, селезінка, слизова оболонка травного каналу).

Гістопатологічне дослідження: Вивчаються мікроскопічні зміни в уражених тканинах. Для стахіботріотоксикозу характерні запальні та некротичні ураження.

Гематологічний аналіз: Проводять дослідження крові. Може спостерігатися різке зниження кількості лейкоцитів (лейкопенія), аж до повної відсутності клітин мієлоїдної групи.

Аналіз кісткового мозку: Дослідження пунктата кісткового мозку може виявити виснаження клітинних елементів.

Диференційна діагностика:

- у коней: аспергілотоксикоз, дендродохіотоксикоз, фузаріотоксикоз, клавіцепстоксикоз;
- у великої рогатої худоби: аспергілотоксикоз, хвороба Ауєскі, ящур, отруєння пестицидами;

- у свиней: аспергілотоксикоз, фузаріотоксикоз, пеніцилотоксикоз, кандидамікоз.

В усіх випадках, для встановлення остаточного діагнозу хвороби необхідно провести мікологічне дослідження кормів і підстилки. При отруєнні отрутохімікатами, які використовуються в сільському господарстві для знищення гризунів, можуть мати місце деякі клінічні ознаки, подібні до стахіоботріотоксикозу. Їх виключення проводять шляхом хіміко-токсикологічного дослідження матеріалу у ветеринарній лабораторії.

Діагноз стахіботріотоксикозу вважається підтвердженим, якщо виявлено комбінацію таких факторів: характерні клінічні ознаки, гематологічні зміни, ураження органів та виділення токсикогенного гриба *Stachybotrys* або виявлення його токсинів у кормах

Завдання для самостійної роботи студентів.

Студентам необхідно приготувати із культур грибів препарати «роздавлена крапля», вивчити під мікроскопом і замалювати в альбомі виявлені форми грибів, а також вивчити властивості грибів Stachybotrys, Fusarium, Aspergillus, Penicillium, Dendrodochium.

Характеристику збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення, специфічні методи діагностики описати в зошиті.

Питання для самоконтролю

1. Чим відрізняються мікотоксикози від мікозів?
2. Які мікотоксикози найбільш поширені?
3. Основні вимоги до відбору, упаковки й пересилання кормів для мікологічного дослідження.
4. Із яких етапів складається мікологічне дослідження?
5. Чому шкірна проба на кролях не виявляє всіх мікотоксинів?
6. Які живильні середовища використовують для культивування грибів?
7. Як готують препарати для мікроскопії грибів?
8. Як визначають токсичність досліджуваного корму або виділеної культури гриба?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бортнічук В. А., Скибіцький В. Г., Ібатулліна Ф. Ж. Практикум з ветеринарної мікробіології : навч. посіб. 2-ге вид., переробл. і допов. Вінниця : Нова книга, 2007. 240 с.
2. Ветеринарна мікробіологія : підручник / В. Г. Скибіцький, В. В. Власенко, Г. В. Козловська, Ф. Ж. Ібатулліна, С. Г. Ташута, М. В. Мельник. Київ : Нічлава, 2015. 420 с.
3. Ветеринарна мікробіологія: посіб. / В. М. Зоценко, І. О. Рубленко, А. В. Білан та ін. Біла Церква, 2017. 184 с.
4. Власенко В. В., Скибіцький В. Г., Власенко І. Г. та ін. Практикум «Мікробіологія м'яса та м'ясних продуктів». Вінниця : Едельвейс і К, 2008. 306 с.
5. Державні санітарні норми і правила «Порядок управління медичними відходами, у тому числі вимоги щодо безпечності для здоров'я людини під час утворення, збирання, зберігання, перевезення, оброблення таких відходів» : наказ МОЗ України від 31.10.2024 № 1827 // База даних «Законодавство України» / Верховна Рада України. URL: https://zakon.rada.gov.ua/go/z1938-24 (дата звернення: 07.04.2026).
6. ДСНП № 1827-2024. Державні санітарні норми і правила «Біологічна безпека при роботі з мікроорганізмами та біологічними агентами». Київ : МОЗ України, 2024.
7. ДСП 9.9.5.035-99. Державні санітарні правила «Улаштування, обладнання та утримання лабораторій (відділень, відділів), що працюють з мікроорганізмами I–IV груп патогенності». Київ : МОЗ України, 1999.
8. ДСП 9.9.5-080-02. Державні санітарні правила «Організація і проведення дезінфекційних заходів». Київ : МОЗ України, 2002.
9. Закон України «Про ветеринарну медицину» : Закон України від 04.02.2021 № 1206-IX. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1206-IX (дата звернення: 07.04.2026).
10. Івченко В. М., Шарандак В. В., Денисенко Г. М., Горбатюк О. І. Довідник санітарно-мікробіологічних методів дослідження харчових продуктів та об'єктів довкілля. Біла Церква, 2003. 300 с.
11. Козловська Г. В. Ієрсиніози тварин : навч. посіб. Київ : Компринт, 2016. 162 с.
12. Методи виявлення та диференціації ієрсиній: наук.-виробн. рек. / А. В. Ушкалов, Л. О. Давидовська, В. О. Ушкалов, В. В. Мельник, Г. В. Козловська, О. Г. Мартинюк, В. М. Шевчук, О. В. Дишкант, М. Ф. Стародуб. Київ : ЦП «КОМПРИНТ», 2024. 44 с.
13. Науково-практичні рекомендації щодо дослідження здатності грам-негативних мікроорганізмів – збудників зоонозів до утворення біоплівок : наук.-практ. рек. / С. О. Бояновський, Ю. Ю. Вішован, Т. В. Мазур, Л. М. Іщенко, В. О. Ушкалов та ін. Київ: Видавничий центр НУБіП України, 2022. 33 с.

14. Про затвердження державних санітарних норм і правил біологічної безпеки при роботі з мікроорганізмами : наказ МОЗ України від 2024 р. № 1585. Київ : МОЗ України, 2024.
15. Про затвердження Державних санітарних норм і правил утримання об’єктів, пов’язаних із використанням мікроорганізмів I–IV груп патогенності : наказ МОЗ України від 17.01.2008 № 26 (зі змінами станом на 2025 р.). Київ : МОЗ України, 2008.
16. Про затвердження Порядку здійснення державного санітарно-епідеміологічного нагляду : постанова Кабінету Міністрів України від 2023 р. № 376. Київ : КМУ, 2023.
17. Ситник І. Д., Климюк С. І., Тварко М. С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія : підручник. Тернопіль : ТДМУ, 2017. 392 с.
18. Скибіцький В. Г., Власенко В. В., Козловська Г. В. та ін. Ветеринарна мікробіологія. Київ : Нічлава, 2015. 420 с.
19. Скрипник В. Г., Рубленко І. О., Гаркавенко Т. О. та ін. Лабораторна діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сировини тваринного походження та об’єктів навколишнього середовища : наук.-метод. рек. Київ, 2014. 76 с.
20. Технологічний регламент «Виготовлення, випробування та зберігання культуральних середовищ для мікробіологічних досліджень» / Л. М. Виговська, А. В. Ушкалов, В. В. Мельник та ін. Київ : ФОП Ямчинський О. В., 2025. 99 с.

Козловська Ганна Володимирівна

Мельник Марія Василівна

Виговська Лілія Миколаївна

Ігнатовська Маріанна Володимирівна

Дишкант Ольга Василівна

ПРАКТИКУМ З ВЕТЕРИНАРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Підписано до друку 29.04.26 Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 16,5 Наклад 100 прим. Зам. № 260221

Видавець і виготовлювач Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
ДК № 4097 від 17.06.2011