

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

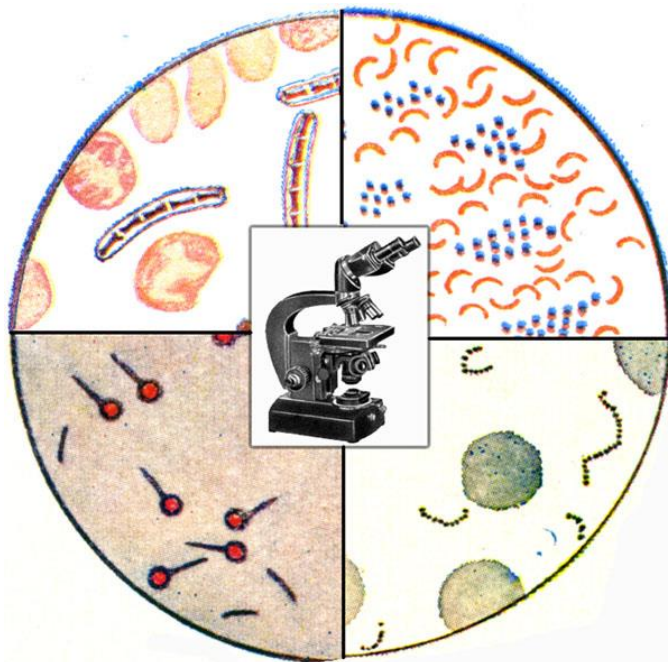
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,  
стандартизації та біотехнології

Кафедра ветеринарної медицини та гігієни

**ВЕТЕРИНАРНА  
МІКРОБІОЛОГІЯ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

**для виконання лабораторно-практичних занять  
для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти ОПШ  
«Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» спеціальності  
211«Ветеринарна медицина» денної форми здобуття вищої освіти**



**Миколаїв  
2024**

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 22.10.24 р., протокол № 3.

**Укладачі:**

**С. П. Кот** – к. б. наук, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни, Миколаївського національного аграрного університету;

**А. В. Іовенко** - к. вет. наук, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни, Миколаївського національного аграрного університету.

**Рецензенти:**

**І. В. Наконечний** – д.-р. б. наук, професор кафедри екології та природоохоронних технологій Національного університету кораблебудування ім. адмірала Макарова;

**С. С. Крамаренко** – д.-р. б. наук, професор, професор кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

**Відповідальний за випуск:**

**А. В. Іовенко** - к. вет. наук, доцент, завідувач кафедри ветеринарної медицини та гігієни, Миколаївський національний аграрний університет

## Зміст

Вступ	5
Заняття 1. Ветеринарна лабораторія. Мікроскопи та правила роботи з ними	6
Заняття 2. Морфологія бактерій. Простий метод фарбування	9
Заняття 3. Паличкоподібні бактерії. Складні методи фарбування	12
Заняття 4. Фарбування спор, капсул, включень. Вивчення рухливості бактерій	15
Заняття 5. Морфологія грибів і актиноміцетів	18
Заняття 6. Лабораторна апаратура і методи стерилізації	20
Заняття 7. Живильні середовища. Культивування мікроорганізмів і методи отримання чистих культур	27
Заняття 8. Культуральні і біохімічні властивості мікроорганізмів	33
Заняття 9. Методи зараження лабораторних тварин. Правила відбору і пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження. Дослідження патологічного матеріалу	39
Заняття 10. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків	42
Заняття 11. Санітарно-мікробіологічне дослідження води, повітря та ґрунту	44
Заняття 12. Імунітет. Серологічні реакції	50
Заняття 13. Патогенні коки	57
Збудник стрептококозу птиці	62
Збудник миту	63
Заняття 14. Родина кишкових бактерій	65
Збудники ешерихіозів	66
Збудники сальмонельозу	70
Заняття 15. Збудник лістеріозу	74
Заняття 16. Збудник бешихи свиней	77
Заняття 17. Збудник пастерельозу	80
Заняття 18. Збудник туляремії	81
Заняття 19. Збудник бруцельозу	84
Заняття 20. Збудник сибірки	89
Заняття 21. Патогенні анаероби	92
Збудник емфізематозного карбункула	93
Збудник злякисного набряку	94
Збудник брадзоту	95

	Збудники анаеробної ентеротоксемії	96
	Збудник анаеробної дизентерії ягнят	97
	Збудник правця	98
	Збудник ботулізму	99
	Збудник некробактеріозу	100
Заняття 22.	Збудник туберкульозу і паратуберкульозу	102
	Збудник туберкульозу	102
	Збудник паратуберкульозу	107
Заняття 23.	Збудник лептоспірозу	109
	Збудник кампілобактеріозу (вібріозу)	113
Заняття 24.	Збудник сапу	117
Заняття 25.	Збудник дизентерії свиней	120
Заняття 26.	Збудники мікоплазмозів	122
	Збудник контагіозної плевропневмонії великої рогатої худоби	123
	Збудник інфекційної агалакції овець і кіз	124
	Збудник ензоотичної пневмонії свиней	124
	Збудник респіраторного мікоплазмозу птиці	125
Заняття 27.	Збудник хламідіозу	126
Заняття 28.	Збудники рикетсіозів	130
Заняття 29.	Збудники мікозів	132
	Збудники дерматомікозів	132
	Збудники цвілевих мікозів	136
	Збудник кандидамікозу	137
	Збудник актиномікозу	138
Заняття 30.	Збудники мікотоксикозів	140
	Збудники аспергіло- і пеніциліотоксикозів	143
	Збудники фузаріотоксикозів	145
	Збудник стахіботріотоксикозу	146
	Збудник дендродохіотоксикозу	147
	Література	149

## **Вступ**

Сучасні економічні процеси, що відбуваються в нашому суспільстві зобов'язують вищу школу підняти якість підготовки майбутніх фахівців ветеринарної медицини, які будуть здатні проводити мікробіологічні дослідження з метою ідентифікації мікроорганізмів під час постановки діагнозу на інфекційні хвороби, визначити ефективні засоби профілактики і терапії, направлено регулювати мікробіологічні процеси з метою підвищення якості кормів, молока і молочних продуктів, м'яса, яєць.

Лабораторні заняття дають можливість студентам набути навички роботи в мікробіологічній лабораторії і більш детально вивчити деякі питання теоретичного курсу.

Об'єкти вивчення – мікроорганізми – невидимі неозброєним оком, тому студенти можуть ознайомитися з ними тільки з допомогою мікроскопа. Це відрізняє роботу в лабораторії з мікробіології від деяких інших біологічних дисциплін. В процесі вивчення у студентів формуються певні уявлення про мікроорганізми, про їх роль в природі і в тій галузі господарства, де буде працювати майбутній фахівець. Опанування мікробіологічними навичками, знайомство з властивостями мікробів допоможуть майбутньому фахівцю правильно усвідомлено підійти до використання багатьох позитивних властивостей цих істот на практиці.

Усі лабораторні роботи виконуються студентами самостійно, результати роботи фіксуються в зошиті.

Методичні вказівки покликані допомогти студентам при підготовці до занять і у проведенні практичної роботи. Теоретична підготовка за усіма темами повинна проводитися за підручником та лекційним матеріалом.

Засвоєння навчального матеріалу систематично контролюється питаннями для самоперевірки, які наведені в кінці кожної теми та за допомогою тестових завдань.

# Заняття 1

## Тема: Ветеринарна лабораторія Мікроскопи та правила роботи з ними

**Мета заняття:** ознайомити студентів з обладнанням та структурою ветеринарної лабораторії, технікою безпеки в лабораторії. Вивчити особливості роботи з імерсійною системою.

**Матеріальне забезпечення:** мікроскопи і освітлювачі, зафарбовані мазки, мікробіологічні петлі, пастерівські піпетки, зливні чашки, предметні скельця, барвники, кедрова олія, вода дистильована, таблиці.

**Зміст заняття:** студенти знайомляться з будовою та обладнанням мікробіологічної лабораторії, технікою безпеки і правилами роботи в ній. Опановують техніку мікроскопії у імерсійній системі.

Ветеринарна лабораторія – це самостійна державна структурна одиниця в системі ветеринарної служби району, області, країни. Основна задача лабораторії – діагностика хвороб свійських тварин та птиці, хутрових тварин, риб, бджіл, а також проведення експертизи молока, м'яса і інших продуктів та кормів.

Матеріалом для мікробіологічних досліджень служать кров, сироватка крові, молоко, сеча, фекалії, трупи загиблих тварин, шматочки паренхіматозних органів, проби води, повітря, ґрунту, кормів, рослин.

Нормативні документи, у яких викладені обов'язкові норми з лабораторної діагностики містяться у Ветеринарному законодавстві (том 3).

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає того, щоб приміщення лабораторії було ізольоване від житлових будинків, харчових складів, проїжджих доріг. У лабораторії передбачають такі окремі ізольовані приміщення (кімнати): для бактеріологічних, вірусологічних, серологічних, паразитологічних, хімічних і хіміко–токсикологічних, радіологічних, мікологічних, гематологічних, біохімічних, гістологічних досліджень, досліджень шкіряної сировини на сибірку, прийому патологічного та інших матеріалів, розтину трупів та обробки матеріалу, який поступив на дослідження, утримання здорових лабораторних тварин, зараження тварин та їх утримання, миття та автоклавування посуду, приготування живильних середовищ, розчинів тощо.

Основне обладнання лабораторії: мікроскопи різних типів, термостати, сушильні шафи, автоклави, водяні бані, центрифуги, апарати Коха, дистилятори, бактерицидні лампи і ін.

### **Правила роботи і поведінки у лабораторії**

*Знати і виконувати правила і техніку безпеки під час роботи в мікробіологічній лабораторії необхідно для створення безпечних умов праці, покращення санітарно-гігієнічних умов у приміщеннях, а також запобігання нещасним випадкам. Тому співробітники і студенти повинні дотримуватись таких правил:*

- Заходити і працювати в мікробіологічній лабораторії тільки в халаті.
- Не вносити у лабораторію сторонні речі.
- Працювати на одому й тому ж місці і користуватися закріпленим обладнанням.
- Дотримуватись чистоти і акуратності при роботі.
- Під час перерви у лабораторії забороняється палити і приймати їжу.
- На столі повинно бути тільки необхідне для виконання завдання.
- Весь матеріал, який потрапляє у лабораторію, повинен розглядатися як інфікований.
- При розпаковуванні заразного матеріалу необхідно дотримуватись обережності: банки, які містять матеріал для дослідження, обтирають зверху дезінфікуючим розчином і ставлять не прямо на робочий стіл, а в спеціально призначений для цього посуд – підноси, кювети.
- При дослідженні зараженого матеріалу і роботі з патогенними культурами необхідно суворо дотримуватись загальноприйнятих у бактеріологічній практиці технічних прийомів, що виключають зіткнення рук із заразним матеріалом.
- Уражений матеріал та непотрібні культури підлягають обов'язковому знищенню в той же день.
- Після закінчення заняття робоче місце і обладнання приводять в порядок.
- Щоб попередити вибух не запалювати одну спиртівку від іншої, використовувати для цієї мети сірники, запальничку.
- Без дозволу викладача або лаборанта не включати електроприлади і апаратуру.
- Дотримуватись правил поводження з хімічними реактивами.
- Виходячи з лабораторії, вимити руки.

## **Мікроскопи і мікроскопія**

**Мікроскоп** – оптичний прилад, який використовується для вивчення мікрооб’єктів. При вивченні мікробіологічних об’єктів застосовують мікроскопи різних моделей. Загалом, всі мікроскопи мають ідентичну будову. Серед світлових мікроскопів найбільш поширені моделі МБД (*мікроскоп біологічний дослідницький*), МБР (*мікроскоп біологічний робочий*) та «Біолам» – серії «Біолам – Р» – *робочий*, «Біолам – Д» – *дорожній*. Оптичне обладнання мікроскопів дозволяє отримати максимально корисне збільшення об’єктів у 1350 разів.

### **Робота з імерсійною системою**

Мікроскоп ставлять навпроти джерела світла, конденсор піднімають у верхнє положення, діафрагму максимально відкривають. Об’єктів малого збільшення  $\times 8$  підводять на 1,5 – 2 см від предметного столика наводять світло і визначають на препараті ділянку мікроскопії. Ліпше користуватись освітлювачем. Потім на вибране місце наносять краплю кедрової олії (коефіцієнт заломлення якої 1,51) і об’єктів переводять на імерсійний ( $\times 90$ ). За допомогою макрогвинта занурюють фронтальну лінзу об’єктива у краплю олії до слабкого дотику її до предметного скла (під контролем ока збоку). Імерсійні об’єктиви мають коротку фокусну віддаль (до 1,3 мм), тому наводять на різкість шляхом піднімання тубуса макрогвинтом до появи зображення в полі зору мікроскопа. Після грубої наводки, більш точне фокусування досягають за допомогою мікрометричного гвинта, який дозволяється крутити не більше, ніж півоберта в той чи інший бік.

При дослідженні препарат рухають по горизонтальній площині, при цьому крапля імерсійної олії «повзе» і забезпечує оптичне гомогенне середовище у необхідному місці.

Після закінчення роботи об’єктів піднімають, знімають препарат і протирають фронтальну лінзу об’єктива серветкою, а потім її зволожують спиртом і знову протирають. Чистити об’єktiv від імерсійної олії ксилолом або бензином не рекомендується, вони можуть розчиняти речовини, що склеюють лінзи об’єктива.

Мікроскоп зберігають у спеціальному футлярі або під скляним ковпаком, щоб захистити його від пилу, а оптичну систему – від попадання променів сонця. Револьвер після роботи треба перевести на мале збільшення, на предметний столик під об’єktiv покласти чисту



суху марлю, конденсор необхідно трохи опустити.

### **Контрольні питання**

1. Задачі ветеринарної лабораторії.
2. Основні правила техніки безпеки у лабораторії.
3. Що таке імерсійний об'єктив, імерсійна система мікроскопа, імерсійна рідина?
4. Як за зовнішнім видом визначити імерсійний об'єктив?
5. Який коефіцієнт заломлення імерсійної олії?

### **Заняття 2**

#### **Тема: Морфологія бактерій Простий метод фарбування**

**Мета заняття:** вивчити різні форми бактерій по таблицях, діапозитивах, мазках–препаратах. Приготувати, зафарбувати, провести мікроскопію і замалювати препарати із різних культур.

**Матеріальне забезпечення:** штативи з пробірками з культурами кокових форм мікроорганізмів, які вирощені на щільному і рідкому живильному середовищі, мікробіологічні петлі, крапельниці з розчинами фарбників, змивні чашки, предметні скельця, олівці або чорнила по склу, анатомічні пінцети, спиртівки, мікроскопи, кедрова олія.

**Таблиці:** кокові форми мікробів.

**Зміст заняття:** студенти готують мазки з культур на щільному і рідкому середовищі, проводять фарбування фіксованих мазків простими методами. Усі препарати замальовуються.

#### **Приготування фарбованих препаратів**

**1. Підготовка предметних скелець.** Препарати готують на предметних скельцях, які повинні мати товщину не більше 1,2 – 1,4 мм. Застосування товстіших скелець не дозволяє одержати різке зображення країв діафрагми освітлювача в площині препарата, так як воно попадає в товщу скла, що порушує фокусування конденсора і різко знижує чіткість зображення.

Для бактеріологічних досліджень необхідно використовувати чисті, добре знежирені скельця. Нові скельця промивають водою, витирають насухо і зберігають у склянках із спиртом або спиртом-

ефіром (порівну). Скельця, що використовувалися, витримують 1-2 години в концентрованій сірчаній кислоті або сірчано-хромовій суміші, а потім промивають водою, кип'ятять в мильній воді, промивають водою, ополіскують дистильованою водою, висушують в сушильній шафі. Скельця із рідин дістають пінцетом. Перед використанням їх, проводять через полум'я вогню. При роботі скельця беруть тільки з боків.

**2. Приготування мазків.** Мазок готують на предметному склі із допомогою бактеріологічної петлі або пастерівської піпетки.

Бактеріологічну петлю виготовляють із платинового дроту завдовжки 50 – 90 мм, вставляють у спеціальний тримач з рукояткою.

Вищезгадані інструменти в роботі тримають трьома пальцями – як олівець. Робочі частини – петлю або голку – перед взяттям матеріалу обпалюють у полум'ї вогню у вертикальному положенні. Мазки виготовляють із культур мікробів, тканин, крові, і т.д.

При виготовленні мазків із мікробних культур беруть у ліву руку пробірку з культурами так, щоб дно її було назовні, а корок, що її закриває, був усередині. Пробірку фіксують у долоні під кутом 45°, притискаючи її великим пальцем. В праву руку беруть петлю так, як тримають олівець, і фламбірують її в полум'ї спиртівки. Потім, не випускаючи петлі, мізинцем і безіменним пальцем правої руки притискають ватний корок до долоні, виймають його з пробірки і тримають так під час послідуєчих маніпуляцій. Відкритий край пробірки обпалюють над полум'ям вогню і після цього вводять в пробірку стерильну петлю, охолоджують і набирають невелику кількість мікробної маси з поверхні субстрату. Горлишко пробірки після взяття матеріалу знову обпалюють в полум'ї спиртівки, потім обпалюють ватний корок і закривають ним пробірку. Взятий таким чином матеріал наносять на предметне скельце і рівномірно розподіляють по поверхні тонким шаром у вигляді мазка, а петлю знову розжарюють. Щоб отримати мазок менш густий, спочатку готують суспензію культури на запасному склі, а з неї готують мазок.

Якщо мазок готується із культур, що виростили, на щільних живильних середовищах, то попередньо на центр предметного скельця наносять краплю води або фізрозчину, петлею вносять дослідний матеріал і розподіляють його на предметному склі так, щоб отримати рівномірний мазок площею 1-1,5 см<sup>2</sup>. Якщо дослідний матеріал рідина, то попередньо краплю води або фізрозчину не наносять. Мазок висушують на повітрі або ж в струмені теплого повітря над полум'ям

спиртівки і фіксують. Мазки повинні бути тонкими, висушеними на повітрі і зафіксованими.

При приготуванні мазків із дуже дрібних колоній, їх беруть нікельованою голкою злегка зігнутою на кінці. Кінчиком голки обережно забирають з центра колонії бактерійну масу і суспендують у фізрозчині, а потім з неї петлею роблять мазок.

Для фіксації бактерійних клітин на поверхні предметного скла останнє протягом 3-5 сек. декілька разів проводять крізь полум'я спиртівки. Мікроорганізми при фіксації гинуть, щільно прикріплюються до скла і не змиваються при промиванні мазка водою. Тривале нагрівання скла недопустимо, так як при цьому настає деформація бактерій.

### **Фіксація мазків хімічним способом.**

1. Етиловий спирт 96<sup>0</sup>. Термін фіксації 15-20 хв.
2. Спирт – ефір. Термін фіксації 15-20 хв.
3. Метилловий спирт. Термін фіксації 1-5 хв.

Хімічний метод фіксації має переваги перед нагріванням тим, що при цьому морфологія бактерій не змінюється і застосовується переважно для фіксації мазків крові, мазків із молочних продуктів і т.д. В результаті фіксації мазок прикріплюється до скла, обеззаражуються мікроби, відбувається їх краще фарбування.

### **Простий метод фарбування мазків.**

Розрізняють прості і складні методи фарбування. Фарбування простим методом полягає в тому, що препарат фарбують однією фарбою: водним фуксином (1-2 хв.), метиленовою синькою (3-5 хв.) та інші.

В основі фарбування лежить фізико-хімічний процес, при якому проходить адсорбція фарби мікробною клітиною. Комплекс із мікроба і фарб є досить стійким і не піддається вимиванню водою. Чим вище концентрація фарби, тим вище швидкість адсорбції.

Після фарбування залишки фарби змивають і мазок висушують фільтрувальним папером. При неповному висушуванні залишки вологи з імерсійною олією утворюють непрозору емульсію, яка погіршує зображення. Простим методом бактерії фарбуються в один колір рівномірно, і інколи появляється зернистість, а також метахромазія (розчеплення тону кольору).

## Контрольні питання

1. Як обробляють предметні і покривні скельця?
2. Виготовлення мазка для фарбування.
3. Як підготувати бактеріологічну петлю?
4. Із яких етапів складається процес виготовлення мазка?
5. З якою метою і як фіксують мазки?
6. Техніка простого метода фарбування мазків.

## Заняття 3

### Тема: Паличкоподібні бактерії Складні методи фарбування

**Мета заняття:** ознайомитися з приготуванням фарбуючих розчинів. Оволодіти методикою фарбування за Грамом.

**Матеріальне забезпечення:** пробірки з культурами *Bac. megaterium* і *E. coli* або суміш мікроорганізмів, колба з прокислим пивом, мікробіологічні петлі, предметні скельця, спиртівки, набір фарб для фарбування за Грамом, фільтрувальний папір, мікроскопи, імерсійна олія. Таблиці зафарбованих бактерій та фарбування за Грамом.

**Зміст заняття:** студенти готують мазки з культур на щільному середовищі або прокислого пива, проводять фарбування фіксованих мазків за Грамом.

**Фарби.** При фарбування мазка фарба проникає в мікробну клітину. Це дає можливість розглядати не тільки її зовнішні ознаки, але й деякі особливості внутрішньої структури - спори. У мікробіологічній практиці використовують основні і кислі фарби. Мікроби, як і ядра клітин, фарбуються основними фарбами, рідше нейтральними. Кислі фарби служать для створення фону, що збільшує контрастність незафарбованих форм.

Із основних фарб частіше застосовують фуксин основний феноловий, сафронін, нейтральрот, (червоні фарби); метиловий голубий, азур II (сині фарби); малахітовий зелений (зелена фарба); везувін, хризоїдин (жовтокоричневі фарби); пікринову кислоту (жовта фарба); нігрозин (чорна фарба) і т.д.

Розчини фарб можуть бути як спиртові, так і водні. Спиртові розчини фарб більш стійкі. Заздалегідь готують насичені спиртові розчини. До спирту додають стільки фарби, щоб на дні залишався

нерозчинений осад. Із цих насичених розчинів готують розбавлені водно-спиртові розчини фарб для фарбування мікробів. Для підсилення дії фарби до неї додають протравлюючу речовину, яка підвищує стійкість водоспиртових розчинів, сприяє розрихленню оболонки і кращому фарбуванню мікробів. Для цього використовують спирт, формалін, фенол, луги, нагрівання фарби.

### **Рецепти виготовлення фарб та фарбуючих розчинів**

1) Карболовий фуксин Ціля. Беруть 10 мл етилового спирту, додають 1 г основного фуксину. Залишають на одну добу додають 100 мл 5 % розчину карболової кислоти на дистильованій воді. Через добу розчин фільтрують і розливають по флаконах. Такий розчин фарби зберігається довго. В чистому вигляді його використовують для фарбування спор, збудника туберкульозу, лепри та інших.

Для фарбування багатьох видів мікроорганізмів застосовують розбавлені розчини. Беруть одну частину основного розчину і розбавляють у 10 мл дистильованої води.

2) Карболовий генціанвіолет – 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, далі додають 100 мл 2% розчину фенолу. Фільтрують, розливають по флаконам. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

3) Метиленова синька – 1 г фарби розчиняють у 10 мл спирту, додають 30 мл 0,01% КОН. Через добу фільтрують. Ця фарба використовується для простого фарбування бактерій. Експозиція 1-2 хвилини.

4) Водний розчин сафраніну – 1 г фарби розчиняють у 50 мл гарячої дистильованої води, гарячим фільтрують, розливають по флаконам. Ця фарба добре фарбує капсулу збудника сибірки.

5) Водний розчин метилвіолету – 1 г фарби розчиняють у 100 мл гарячої дистильованої води, фільтрують. Фарба нестійка. Використовують для фарбування бактерій за Грамом.

6) Фарба Романовського–Гімзи – це суміш азуру – 0,8 г, еозину – 3,0 г, гліцерину х.ч. – 250 мл, метилового спирту – 250 мл. Фарби дуже ретельно розтирають у невеликій кількості гліцерину і спирту, далі додають решту кількості гліцерину та спирту. Розчин 4-6 діб витримують у термостаті при температурі 37<sup>0</sup>С, фільтрують.

Розчин Люголя – 2 г КІ розчиняють у 25 мл дистильованої води, додають 1 г кристалічного йоду, додають 275 мл дистильованої води, фільтрують.

## **Складні (диференціюючі) методи фарбування.**

Складні методи фарбування застосовують з метою ідентифікації та диференціації мікробів. Хімічний склад і будова клітинної стінки мікробів різні і тому вони фарбуються одними і тими ж фарбами по різному і не однаково віддають їх при послідовному обезбарвленні етиловим спиртом, кислотами і іншими реактивами.

**Фарбування за Грамом.** Відношення бактерій до фарбування за Грамом визначається їх здатністю утримувати комплекс фарби з йодом. У грампозитивних бактерій клітинна стінка містить 90% пептидоглікану, тоді як у грамнегативних бактерій – 10% пептидоглікану, який представлений тонким шаром у глибині стінки клітини. В оболонці грамнегативних бактерій значно більше, ніж у грампозитивних міститься білків та ліпідів, які разом з поліцукридами утворюють поверхневі шари у вигляді мозаїки. Їх цитоплазма містить РНК та ДНК у співвідношенні 1:1, а у грампозитивних – 8:1. Проникність стінки у грампозитивних бактерій менша, ніж у грамнегативних. Це пов'язано з тим, що у грампозитивних бактерій міститься більше пептидоглікану та діаметр пор у них менший, ніж у грамнегативних бактерій.

Суть цього методу полягає в тому, що грампозитивні мікроорганізми містять магнієву сіль РНК, яка утворює з генціанвіолетом і йодом стійкий комплекс, який не знебарвлюється спиртом і зберігає початкове фіолетове забарвлення. Грамнегативні мікроби не здатні утримувати фіолетову фарбу і при проведенні через спирт знебарвлюються. Використання водного фуксину на завершальному етапі сприяє фарбування таких мікробів у рожево-червоний колір.

### **Техніка фарбування за Грамом**

1. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрувальний папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають.

2. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають.

3. Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек.

4. Мазок ретельно промивають водою.

5. На 1-2 хвилини наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, а грамнегативні у червоний.

Для фарбування за Грамом студенти готують мазок із суміші мікробів (*Vac. megaterium* і *E. coli*) або прокислого пива (плівка на поверхні пива – оцтовокислі бактерії, внизу розміщуються дріжджі). На склі культуру змішують, мазок висушують, фіксують і фарбують за Грамом. Кишечна паличка і оцтовокислі бактерії – грамнегативні; капуста бацила і дріжджі – грампозитивні.

### **Контрольні питання**

1. Які фарби використовуються в мікробіологічній практиці?
2. Структура, хімічний склад та функції клітинної стінки бактерій. Відмінності в будові клітинної стінки у грампозитивних та грамнегативних бактерій.
3. Яке значення в мікробіології має метод фарбування мікробів за Грамом?
4. Методика фарбування мікробів за Грамом.

## **Заняття 4**

### **Тема: Фарбування спор, капсул, включень Вивчення рухливості бактерій**

**Мета заняття:** оволодіти методикою фарбування спор, капсул та включень. Навчити визначення рухливості бактерій методами «роздавлена» та «висяча» крапля.

**Матеріальне забезпечення:** пробірки з добовою культурою *Vac. mesentericus* (картопляна бацила) і ізотонічним розчином натрію хлориду, мікробіологічні петлі, крапельниці з розчинами фарб, 3% - ний розчин  $H_2SO_4$ , дистильована вода, піпетки, предметні і покривні скельця, зливні чашки, пінцети, спиртівки, мікроскопи, імерсійна олія.

**Зміст заняття:** студенти вивчають техніку фарбування спор, капсул включень. Досліджують мікроби в живому стані і визначають характер їх руху.

**Фарбування спор.** Ряд мікроорганізмів (бацил) в несприятливих для них умовах утворюють спори. При цьому процесі у протоплазмі формується зневоднене тіло. Воно вкривається п'ятишаровою оболонкою. В одній бактеріальній клітині утворюється завжди одна спора. Ендоспори бацил локалізуються у центрі і не

перевищують діаметр материнської клітини. У клостридій вони розташовуються ексцентрично, термінально та субтермінально, завжди при цьому перевищуючи діаметр вегетативної клітини. Тому бацили різних видів, які містять спори, морфологічно між собою практично відрізнити важко, тоді як клостридії мають форму веретена, ложки, ракетки або барабанної палички. Спора може мати форму кулі, циліндра тощо. Поверхня спор може бути гладкою або мати вирости у вигляді шипів, кутів зірки тощо. Всі ці особливості характерні для виду і мають таксономічне значення. Зрілі спори погано фарбуються. Для виявлення спор та вивчення їх особливостей застосовуються спеціальні методи фарбування: Златогорова, Меллера, Ожежки.

**Фарбування за Златогоровим.** Висушений мазок 10 раз (замість 5-ти) проводять над полум'ям спиртівки для того, щоб вбити спори та розрихлити їхню оболонку. Далі на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Ціля і підігрівають до появи пари протягом 5-7хв. Знімають папір, зливають залишки фарби, наносять на 10 секунд 3 % розчин сірчаної кислоти, промивають водою. На 2-3 хвилини наносять розчин метиленової синьки. Промивають водою і висушують мазок фільтрувальним папером. Спори фарбуються у червоний колір, а вегетативна клітина – у синій.

**Спосіб Меллера** відрізняється від фарбування за Златогоровим тим, що на фіксований мазок наливають 5 % розчин хромової кислоти, витримують хвилину, зливають кислоту водою – далі фарбують у тій же послідовності, що і за Златогоровим.

**Метод Ожежки.** На нефіксований мазок наливають 0,5% розчин соляної кислоти, 2-3 хвилини підігрівають над полум'ям спиртівки. Кислоту зливають, препарат промивають водою, просушують і фіксують над полум'ям. Далі фарбують за Ціль-Нільсенем: на мазок кладуть фільтрувальний папір, наносять фуксин Ціля, підігрівають до появи пари. Знімають папір, після охолодження скла мазок промивають водою, знебарвлюють препарат 5% розчином сірчаної кислоти або 3% розчином солянокислого спирту. Промивають водою і дофарбовують 3-5 хвилин метиленовою синькою.

### **Дослідження мікробів в живому стані**

Багато мікроорганізмів в живому стані здатні пересуватися. Швидкість і характер руху залежать від віку культури, оточуючого середовища і виду мікроба. Добре виражена рухливість у молодих культур, у старих вона сповільнена або зовсім відсутня. Рухливість



припиняється із нагромадженням продуктів життєдіяльності. Наявність або відсутність руху – одна із ознак при визначенні виду мікробів.

Органами руху є джгутики, які здійснюють кругові рухи і по-різному розміщуються на тілі мікробної клітини. Для визначення рухливості у мікробів беруть молоді (12-24-годинні) культури. Дослідження проводять шляхом приготування висячої або притиснутої краплі.

### **Приготування висячої краплі**

Висячу краплю готують на предметному склі з виїмкою. Край виїмки змазують тонким шаром вазеліну. В центр покривного скла наносять краплю рідкої бактерійної культури. Якщо мікроби вирощені на щільному середовищі, то спочатку на покривне скло наносять краплю ізотонічного розчину NaCl, а потім в неї – культуру мікробів. Предметне скло, виїмкою донизу, акуратно притискають до покривного так, щоб крапля знаходилась в центрі виїмки. Перевертають препарат покривним скельцем доверху. Крапля рідини повинна вільно звисати у центрі виїмки не торкаючись дна або стінок. Під малим збільшенням об'єктиву знаходять край краплі, ставлять його в центр, револьвер мікроскопу переводять на об'єктив «40» і дивляться в злегка затемненому полі конденсора, що збільшує контрастність незафарбованих форм.

### **Приготування притиснутої краплі**

На поверхню предметного скла наносять краплю дослідного матеріалу або суспензію бактерій, накривають покривним склом. При притискуванні покривного скла рідина не повинна виходити за його край. Мікроскопують об'єктивом «40» в темному полі конденсора.

При вивченні рухливості необхідно відрізнити справжній рух від броунівського, при якому мікроби залишаються на місці, роблять коливальні рухи під впливом молекул оточуючого середовища або пересуваються за током рідини.

### **Контрольні питання**

1. Роль капсули у життєдіяльності бактерій. Її хімічний склад.
2. Процес спороутворення у мікроорганізмів. Структура та хімічний склад спори.
3. Методи фарбування спор.
4. Методи фарбування капсул.
5. Чим обумовлені рухові реакції мікробів ?
6. Що таке позитивний і негативний таксис?
7. Методи визначення рухливості мікробів.

## Заняття 5

### Тема: Морфологія грибів і актиноміцетів

**Мета заняття:** ознайомити з морфологічними особливостями плісневих грибів, дріжджів і актиноміцетів, замалювати деяких представників.

**Матеріальне забезпечення:** чашки з культурами грибів роду *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, дріжджів, препарати актиноміцетів, предметні та покривні скельця, мікробіологічні петлі, препарувальні голки, пастерки, розчин гліцерину, спирту та води порівну, пінцети, спиртівки, мікроскопи. Таблиці: схеми будови мукора, пеніцила і аспергіла.

**Зміст заняття:** студенти вивчають особливості будови грибів, дріжджів, актиноміцетів. Виявляють подібність та відмінність актиноміцетів з бактеріями та нижчими грибами. Готують препарати з культур грибів родів *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Препарати замальовують в зошити.

### Морфологія грибів

Гриби – безхлорофільні мікроорганізми, живуть на поверхні різних субстратів. Клітини грибів мають диференційоване ядро, тому їх відносять до еукаріотів. Плісневі гриби не вимогливі до поживних середовищ, але більшість з них потребують кисень повітря. Легко переносять низькі температури, можуть жити і розмножуватись в холодильних камерах, серед грибів зустрічаються як сапрофіти, так і паразити.

Всі гриби ділять на вищі і нижчі і поділяють на 6 класів. Хітридієві, ооміцети, зигоміцети відносять до нижчих грибів; аскоміцети, базидіоміцети і дейтероміцети, недосконалі гриби – до вищих.

Всі гриби (рис 1), окрім примітивних нижчих і деяких вищих (дріжджів), мають вегетативне тіло – міцелій, або грибницю, яка складається із тонких розгалужених гіф. Міцелій може бути занурений (субстрактний), який розвивається всередині середовища, і поверхневий (повітряний), який розвивається на поверхні середовища. У нижчих грибів гіфи не мають поперечних перетинок (несептований), у вищих – гіфи багатоклітинні. Інколи міцелій грибів утворює ризоїди –

коренеподібні вирости, при допомозі яких прикріплюється до субстрату і одержує поживні речовини.

Склероції – це сплетіння гіф округлої або продовгуватої форми. Вони мають великі розміри, ущільнені, стійкі до несприятливого впливу середовища, містять мало води і багато поживних речовин.

Від міцелію відходять плодоносячі тіла спорангієносців у мукорових і конідієносці у монілієвих. Спорангієносці закінчуються розширенням – спорангієм з ендоспорами. На конідієносцях утворюються конідії, або екзоспори.

### **Мікроскопічне дослідження грибів.**

Звичайно гриби досліджують в незафарбованому стані. На предметне скло наносять краплю рідини (вода, спирт, гліцерин порівну). Препарувальною голкою беруть частину міцелію і розміщують його у краплі рідини. Міцелій обережно розправляють голкою і накривають покривним скельцем. Препарат вивчають спочатку під малим, а потім під середнім збільшенням в затемненому полі зору (звужена діафрагма). Препарат треба готувати поблизу предметного скла, не допускаючи розсіювання спор. Препарувальні голки після закінчення роботи ретельно фламбують над полум'ям спиртівки.

Дріжджі мікроскопують аналогічним методом, або готують з них мазки і фарбують за Грамом, а потім розглядають препарат під імерсійною системою мікроскопа.

### **Контрольні питання**

1. Підготовка матеріалу і особливості мікроскопії грибів.
2. Особливості будови плісневих грибів.
3. Народногосподарське значення грибів.

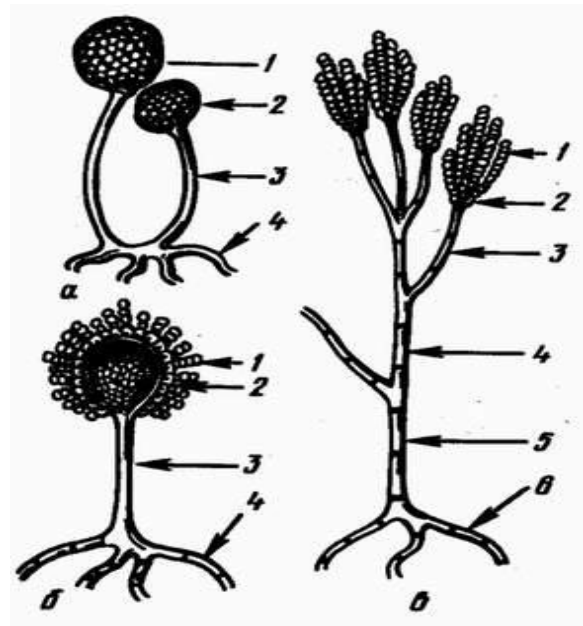


Рис. 1. Схема будови: а) мукора (клас зигоміцети): 1-ендоспори; 2-спорангій (плодове тіло); 3-спорангієносець; 4-міцелій; б) аспергилалеєчна плісень (клас дейтероміцети): 1-конідії (екзоспори); 2-стерігми; 3-конідієносець; 4-міцелій; в) пеніцил (кістевик)-клас дейтероміцети: 1-конідії; 2-фіаліди; 3-метула; 4-гілка; 5-конідієносець; 6-міцелій

4. Морфологія, біологічні особливості головчатої плісені, чорного аспергіла, зеленого кістьовика.
5. За якими ознаками актиноміцети розрізняються і подібні до грибів та бактерій?
6. Будова дріжджів.

## **Заняття 6**

### **Тема: Лабораторна апаратура і методи стерилізації**

**Мета заняття:** ознайомитися з обладнанням і апаратурою бактеріологічної лабораторії; основними методами стерилізації, їх призначенням і практичним використанням; правилами миття, обробки та підготовки до стерилізації лабораторного посуду, інструментів тощо; знезараження відпрацьованого патматеріалу.

**Матеріальне забезпечення:** стерилізатори, термостат, автоклав, водяна баня, мікроанаеростат, ексикатор, апарат Коха, піч Пастера, бактерицидна лампа, бактеріологічні фільтри, лабораторний посуд, інструменти, чашки Петрі, пробірки з культурами бактерій, таблиці.

**Зміст заняття:** студенти знайомляться з будовою і роботою автоклава, сушильними шафами, вивчаються різні методи стерилізації, підготовка посуду і інструментів до стерилізації. Вивчають засоби дезінфекції в баклабораторії.

**Стерилізація** - процес, який передбачає знищення у об'єкті усіх вегетативних і спорових, патогенних і непатогенних мікроорганізмів.

Підготовка до стерилізації: посуд миють і висушують. Пробірки, колби, флакони закривають ватно-марлевым корком. Зверху на корки одягають паперові ковпачки (окрім пробірок). Чашки Петрі стерилізують загорнутими в папір по 1-5 штук, пастерівські піпетки по 3-15 штук. В верхню частину піпетки вкладають трохи вати для того, щоб попередити потрапляння матеріалу до рота. Під час роботи піпетки потрібно брати за верхній кінець. Градуйовані піпетки з ватним корком зверху, загортають кожну окремо у смужку паперу, для чого його нарізають смужками розміром (2-2,5) X (50-70) см. Лівий кінець загинають, накручують на піпетку, а верхній - закручують, або приклеюють. Посуд стерилізують сухим жаром при температурі 150 або 160, 190°C відповідно 2, 1 і 0,5 годин або у автоклаві при тиску 1 атм. протягом 20-30 хвилин.

**Стерилізація шприців.** Окремо циліндр і поршень опускають у 2% розчин соди і стерилізують 30 хвилин. При роботі з споровим матеріалом поміщають в автоклав, стерилізують 15 хвилин при 2 атмосферах (132°C) або 30 хвилин при тиску 1,5 атм. (126°C). Шприци збирають після охолодження простерилізованими пінцетами.

**Стерилізація металічних інструментів.** Ножиці, скальпелі, пінцети тощо стерилізують у 2% розчині соди. Гострі частини інструментів необхідно загортати в марлю або вату.

**Стерилізація бакпетель** проводиться полум'ям: петлю у горизонтальному положенні спочатку вносять в нижню частину полум'я, щоб не відбувалося розбрикування патматеріалу. Коли все згорить, петлю переносять в верхню частину полум'я і переводять петлю у вертикальне положення. Вслід за петлею фламбують нижню частину тримача.

**Стерилізацію паперу, марлі, вати** проводять у сушильній шафі при температурі 160° протягом 1 години, або у автоклаві при 1 атм протягом 30 хвилин.

**Стерилізацію гумових рукавичок,** які забруднені вегетативними формами збудників хвороб, проводять кип'ятінням у 2% розчині соди або текучою парою протягом 30 хвилин. При спорових формах - автоклавуванням 20-30 хвилин при 1,5-2 атмосферах. Рукавички перед стерилізацією пересипають тальком. Кожну пару окремо обгортають марлею.

**Стерилізація патогенних культур.** Пробірки і чашки Петрі з непотрібними культурами складають в металевий бак, пломбують кришку і здають в стерилізацію, де проводять автоклавування протягом 30 хвилин при 1 атмосфері. Вегетативні форми можна кип'ятити. Матеріал, що стерилізують заливають 2-5% розчином луку і ставлять на вогонь. Кип'ятять 1,5-2 години. Кришка бака повинна мати отвори для виходу пари.

### **Види стерилізації**

**Фізичні методи включають:** 1)стерилізацію сухим жаром (фламбування, сухим нагрітим повітрям), 2)стерилізацію вологим жаром (кип'ятіння, текучою парою при 100°C, дробову стерилізацію при температурі нижче, ніж 100°C, стерилізація парою під тиском з температурою вище 100°C, пастеризація), 3) стерилізацію фільтруванням (бактеріологічні фільтри), ультрафіолетовими променями, ультразвуком.

**Засоби стерилізації сухим жаром.** Фламбуванням або пропалюванням, стерилізують бактеріологічні петлі, пінцети і інші металеві предмети.

Стерилізація *сухим нагрітим повітрям* здійснюється в спеціальних сушильних шафах (печі Пастера) з подвійними стінками. Зовні шафа облицьована теплонепроникним матеріалом, всередині – стінки металеві. У верхній частині шафи знаходиться термометр. Між теплонепроникною обшивкою і внутрішнім металом шафи на дні є автоматичний електронагрівальний елемент. В печі Пастера стерилізують чистий скляний посуд. Колби закривають ватними корками, накривають паперовими ковпачками і зав'язують. Чашки Петрі і пастерівські піпетки загортають пачками в пергаментний папір. При включенні сушильної шафи в електромережу повітря всередині шафи нагрівається. При досягненні заданої температури відзначають час початку стерилізації. Режим стерилізації – при температурі 155-160°C, експозиція 2 год, при 165 - 170°C - 1-1,5 год, при 180°C – 1 год. По закінченні часу стерилізації нагрівання припиняють і, лише коли температура знизиться приблизно до 45°C, шафу відкривають. Речовини, що запалюються, живильні середовища, гумові та пластмасові предмети стерилізувати сухим жаром не можна.

**Засоби стерилізації вологим жаром.** Кип'ятіння - засіб стерилізації інструментів (шприци, голки, пінцети, ножиці, скальпелі та ін.) і деяких гумових та скляних предметів в стерилізаторах, які мають решітку. На решітку кладуть два-три шари марлі або тонкий шар гігроскопічної вати. Шприци стерилізують у розібраному вигляді, в голки вставляють мандрени. Леза скальпелів і ножиці рекомендується обгортати марлею або ватою. В стерилізатор наливають воду (краще дистильовану) так, щоб вона повністю вкривала інструменти. Стерилізатор закривають кришкою. Кип'ятять 20-30 хвилин. Після стерилізації воду обережно зливають, а інструментами користуються тільки після їхнього охолодження.

**Стерилізація текучою паром.** В основу цього способу покладений засіб дробної стерилізації (розроблений Тиндалем, 1877) при різних температурних режимах не вище 100°C. Здійснюють стерилізацію в апараті Коха при 100°C 30-40 хв. Апарат являє собою металевий котел циліндричної форми з подвійним дном, що закривається кришкою з отвором для термометра і виходу пари. Всередині котла є спеціальна підставка з отвором для матеріалу, що стерилізують і нагрівальні елементи. На дно апарата наливають воду

до рівня, про який судять за показами водомірної трубки.

Початком стерилізації вважають момент закипання води. Пара, що утворюється при цьому підіймається доверху безперервно до матеріалу, який стерилізується. Стерилізацію проводять 3 дні підряд. Однократне прогрівання вбиває тільки вегетативні форми мікроорганізмів. Спори, які залишалися життєздатними в періоди між стерилізацією проростають у вегетативні форми. Стерилізація на наступний день викликає їхню загибель. На третій день прогрівання гарантує повну стерильність матеріалу. Ефективність дробної стерилізації залежить від проростання спор, а тому в проміжках між нагріванням матеріали витримують при кімнатній температурі (25°C). Дробну стерилізацію при 100°C можна проводити і в автоклаві, закритому не герметично, у тих же режимах. Текучою парою стерилізують живильні середовища і інші матеріали, що руйнуються при нагріванні їх вище 100°C (желатина, вуглеводи).

**Тиндалізація** – дробна стерилізація при температурах нижче 100°C. Стерилізацію здійснюють у водяній бані. Принцип цього способу той же, що і при стерилізації текучою парою. Кратність нагріву залежить від температур, що застосовуються: при 70-80°C протягом 3 діб, 60-65°C – 5 діб, 56-58°C – 6-7 діб. В перший день матеріали стерилізують 2 год., в наступні дні – по одній годині. В проміжках між прогріванням матеріал, що стерилізується витримують при кімнатній температурі для проростання спор. За допомогою тиндалізації при 56-58°C стерилізують матеріали, що руйнуються при більш високій температурі (колоїдні розчини, сироватка крові і ін.).

**Автоклавування** – стерилізацію парою під тиском з високою температурою, здійснюють в спеціальному апараті – автоклаві. В основі цього способу лежить нагрівання матеріалу, поміщеного в автоклав з герметично закритою кришкою, чистою насиченою парою під тиском вище атмосферного. При зустрічі насиченої пари з більш холодним об'єктом пара конденсується перетворюючись на воду, в результаті чого виділяється велика кількість тепла, і температура об'єкту стерилізації швидко підвищується. Крім того, при конденсації пари відбувається зменшення його обсягу, що сприяє проникненню пари у внутрішні частини матеріалу. Обов'язковою умовою є надходження справді насиченої пари, щоб її торкання з холодним предметом вело до негайної конденсації і нагрівання та не призводило до вилучення води з матеріалу, який стерилізується. Сучасні автоклави електричні. Промисловість випускає автоклави вертикальні і горизонтальні.

Вертикальний автоклав являє собою двостінний металевий котел циліндричної форми, що закривається герметично кришкою. Через спеціальний кран з лійкою між стінками заливають воду до певного рівня. Внутрішня стінка котла у верхній частині має отвір, в нижній частині — кран, через який при нагріванні води пара витісняє повітря з котла. Автоклав нагрівають включенням в електромережу. Автоклав завантажують матеріалом, кришку закривають герметично, закривають кран, через який заливають воду, нижній кран тимчасово залишається відкритим. При закипанні води між стінками автоклаву пара, що утворюється піднімається доверху і через верхній отвір внутрішньої стінки потрапляє всередину котла, витісняючи повітря через нижній відкритий кран. Коли повітря все витиснеться і пара починає виходити рівним струменем, нижній кран закривають. В результаті тиск пари всередині автоклаву підвищується. Початком стерилізації вважають момент досягнення показань манометра заданої величини. Нагрівання регулюють протягом усієї стерилізації, підтримуючи тиск пари на одному рівні. При надмірному підвищенні тиску всередині автоклава передбачений запобіжний клапан, через який автоматично надлишок пари виходить назовні:

При підвищенні тиску пари, відповідно підвищується і температура в автоклаві:

$0,505 \cdot 10^5$ Па (0,5 атм)	температура	110-112°C
$1,01 \cdot 10^6$ Па (1 атм)	»	120-121°C
$1,515 \cdot 10^6$ Па (1,5 атм)	»	124-126°C
$2,02 \cdot 10^6$ Па (2 атм)	»	132-133°C

Манометр показує тиск пари без врахування навколишнього атмосферного тиску (760 мм рт. ст.). По закінченні часу стерилізації автоклав відключають. Після охолодження при нульовій позначці манометра відкривають кран для того, щоб випустити пару. Кришку відкривають обережно на себе, не заглядаючи в котел, уберігаючи очі від можливої залишкової пари. До повного виходу пари відкривати кришку не можна, бо при швидкому падінні тиску всередині автоклаву простерилізовані рідкі середовища закипають, корки з пробірок виштовхуються разом з рідиною.

В автоклаві стерилізують живильні середовища, що витримують нагрівання вище 100°C (МПА, МПБ, фізіологічний розчин), скляний посуд, загорнутий в папір, перев'язочний матеріал, халати. Крім того, в автоклаві знезаражують використані бактеріальні культури, посуд. В цих випадках тиск пари і експозиція стерилізації повинні бути



тривалішими (1,5 атм. - 1 год.), ніж при стерилізації чистого матеріалу (0,5 атм. – 30-40 хв.). Для перевірки якості роботи автоклаву, відповідність показів манометра і температури пари використовують різноманітні хімічні речовини (бензонафтол, сірка), які мають певну температуру плавлення.

Горизонтальний автоклав відрізняється від вертикального конструкцією, але принцип роботи той же.

**Пастеризація** – спосіб запропонований Пастером з метою збереження біологічної цінності харчового продукту (молоко, м'ясні, рибні і овочеві консерви), що знижується при кип'ятінні (руйнуються вітаміни і інші нестійкі до високої температури речовини). При пастеризації продукт нагрівають до 80°C 30 хв., після цього різко охолоджують (до 4-8°C). Пастеризацією досягається часткова стерилізація – гинуть вегетативні форми бактерій, а спори зберігаються. Різке охолодження і наступне зберігання при низькій температурі (4-5°C) перешкоджають проростанню спор і наступному розмноженню бактерій.

**Стерилізація фільтруванням** полягає в пропусканні рідкого матеріалу через бактеріологічні фільтри шляхом створення на фільтрі перепаду тиску, або шляхом створення вакууму в приймальникові фільтрату. Дія фільтру полягає в механічній затримці і в адсорбції мікроорганізмів стінками пор фільтру. Розміри мікробів часто бувають менші середнього діаметру пор фільтрів. Фільтрують звичайно рідини, які не витримують нагрівання (сироватки крові, розчини антибіотиків і ін.). Фільтри бувають тверді – керамічні, азбестові і мембранні.

Більш частіше в роботі використовують фільтри Зейтца і мембранні фільтри, які вмонтовані в спеціальному утримувачі-лійці, вставленому в корок, що закриває колбу Бунзена (товстостінна колба з тубусом). Змонтований фільтр загортають папером і стерилізують в автоклаві. Рідину, яка фільтрується наливають у лійку над фільтром, на тубус колби надягають гумову трубку, приєднану до ручного або електричного насоса, викачуванням повітря з колби створюють понижений тиск, і рідина фільтрується, бактерії залишаються на фільтрі. Стерильність отриманих фільтратів перевіряють посівом на живильні середовища з наступним інкубуванням в термостаті протягом декількох діб.

**Стерилізація ультрафіолетовим промінням.** В лабораторії джерелом УФ-опромінення служать спеціальні

бактерицидні лампи. Ці промені використовують для знезараження повітря в приміщеннях (боксах, операційних). Бактерицидні лампи знайшли також своє застосування в харчовій промисловості при зберіганні різноманітних продуктів (температура вище 0°C).

**Ультразвук**, як фізичний стерилізуючий чинник, може бути використаний, наприклад, для знезараження води, молока, деяких продуктів. Стерилізуюча дія ультразвуку пов'язана з виникненням в цитоплазмі бактерій кавітаційних міхурців, заповнених паром з тиском біля 10 тис. атм., внаслідок чого руйнуються внутрішні структури бактеріальної клітини.

**Стерилізація за допомогою хімічних речовин** в лабораторній практиці має обмежене застосування і зводиться до консервування, з метою попередження бактеріального забруднення живильних середовищ, вакцин, а також лікувальних і діагностичних сироваток різноманітними хімічними сполуками (солі металів, луги, антибіотики і ін.). Живильні середовища консервують хлороформом, толуолом, інколи ефіром (для звільнення від консерванту середовище нагрівають до 56°C). Вакцини і лікувальні сироватки консервують фенолом (0,25-0,5%-ним), хлороформом (0,5%), формаліном (0,5%).

Хімічні речовини застосовують в лабораторіях і для дезінфекції.

**Дезінфекція** - це знищення патогенних мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища. Навіть у фіксованих і зафарбованих мазках іноді зберігаються збудники деяких хвороб. Тому дезінфекція в баклабораторії - це обов'язковий повсякденний захід. Дезінфекції не підлягає лише той посуд, де культивувались мікроорганізми; його складають в бікси, пломбують і здають в стерилізацію.

### **Контрольні питання**

1. Поняття «стерилізація», «дезінфекція», їх застосування у практиці.
2. Методи стерилізації.
3. Автоклав, його будова і призначення.
4. Методи дробної стерилізації.
5. Стерилізація сухим жаром.
6. Що таке пастеризація?

## Заняття 7

### Тема: Живильні середовища. Культивування мікроорганізмів і методи отримання чистих культур

**Мета заняття:** вивчити види і призначення живильних середовищ, навчитися готувати звичайні, спеціальні, диференціально-діагностичні і синтетичні середовища. Ознайомитися з будовою термостата, анаеростата і їх призначенням; засвоїти техніку посівів бактерій на живильні середовища. Засвоїти діагностичне значення виділення чистої культури і оволодіти методами, які застосовуються для отримання чистої культури.

**Матеріальне забезпечення.** Пробірки з МПБ, МПА скошений та стовпчиком, МПЖ, агар Ендо, Левіна, ЖС Кітта-Тароцці, пробірки з вуглеводами, молоко з лакмусом, молоко з метиленовою синькою, агар Ейкмана, кров'яний агар, зразки сухих живильних середовищ фабричного виробництва, компоненти живильних середовищ – агар-агар, желатина, пептон, сіль. Пробірки з лимонно-жовтим стафілококом, сінною паличкою, кишковою паличкою, бактеріологічні петлі, ексікатор, прилад Міхаеліса.

**Зміст заняття:** студенти знайомляться з рецептурою приготування живильних середовищ. Проводять посіви мікроорганізмів на живильні середовища (МПБ, МПА, МПЖ, Ендо). Знайомляться з будовою термостата, ексікаторів. Засвоюють техніку виділення чистої культури методом Дригальського.

Для постановки діагнозу часто необхідно виділити збудника хвороби в чистій культурі. Для розмноження мікробів в лабораторії їх вирощують на живильних середовищах у термостатах. Живильні середовища за консистенцією бувають щільні та рідкі. За складом: білкові, безбілкові та мінеральні (розчини). За походженням: природні - тваринного походження (молоко, яйця, жовч, кров, кров'яна сироватка) та рослинного походження (овочі, плоди, соки, зерно гороху тощо) . Широке застосування знайшли штучні середовища тваринного походження (МПА, МПБ, МПЖ) та рослинного (настої і відвари сіна, соломи, дріжджів, пивне сусло).

Любе живильне середовище повинно відповідати таким вимогам:

1. Містити поживні речовини необхідні для росту даного мікроорганізму в певних пропорціях.
2. Бути вологим, так як мікроорганізми засвоюють речовини з розчинів (голозойним шляхом).

3. Бути стерильним.

4. Бути прозорим - ця вимога тільки для тих середовищ, на яких вивчаються культуральні і біохімічні властивості (МПА, МПБ, МПЖ, вуглеводні середовища) .

5. Повинно мати слабо лужну реакцію (рН 7,2-7,4), крім тих, які призначені для вирощування молочнокислих бактерій та грибів.

Живильні середовища за своїм призначенням поділяють на звичайні (прості), кольорові і спеціальні. До простих відносять молоко, картоплю, МПБ, МПЖ, МПА. Кольорові - це середовища з індикаторами, які змінюють свій колір при виділенні продуктів життєдіяльності мікробів - кислот, ферментів. Спеціальні середовища готують для тих мікроорганізмів, які не ростуть на звичайних середовищах.

Агар-агар – це речовина, яку отримують з морських водоростей. Сорти: одеський, архангельський та інші. Складається з пектинових азотистих речовин і вуглеводів. Агар, як поживну речовину, більшість патогенних мікробів не використовують. Желатина – білкова речовина, яка отримується при виварюванні кісток, хрящів тварин. В гарячих розчинах агар і желатина розбухають і перетворюються на драглисту масу.

Для вирощування майже всіх збудників хвороб в заводських умовах виготовляють сухі живильні середовища. На етикетках вказано скільки необхідно взяти порошку на літр дистильованої води. Приготовані середовища нагрівають до розчинення порошку, визначають рН, фільтрують і стерилізують.

Кольорові живильні середовища (Гісса) використовують для визначення цукролітичних властивостей бактерій.

Середовища для визначення ферментації вуглеводів: агар Ендо – бактерії, які розкладають лактозу, фарбують середовище в червоний колір, а негідролізуючі – утворюють безбарвні колонії. Середовище Левіна – має фіолетовий колір; бактерії, що розщепляють лактозу утворюють сині або чорні колонії, а що не розщепляють - безбарвні.

Живильні середовища для вирощування анаеробів: Кітта-Тароцці, кров'яний цукровий агар, мозкове середовище. Середовища для вирощування грибів: Сабуро, агар Чапека.

**Техніка посіву мікробів.** Посіви для вирощування аеробів здійснюють як з нативного матеріалу, що надсилається в лабораторію, так і з вже наявних бактеріальних культур. Живильні середовища повинні бути стерильними. Посіви з проб матеріалу, що надійшов в

лабораторію, проводять пастерівською піпеткою, з бактерійної маси — бактеріологічною петлею (рис. 4). Бактеріологічну петлю перед взяттям клітин мікроорганізмів стерилізують (рис. 2). Для цього дріт нагрівають до червона в полум'ї спиртівки і одночасно обпалюють частину тримача, що ближче до петлі, яка буде вводитися в пробірку з мікроорганізмами. Петлю рекомендується тримати в полум'ї спиртівки майже вертикально, щоб дріт був рівномірно розпечений на всій довжині. При фламбуванні необхідно пам'ятати, що найвища температура розвивається у верхній і периферичній частинах полум'я (рис. 3), тому не слід опускати петлю безпосередньо до спиртівки. Зразу ж після стерилізації петлю вводять в пробірку з мікроорганізмами. Щоб не пошкодити клітин мікроорганізмів, петлю спочатку охолоджують, доторкаючись нею до внутрішньої поверхні пробірки або до живильного середовища, вільного від клітин мікроорганізмів, і тільки після цього захоплюють невеличку кількість мікробної маси.



Рис. 2 Техніка посіву мікроорганізмів

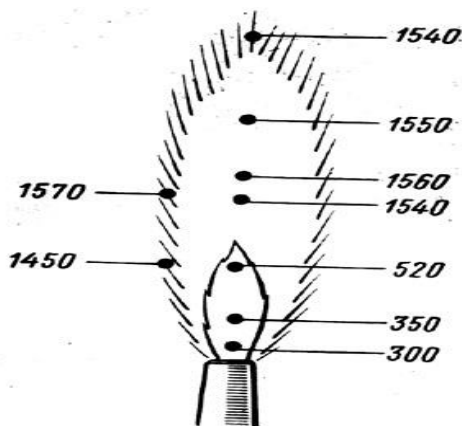


Рис.3. Значення температури (°C) в різних ділянках полум'я

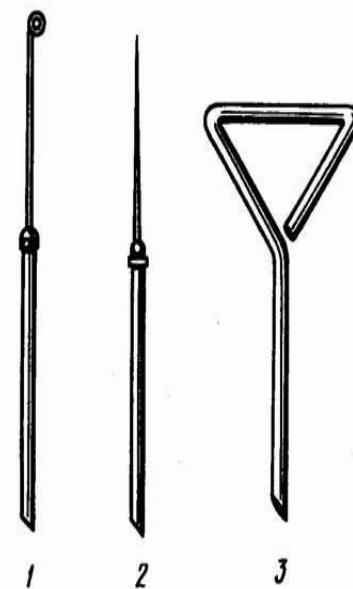


Рис.4. Інструменти для посіву і розсіву культур мікроорганізмів:  
1-мікробіологічна петля;  
2-мікробіологічна голка;  
3-шпатель

Посів обов'язково потрібно робити над полум'ям спиртівки. При посіві в рідкі середовища (МПБ, молоко) пробірку з матеріалом, що досліджується і пробірку з живильним середовищем тримають в лівій руці, в правій розташована петля або піпетка для переносу матеріалу в середовище і корки від пробірок. Біля полум'я спиртівки петлю (або піпетку) вносять в пробірку з матеріалом, беруть

одну краплю, після цього обережно переносять в пробірку з стерильним середовищем, злегка занурюючи в нього, після цього обережно виймають, закривають корками пробірки, петлю фламбують над полум'ям спиртівки (пастерівську піпетку занурюють в банку з дезрозчином - фенолом, формаліном). Стежать, щоб не змокрили корки.

При посіві на щільне середовище пробірки з мікробною культурою і стерильним живильним середовищем (МПА) беруть в ліву руку, тримають скошеною поверхнею МПА доверху, корками в бік полум'я спиртівки. У відкриту у полум'ї пробірку з мікробною культурою, яку засіваємо (або іншим матеріалом) обережно опускають петлю, злегка торкаючись до поверхні вмісту пробірки, і, взявши одну краплю, переносять її в іншу пробірку зі стерильним середовищем. Петлю опускають до дна пробірки, занурюють в конденсаційну рідину і роблять посів штрихом — зигзагоподібними рухами проводять петлею вверх вздовж поверхні середовища. Пробірки закривають, петлю фламбують. Всі засіяні пробірки ставлять в термостат для вирощування. Через 16-18 або 24-48 год враховують результат.

**Культивування мікроорганізмів** відбувається в термостатах при певних температурах. Збудників хвороб теплокровних тварин культивують при 37-38°C, людини – 36-37°C, бджіл – 34-35°C, грибів – 28-30°C. Крім забезпечення температурного режиму, необхідно враховувати тип дихання мікроорганізмів: при аеробному типі дихання ніяких додаткових умов створювати не потрібно. Для анаеробів необхідно вилучити доступ вільного кисню повітря. З цією метою використовують ексікатор. З ексікатора фізичним, хімічним або біологічним методом видаляють повітря і ставлять його в термостат. Фізичний - за допомогою насоса викачують повітря, хімічний - на дно ставлять чашку Петрі з хімічними речовинами, які активно зв'язують кисень повітря (пірогалол + їдкий натр), біологічний - на одну половину поживного середовища засівають аеробний мікроб, а на другу - анаеробний.

**Виділення чистих культур.** Вид – це сукупність мікроорганізмів, які мають однакове походження і генотип, подібну будову та функціональні ознаки. Ріст мікробних клітин одного виду на щільному або рідкому живильному середовищі називають **чистою культурою**. Культури мікробів одного виду, які вилучені з різних джерел, або з одного й того ж джерела, але в різні часи називають **штамом**. Види складаються з індивідуумів, які відрізняються між собою за якоюсь ознакою або групою ознак - це **варіанти**.

Розрізняють культуральні, біохімічні, серологічні варіанти або варієтети за визначником Берджі. Культура, отримана внаслідок розмноження однієї клітини називається *клоном*. Клони широко використовують в науково-дослідних закладах. Бактерії одного виду, які виростили на щільному середовищі складають *колонію*.

Чисті культури необхідні для ідентифікації виду, приготування діагностичних, лікувальних і профілактичних препаратів, отримання в промислових умовах антибіотиків, ферментів, вітамінів, біогенних стимуляторів, виготовлення певних сортів молочних продуктів, вин, пива тощо. Належність мікробної культури до певної систематичної групи (класу, родини, роду, виду, варієтету) встановлюють шляхом вивчення морфологічних, тинкторіальних, культуральних, біохімічних, антигенних ознак. Велике значення в визначенні видів має пігментоутворення. Червоний пігмент утворює *Serratia marcescens*, білий – *Staph. albus*, золотистий - *Staph. aureus*, синьо-зелений - *Pseudomonas aeruginosa*, чорний - *Aspergillus niger*.

**Виділення чистої культури.** Один з перших методів був запропонований Пастером – *метод розведення* - полягає в тому, що матеріал, який досліджується послідовно розводять в рідкому живильному середовищі: беруть ряд пробірок зі стерильним МПБ (по 9-10 мл), матеріал, що досліджується піпеткою вносять в першу пробірку, перемішують, після цього з неї невелику кількість (0,1 мл) переносять в другу, після перемішування — в третю і т. д. (інколи до 10 пробірок) . Пастер вважав, що в останній пробірці можливе зростання одного виду мікроба. Цей метод використовують тільки як допоміжний при інших засобах.

**Метод Дригальського** – метод пластинчатого посіву. Беруть 4–5 стерильних чашок Петрі. Агарове середовище в колбі розплавляють на водяній бані, після цього, вийнявши пробку, злегка прогрівають краї колби і агар розливають в чашки Петрі рівномірним шаром. Закриті кришкою чашки Петрі залишають на столі. Після ущільнення середовища чашки ставлять в термостат для підсушування вверх дном на 3-4 години при 37-38°C. Краплю матеріалу, що досліджується бактеріологічною петлею вносять на поверхню агару, шпателем Дригальського розтирають рівномірно по поверхні середовища. Цим же шпателем, не опалюючи його, розтирають (засівають) по поверхні середовища другої чашки, після цього послідовно в третій, четвертій чашках. Після посіву їх розміщують у термостаті вверх дном. Зростання ізольованих колоній досягається в останніх чашках. Далі потрібну

колонию відзначають, відвивають в МПБ і МПА, ставлять в термостат для вирощування.

Для отримання чистих культур користуються і іншими методами: нагріванням, додаванням до живильних середовищ (або до матеріалу, що досліджується) хімічних речовин, біологічним методом (зараження лабораторних тваринних). В випадках необхідності відділення *спорових форм від видів, які не утворюють спори*, готують суспензію матеріалу, що досліджується, прогривають її в водяній бані при 80°C 30-40 хв. – вегетативні форми мікроорганізмів гинуть, спори зберігаються життєздатними. Далі прогріту суспензію висівають методом Дригальського.

**Хімічний метод** полягає в тому, що хімічні речовини в певній концентрації додають до живильних середовищ. Дія цих речовин на різні види мікробів неоднакова: одні види гинуть (бактерицидна дія), інші — затримуються в своєму рості (бактеріостатична дія), а на треті ці речовини не виявляють згубного впливу. На цьому принципі засноване застосування вибіркового і елективного середовищ.

**Біологічний метод** дозволяє виділити чисту культуру тільки патогенних хвороботворних мікроорганізмів: матеріал, що досліджується (суспензія тканини, суспензія бактерій) вводять чутливій тварині (біла миша, морська свинка, голуб, кріль). Тварини гинуть, їх розтинають, і посіви з внутрішніх органів дозволяють виділити чисту культуру.

**Отримання чистої культури анаеробів.** Принцип зберігається той же, що і при роботі з аеробами, тільки використовують спеціальні середовища: застосовуючи метод Дригальського, посів проводять на глюкозо-кров'яний агар в чашках Петрі, які після цього поміщають в умови анаеробіозу (в ексикатор, мікроанаеростат). Користуються також засобом посіву на середовище Вільсона–Блера. Коли зростають окремі чорні колонії, їх пересівають в середовище Кітта–Тароцці, одержуючи таким чином чисту культуру. Для цієї ж мети може служити біологічна проба: матеріалом що досліджується (або змішаною культурою) заражають чутливу лабораторну тварину. Після її загибелі і розтину – проводять посіви в середовище Кітта–Тароцці, напіврідкий агар високим стовпчиком або на глюкозо-кров'яний агар, як згадано вище.

### **Контрольні питання**

1. Призначення живильних середовищ і вимоги до них.
2. Класифікація живильних середовищ.



3. Живильні середовища для культивування грибів.
4. Культивування аеробів.
5. Культивування анаеробів.
6. Метод Пастера, Дригальського.
7. Що таке вид, клон, штам, варіант, чиста культура?

## **Заняття 8**

### **Тема: Культуральні і біохімічні властивості мікроорганізмів**

**Мета заняття:** вивчити культуральні, цукролітичні, протеолітичні, редуційні властивості мікроорганізмів отриманих на попередніх заняттях і визначити їх видову належність за визначником.

**Матеріальне забезпечення.** Предметні та покривні скельця, культури стафілокока, кишкової палички в напіврідкому агарі, в МПБ, МПА, МПЖ, середовища з різними вуглеводами, молоко з лакмусом, молоко з метиленовою синькою, агар Ендо, агар Левіна, Плоскірева, МПБ з додаванням 2% азотнокислого калію, кров'яний агар, фільтрувальний папір, просочений 12% водним розчином щавлевої кислоти і 10% розчином оцтово-кислого свинцю, пробірки і чашки Петрі з посівами попереднього заняття, набори для фарбування за Грамом, Ціль-Нільсоном.

**Зміст заняття:** студенти враховують результати посівів на попередньому занятті - при консультації викладача відмічають характер росту на рідкому і щільному живильних середовищах. Культури розглядають макроскопічно (візуально) і мікроскопічно (під лупою). Потрібну колонію пересівають в пробірки з середовищами для визначення цукролітичних, протеолітичних і редуційних властивостей мікроорганізмів, ставлять у термостат. Викладач знайомить студентів з існуючими визначниками мікробів і технікою визначення виду. З колоній, які виростили на МПА студенти роблять мазки і фарбують їх за Грамом і Ціль-Нільсоном. Використовуючи основні ознаки, визначається вид мікроорганізмів.

**Культуральні властивості.** Колонії, які виростили, характеризують за розміром, формою, кольором, консистенцією, контуром краю, структурою та характером поверхні.

Зростання мікроорганізмів в рідких живильних середовищах не характеризується великою різноманітністю. При макроскопічному дослідженні (неозброєним оком) відзначають характер і ступінь помутніння середовища: рівномірне (дифузне), інтенсивне, помірне,

слабке і у вигляді опалесценції. Зростання культури в рідкому середовищі може бути поверхневим у вигляді плівки на всій поверхні середовища, підійматися (загинатися) на стінки пробірки або займати тільки частину поверхні середовища, не доходячи до стінки пробірки. Враховують колір плівки (блакитний, жовтуватий, сірий, білий), товщину (тонка, товста, ніжна, груба), характер поверхні плівки (складчаста, зморшкувата, гладка, сітчаста, пухнаста), консистенцію (крихка, ослизла,). Культури мікробів деяких видів в рідкому середовищі утворюють осад – він може бути численний і незначний, щільний (компактний), пухкий, зернистий, у вигляді шматочків вати, пластівців, ослизлий. За кольором – білий, жовтий, матовий, зеленуватий, сіруватий та ін. При струшуванні осад або розбивається, створюючи рівномірне помутніння середовища, або утворюються великі або ж дрібні пластівці, грудки; ослизлий осад може підійматися уверх в вигляді «коси» з помутнінням середовища, або воно при цьому залишається прозорим.

Зростання культури в рідкому середовищі може бути пристінним. Воно супроводжується прикріпленням та розмноженням мікробів на склі (на стінках пробірок) з утворенням характерного матового нальоту, дрібних пластівців, зерен.

Зростання мікробів в напіврідкому середовищі, що не володіють рухливістю, відбувається за уколом у вигляді білуватого стрижня. Навколишнє середовище при цьому залишається прозорим. Рухомі мікроорганізми викликають помутніння напіврідкого агару різної інтенсивності, що розповсюджується у вигляді «хмарок». Посів мікробів в МПА, МПЖ (стовпчиком) роблять уколом суворо по центру в глибину середовища або в безпосередній близькості до стінки пробірки.

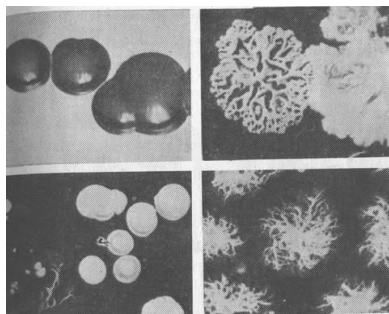


Рис. 5. Колонії різних мікроорганізмів на МПА

Зростання мікробів на щільних живильних середовищах (МПА) супроводжується утворенням колоній – скупчень мікробів (рис 5), що утворюються в результаті розмноження однієї бактеріальної клітини. Колонії характеризуються великою різноманітністю, можуть бути ізольованими і злитими. Вивчення їх проводять неозброєним оком і з допомогою

мікроскопа або лупи. Звичайно заздалегідь відзначають характер зростання – численний, помірний, незначний; після цього враховують наступні ознаки:

А) форма – правильна (овальна, округла), неправильна (зіркоподібна, гілляста та ін.);

Б) розмір (вимірюють з допомогою лінійки або окуляра-мікрометра мікроскопа) – великі (діаметр понад 4 мм), середні (діаметр 2-4 мм), дрібні (діаметр 1-2 мм) і дрібні – росяні (діаметр менше 1 мм);

В) край колонії (рис 6) – рівний (S-форма), шорсткий (R-форма), хвилястий, бахромчастий, зубчастий, локоноподібний;

Г) прозорість і блиск – прозора, напівпрозора, мутна колонія;

Д) колір – сірувато-білий, безбарвний, білий, кремовий, оранжевий, блакитний, зелений, золотистий, жовтий,

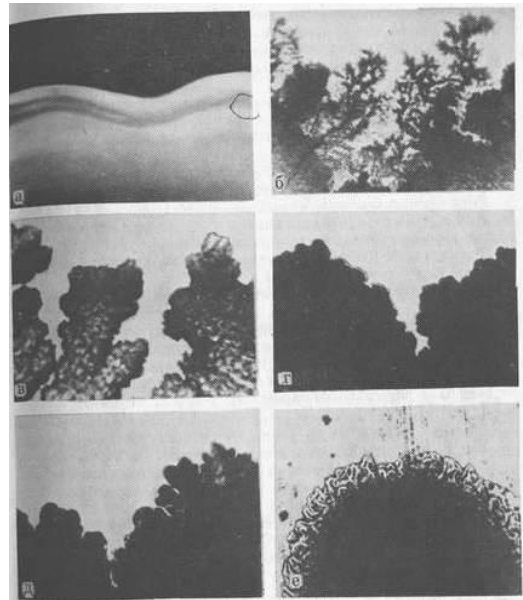


Рис.6. Край колоній мікробів:  
1-хвилястий; 2-гіллястий;  
3-розірваний; 4-різаний;  
5-лопасний; 6-локоноподібний

червоний, синій, чорний та ін. Колір колоній культури бактерій залежить від кольору пігменту, який вони виробляють;

Е) профіль (рельєф) (визначають у відбитому світлі) – опуклий, плоский, конусоподібний, кратероподібний, з валиком по колу;

Ж) поверхня (рис. 7) - гладка, горбкувата, зморшкувата, складчаста, з концентричними колами;

З) консистенція (визначають дотиком до поверхні колонії бактеріологічною петлею) – щільна (легко знімається з агару або

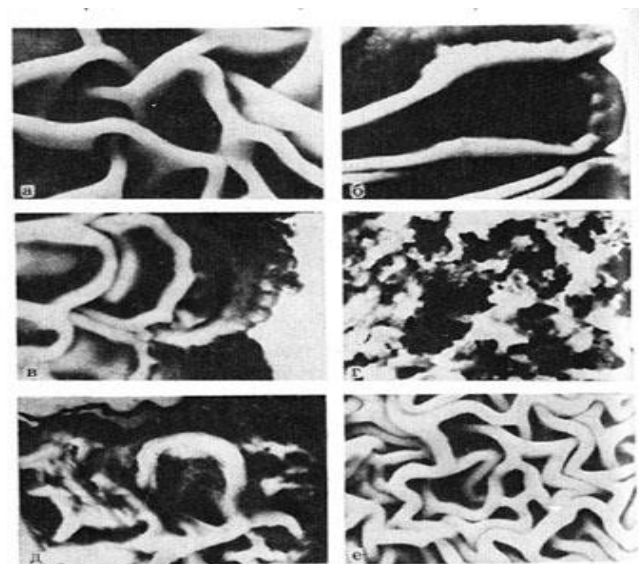


Рис.7. Поверхня колоній мікробів:  
1-складчаста; 2-радіально складчаста; 3-поперечно складчаста; 4-ніздревата; 5-з кратероподібним центром; 6-мозковидна

вростає в товщу середовища), крихка, крихка, ослизла (тягуча, прилипає до петлі), тістоподібна, олієподібна;

І) структура - однорідна, волокнувата, плівчаста, зерниста.

При перегляді колоній під мікроскопом чашки Петрі розміщують на предметний столик дном уверх, а пробірки з агаровою культурою – скошеною поверхнею агару донизу. На поверхні агару при посіві штрихом бактерії ростуть у вигляді ізольованих колоній або утворюють суцільний наліт з рівними, хвилястими, краями. Інколи цей наліт буває дифузним, перистим або ризоїдним (деревоподібним). При цьому відзначають колір, характер поверхні, консистенцію, прозорість штриху.

Колонії *вивчають* у віці однієї доби!

Культуральні властивості анаеробів вивчають на середовищі Цейслера. Вони утворюють десять видів колоній. Для ветлікаря мають значення шість з них:

1. Гудзикоподібні підвищення. Колонії оточені великою коричнево-болотистою непрозорою зоною - *СІ. perfringens*.

2. Округлі, коренеподібні, безбарвні або ніжно сірі колонії - *СІ. botulinus*, *СІ. oedematiens*.

3. Вуалеподібні із зрізаними краями колонії, часто з ніжними відростками, безбарвні. Легкий гемоліз - *СІ. tetani*, *Vibrion septique*.

4. Колонії мають вигляд перламутрового гудзика і форму виноградного листа. Плоскі з підвищеннями в центрі, ніжно синьо-фіолетового відтінку. Незначний гемоліз - *СІ. chauvoei*.

5. В'язкі, іноді у вигляді твердих бородавок колонії, білі або непрозорі. Часто вузька інтенсивна зона гемолізу - *СІ. sporogenes*.

6. Білі, ніжно блакитні або безбарвні майже круглі, дуже дрібні колонії. Оточені ніжним гемолізом - *СІ. histolyticum*, а іноді *СІ. tetani*.

**Біохімічна активність мікроорганізмів** дуже різноманітна і зумовлена наявністю у них специфічних ферментних систем, а також умовами навколишнього середовища. Ферменти відіграють велику роль у життєдіяльності мікробів. Вони беруть участь у різноманітних біохімічних реакціях, що лежать в основі живлення, дихання, росту і розмноження мікроорганізмів. В лабораторній мікробіологічній практиці вивчення біохімічних властивостей бактерій є одним з найважливіших диференціально-діагностичних засобів точного розпізнавання збудника інфекційної хвороби.

*Цукролітичні властивості* виявляють при посіві бактерій на диференціально-діагностичні середовища з різними вуглеводами і індикатором. Частіше застосовують середовище Гісса (з індикатором Андреде). Набір середовищ з різними вуглеводами (глюкоза, лактоза, мальтоза, цукроза, манніт, дульцит, і ін.), стерильне знежирене просте

молоко, молоко з лакмусом, молоко з метиленовим синім — називають *строкатим рядом*. Посіви культур здійснюють за звичайною методикою бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою. Після інкубування в термостаті враховують результат ферментації вуглеводів: зміна кольору живильного середовища (в червоний колір з індикатором Андреде) означає розщеплення вуглеводу і утворення в середовищі кислих продуктів розпаду. Якщо при розщепленні даного вуглеводу утворюється не тільки кислота, але й газоподібні речовини, останні виштовхують частину рідини з поплавця, і міхурці газу збираються у його верхній частині. Для визначення цукролітичних властивостей часто застосовують напівщільні середовища з вуглеводами і індикатором ВР (суміш водного блакитного з розоловою кислотою), а також щільні середовища з вуглеводами і індикатором (агар Ендо, агар Левіна, Плоскірева).

Для виявлення протеолітичної спроможності мікроорганізмів культуру, що досліджується засівають в МПЖ, просте молоко. Посів мікробів в МПЖ стовпчиком проводять уколом, зануливши голку (або петлю) з культурою, що досліджується, вглиб живильного середовища до дна пробірки. В тих пробірках, де під дією ферментів бактерій відбудеться протеоліз желатини, середовище розріджується. Мікроби різноманітних видів розріджують МПЖ неоднаково. Одні з них у вигляді лійки (збудник сибірки), інші – у вигляді «панчохи» (стафілококи) . Буває розрідження пошарове (синьогнійна паличка та ін.).

Спроможність мікроорганізмів гідролізувати казеїн визначають на молочному агарі Ейкмана. Посів здійснюють петлею і шпателем по всій поверхні середовища, щоб одержати ізольовані колонії. Витримують в термостаті 24-48 год. Протеоліз виявляється пептонізацією казеїну – навколо колоній утворюється чітка зона просвітлення молочного агару. При посіві в молоко протеоліз виявляється просвітленням стовпчика молока, появою пухкого або ослизлого відстою на дні пробірки.

*Ступінь протеолізу і глибину розщеплення білка у різних видів бактерій визначають шляхом утворення кінцевих продуктів розпаду (індол, сірководень, аміак та ін.)*

Індол встановлюють різноманітними способами. Найбільш доступним і зручним вважається спосіб з використанням індикатору, що виготовлений за рецептом:

- фільтрувальний папір просочують гарячим насиченим водним 12%-вим розчином щавлевої кислоти, висушують на повітрі, розрізають на смужки (10\*0,5 см) і зберігають в скляній банці з притертою кришкою. Щоб виявити утворення індолу, культуру, що досліджується засівають у пробірку з МПБ або бульйоном Хоттінгера, куди вставляють індикаторний папір, притискаючи його кінець ватним корком (нижній край паперу не повинен торкатися живильного середовища). Витримують в термостаті при 37°C 1-3 доби. За наявності індолоутворення нижня частина індикаторного паперу фарбується в рожевий колір.

*Визначення сірководню* проводять на щільному середовищі МПА, яке містить сірчаноокисле залізо, гіпосульфід натрію, глюкозу, індикатор фенолрот водний. Посів роблять на скошений агар, а після цього уколом в нижню частину стовпчика середовища. За наявності сірководню під впливом бактеріальної культури стовпчик середовища рожевіє, нижня частина фарбується в чорний колір.

Інший спосіб визначення сірководню в рідкому середовищі заснований на почорнінні фільтрувального паперу з 10%-вим розчином оцтовокислого свинцю (утворюється сірчистий свинець чорного кольору).

*Визначення аміаку.* В пробірці з засіяною бактеріальною культурою закріплюють між стінкою пробірки і корком рожевий лакмусовий папір, що в присутності аміаку синіє. Аміак в середовищі можна також виявити з допомогою реактива Несслера. Для цього у фарфорову чашку піпеткою вносять краплю культури амоніфікаторів, вирощених на МПБ, і стільки ж реактива Несслера.

При наявності аміаку суміш забарвлюється в жовтий або коричневий колір, в залежності від його кількості. Коричневе забарвлення вказує на великий вміст продукту гnilісного розкладу.

*Редукуючі властивості мікробів* визначають на підставі зміни кольору органічної фарби (метиленової синьки, малахітової зелені, нейтрального червоного та ін.), що внесені в живильні середовища (часто в молоко). Петлю культури, що досліджується, висівають в середовище з фарбою, інкубують в термостаті 24 год. Під впливом мікробних ферментів барвник відновлюється, відбувається його знебарвлення або зміна вихідного кольору.

*Визначення каталази* можна здійснювати різними способами.

1. На поверхню добової агарової культури рівномірно тонким шаром наливають 1 мл 1%-ного розчину перекису водню. За наявності каталази відзначають виділення міхурців кисню.

2. На предметне скло наносять краплю 3-10%-вого розчину перекису водню та вносять в нього петлю з бактеріальною агаровою культурою. Виділення міхурців газу(кисню) свідчить про наявність у мікробів каталази.

*Визначення гемолітичних властивостей.* Бактерії деяких видів в процесі життєдіяльності продукують особливі речовини, які володіють лізуючою дією на еритроцити – гемотоксини (білкової природи), що руйнують оболонку еритроцитів. Для визначення гемолітичної активності бактеріальні культури висівають на живильні середовища, що містять 5% дефібринованої крові (частіше кров'яний МПА). При зростанні мікроорганізмів, що володіють гемолітичними властивостями, навколо колонії в результаті лізису еритроцитів утворюється прозора зона (безбарвна або пофарбована). В рідких середовищах при гемолізі середовище стає прозорим (червона лакова кров).

### **Контрольні питання**

1. Характер росту мікроорганізмів на МПБ.
2. Характер росту мікроорганізмів на щільному живильному середовищі.
3. Методи визначення цукролітичних властивостей.
4. Визначення протеолітичних властивостей мікроорганізмів.
5. Методи визначення індолу, аміаку, сірководню.
7. Техніка визначення видів мікроорганізмів.

## **Заняття 9**

### **Тема: Методи зараження лабораторних тварин. Правила відбору і пересилки патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження. Дослідження патологічного матеріалу**

**Мета заняття:** ознайомити студентів з методами зараження лабораторних тварин, правилами відбору і пересилки патматеріалу для бактеріологічного дослідження. Вивчити схему дослідження патологічного матеріалу.

**Матеріальне забезпечення:** білі миші, морські свинки, кролі для демонстрації різних методів зараження.

Стерильні шприци і голки, фізіологічний розчин, 5% спиртовий розчин йоду, ватні тампони, 70% спирт, металеві шпателі, спиртівки, ножиці. Патматеріал (шматочки тканин). Труп білої мишки, парафінований папір, банки з кришкою, 5% розчин фенолу, 30% розчин гліцерину, 10% розчин хлорного вапна, МПБ, МПА, набір для фарбування за Грамом.

**Зміст заняття:** студенти знайомляться з методами зараження лабораторних тварин з метою визначення патогенності мікроорганізмів та виділення чистих культур.

Самостійно фіксують лабораторних тварин і заражають підшкірним, внутрішкірним, внутрім'язовим інтраперитоніальним, оральним, інтраназальним методами. Далі розтинають труп білої миші. Беруть патматеріал, консервують, пакують і пишуть супровідну в ветлабораторію. Знайомляться з порядком проведення бактеріологічного дослідження патматеріалу і постановкою діагнозу. Роблять мазки-відбитки з паренхіматозних органів, посіви на МПА. Фарбують мазки за Грамом.

При дослідженні того або іншого матеріалу, щоб виділити чисту культуру патогенного мікроба, або виявити його вірулентність проводять зараження лабораторних тварин. Застосовують такі способи зараження:

1) через шлунково-кишковий тракт – культура мікробів дається з кормом;

2) підшкірно - матеріал, що досліджується, шприцом вводиться безпосередньо під шкіру (морським свинкам в ділянці черева, або стегна, мишам - ближче до основи хвоста, кролям - в ділянці черева);

3) внутрішньошкірно - безпосередньо в шкіру (0,1-0,2 мл);

4) внутрішньом'язово - в товщу м'язів (в області стегна);

5) в черевну порожнину - при цьому тварину тримають головою донизу, для того, щоб не травмувати кишечник;

6) інтравенозно - шляхом ін'єкції в вену, кролям - в зовнішню вушну краєву, мишам - хвостову;

7) субдурально - під тверду мозкову оболонку;

8) скарифікація - скальпелем роблять насічки на шкірі і в них втирають дослідний матеріал, або бактеріологічну культуру.

Місце введення в організм дослідного матеріалу необхідно обробити: вистригти шерсть, протерти шкіру спиртом, змастити йодом. При зараженні тварин необхідно забезпечити їх фіксацію.



Бактеріологічне дослідження необхідно проводити одразу ж після загибелі тварини. Тіло тварини фіксують у спинному положенні в кюветі з парафіном. Місце розрізу дезінфікують 5% розчином фенолу. Розтинають шкіру по білій лінії живота, далі шкіру відпрепаровують від м'язів, роблять поперечні надрізи і шкіряні клапти відводять в сторону. Розтинають грудну порожнину. Враховують патологічну картину, записують дані до журналу експертизи. Поверхню серця, легенів, лімфатичних вузлів запікають нагрітим скальпелем, пастерівською петлею пропалюють в цьому місці орган, беруть невелику кількість крові і висівають її на живильні середовища. Далі розтинають черевну порожнину. Пінцетом відтягують доверху черевну стінку і ножицями розрізають її від діафрагми до анального отвору. Оглядають органи черевної порожнини, беручи до уваги розміри, колір та консистенцію паренхіматозних органів, стан кишечника, наявність ексудату в черевній порожнині та його характер. Опісля припікання поверхні роблять посіви з печінки, селезінки, лімфатичних вузлів та при необхідності - із вмісту кишечника. Паралельно з тканин та органів роблять мазки-відбитки.

Усю роботу з трупами тварин проводять, дотримуючись заходів безпеки, які попереджують розповсюдження збудника інфекції. Після закінчення дослідження трупа кювети і робочий стіл дезінфікують. Інструменти стерилізують. Трупи тварин і окремі органи знезаражують автоклавуванням.

Патологічний матеріал, який отримали після розтину трупа зараженої лабораторної тварини, або надісланої до лабораторії досліджують в такій послідовності:

1. Виготовляють мазок, фарбують простим методом, або за Грамом з метою виявлення мікробів (мазки зберігають як документ).
2. Проводять посів на щільні живильні середовища і ставлять в термостат.
3. Вивчають колонії (через добу).
4. Відсівають колонії на щільні середовища і ставлять в термостат.
5. Виготовляють з колоній мазки, фарбують за Грамом і проглядають під мікроскопом.
6. Вивчають характер росту мікробів на живильних середовищах (розмір, форму, колір колоній і зміни в живильних середовищах).
7. Виготовляють, фарбують і продивляють мазки з культури із якого-небудь живильного середовища.
8. Досліджують мікроби на рухливість і спороутворення.

9. Відбирають і заражають тварин відповідно з передбачуваними в матеріалі мікробами.

10. Вивчають і співвідносять усі одержані дані та на підставі усіх ознак визначають вид мікроба.

### **Контрольні питання**

1. Яких тварин використовують для біопроби?
2. Методи фіксації лабораторних тварин.
3. Методи зараження лабораторних тварин.
4. Порядок розтину і бактеріологічне дослідження трупів.

## **Заняття 10**

### **Тема: Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків**

**Мета заняття:** ознайомити студентів з визначенням активності антибіотиків і антибіотикорезистентності мікроорганізмів.

**Матеріальне забезпечення:** Дві чашки Петрі з агаром Мюллер-Хінтона, бульйонна культура золотистого стафілококу, паперові диски з антибіотиками, стерильні пробірки, стерильний фізіологічний розчин, пастерівські піпетки, пінцет, спиртівка.

**Зміст заняття:** *Антибіотики* - це речовини мікробного, рослинного або тваринного походження, їх напівсинтетичні та синтетичні аналоги і похідні, що вибірково пригнічують життєдіяльність мікроорганізмів, вірусів, найпростіших, грибів, а також затримують ріст пухлин.

Механізм згубної дії різних антибіотиків на мікроорганізми різноманітний. Так, пеніцилін пригнічує синтез поліпептидів, що входять до складу стінки мікробної клітини, змінює обмін білків і нуклеопротейдів; стрептоміцин порушує проникність клітинної мембрани, процес транскрипції та ін.

Біологічну активність антибіотиків оцінюють в умовних одиницях, які містяться в 1 мл розчину (ОД/мл) або в 1 мг препарату (ОД/мг). У таких антибіотиків, як еритроміцин, новобіоцин, ністатин, трихоцетин та ін. одна одиниця активності еквівалентна 1 мкг препарату. За одиницю антибіотичної активності пеніциліну приймають мінімальну кількість препарату, здатну затримувати ріст штаму *Staphylococcus aureus* 209 у 50 мл поживного бульйону. Активність стрептоміцину вимірюється мінімальною кількістю

антибіотика, який інгібує ріст *Escherichia coli* в 1 мл поживного бульйону. Фактично для більшості антибіотиків 1 ОД відповідає 1 мкг хімічно чистого препарату. Однак є антибіотики, для яких існують винятки. Так, наприклад, для пеніциліну 1 ОД відповідає 0,6 мкг, поліміксину В - 0,1 мкг, ністатину - 0,333 мкг хімічно чистих антибіотиків.

Чутливість різних штамів до антибіотиків неоднакова. Зустрічаються чутливі та антибіотикорезистентні штами мікроорганізмів. Безконтрольне застосування антибіотиків може призвести до збільшення кількості останніх. В останні роки в усьому світі відмічається зростання стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, що веде до збільшення термінів лікування хворих тварин. Це зумовлює необхідність вибору найбільш ефективного антибіотика та визначення його оптимальної концентрації.

Чутливість збудника до антибіотиків визначають методом дифузії в агар (метод дисків) та методом серійних розведень у рідкому або щільному живильному середовищі. Більш зручним і поширеним є метод дифузії в агар. Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків слід визначати у чистій культурі. Для приготування мікробної суспензії (інокулюма) 5-10 однорідних колоній суспендують у 2 мл рідкого середовища або фізіологічного розчину. Бактеріальну суспензію ( $10^3$  -  $10^5$  КУО/мл залежно від виду мікробів) в об'ємі 1 мл рівномірно розподіляють по поверхні середовища при похитуванні чашки, надлишок рідини видаляють піпеткою.

Чашки підсушують при кімнатній температурі протягом 10-15 хв, а потім на них на однаковій відстані кладуть диски з антибіотиками. Відстань від диска до краю чашки і між дисками повинна бути 15-20 мм, тобто на одну чашку діаметром 100 мм слід поміщати не більше 6 дисків (рис. 8). Відразу після аплікації дисків чашки Петрі поміщають в термостат догори дном і інкубують при температурі  $35^{\circ}\text{C}$  протягом 18-24 годин (в залежності від виду досліджуваного мікроорганізму). Після інкубації чашки поміщають догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом  $45^{\circ}$ . Діаметр зон затримки росту виміряють з точністю до 1 мм. Оцінку чутливості мікроорганізму

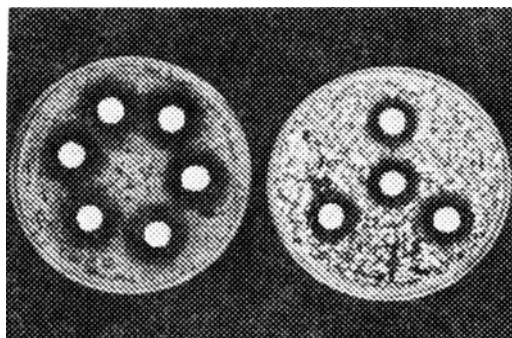


Рис.8 Визначення активності антибіотиків методом дифузії в агар з допомогою паперових дисків.

до антибіотика роблять залежно від розміру зони пригнічення росту. Мікроорганізм вважається чутливим до антибіотика, якщо зона затримки росту дорівнює 15-25 мм, малочутливим - до 15 мм, резистентним - при відсутності зони затримки росту.

**Метод серійних розведень.** У десять пробірок наливають по 2 мл бульйону. Антибіотик розводять до концентрації 100 ОД/мл і 2 мл його вносять у першу пробірку. Після ретельного змішування стерильною піпеткою відбирають 2 мл вмісту першої пробірки й переносять у другу, потім - у третю і т. д., 2 мл вмісту останньої пробірки видаляють. Десята пробірка, що не містить антибіотика, є контролем на ріст мікроорганізму.

Добову культуру досліджуваного мікроорганізму на агарі змивають фізіологічним розчином, доводять до густини 1 млрд за стандартом каламутності й потім розводять так, щоб концентрація його становила 20 тис. мл. По 0,2 мл мікробної суспензії вносять в усі пробірки ряду, починаючи з контрольної.

Пробірки ставлять у термостат на 18—24 годин і враховують результат. При цьому визначають найменшу дозу антибіотика, яка зумовлює повну відсутність ознак росту мікроорганізму (вміст пробірки повністю прозорий) при наявності інтенсивного росту у контрольній пробірці.

### **Контрольні питання**

1. Походження антибіотиків. Мікробний антагонізм.
2. Одиниці дії антибіотиків.
3. Методи визначення активності антибіотиків.
4. Визначення резистентності мікробів до антибіотиків .

### **Заняття 11**

#### **Тема: Санітарно-мікробіологічне дослідження води, повітря та ґрунту**

**Мета заняття:** ознайомитися з правилами відбору ґрунту та води для бактеріологічного дослідження, вивчити методи бактеріологічного дослідження води, повітря та ґрунту.

**Матеріальне забезпечення.** Для дослідження води: батометр, водопровідна вода у колбі, стерильні пробірки, стерильні градуйовані піпетки, стерильні чашки Петрі, МПА, агар Ендо.

Для дослідження ґрунту: наважка ґрунту 10 грам, стерильна вода у колбі, марлева салфетка, стерильні колби для приготування суспензії, мірні циліндри, піпетки на 1 мл, чашки Петрі, пробірки з середовищем Кеслера, МПА, агар Ендо, Левіна.

Для дослідження повітря: чашки Петрі з МПА.

**Санітарно-бактеріологічне дослідження води.** З відкритих водосховищ проби води відбирають з глибини 10-15 см від поверхні і на відстані 10 — 15 см від дна. Із водопроводу воду беруть в стерильні флакони з притертим корком ємністю 0.5 л, а з глибини водосховища – прив'язаним до жердини батометром або скляною посудиною з притертим корком, до якого прикріплений шнур. Водопровідну воду наливають після попереднього пропалювання крана і витікання перших порцій води з нього протягом 10-15 хв. Воду з колодязя необхідно брати до початку користування ним або через 10-12 год. після припинення користування. Проміжок часу з моменту взяття проби до бактеріологічного дослідження не повинен перевищувати 2 год. (при температурі 1-5°C можна зберігати до 6 год.).

*Визначення загальної кількості бактерій у воді.* Загальна кількість бактерій у воді показує кількість бактерій у 1 мл води. Воду перед посівом розводять стерильною водопровідною водою 1:10, 1:100 і далі в залежності від забруднення. З кожної проби беруть для посіву не менше двох різних розведень. Воду з артезіанських свердловин та водопроводів можна засівати не розводячи, в кількості 0,5-1 мл. Воду що досліджують добре перемішують і проводять посів у чашки Петрі: 1 мл води градуйованою піпеткою переносять в стерильну чашку, злегка піднявши її кришку. Після цього в чашку наливають 10-12 мл розплавленого та охолодженого до 45°C МПА, чашку закривають і коловими рухами ретельно перемішують МПА з водою.

Чашки ставлять в термостат на добу. По кількості колоній, що вирости судять про кількість мікробів у воді. Загальна кількість бактерій в 1 мл водопровідної води не повинна перевищувати 100 (від 100 до 1000 колоній – вода сумнівна, від 1000 і більше – не придатна до споживання), а відкритих водосховищ – не більш 1000.

*Визначення колі-титру води.* Наявність у воді кишкової палички є наслідком фекального забруднення і вказує на можливість обсіменіння води патогенними мікроорганізмами. Ступінь забрудненості води кишковою паличкою характеризують колі-титром, що є найменшою кількістю води, в якій виявляють кишкову паличку, або колі-індексом (кількістю кишкової палички, що міститься в 1000 мл води). Для

визначення колі-титру використовують бродильну пробу і засіб мембранних фільтрів.

Суть бродильної проби полягає в тому, що воду, яка досліджується в певній кількості висівають на середовище накопичення, після цього за наявності зростання, характерного для кишкової палички, пересівають на диференціально-діагностичні середовища. Беруть три об'єми водопровідної води по 100 мл, три – по 10 мл і три – по 1 мл. Воду в цій кількості висівають в колби і пробірки з глюкозо-пептонним або лактозо-пептонним середовищем з індикатором і «поплавком». Усі посіви ставлять в термостат на 24 год. За відсутності зростання мікробів, утворення кислоти і газу – результат негативний (вода доброякісна). З пробірок, в яких є зростання бактерій (помутніння і зміна кольору середовища), проводять посів штрихом на поверхню середовища Ендо або Левіна і ставлять в термостат на 16-18 год. З колоній, характерних для бактерій групи кишкової палички, готують мазки, фарбують, мікроскопують. Культуру вивчають за оксидазним тестом – фільтрувальний папір змочують розчином нафтол-диетил-п-фенілендіаміна. Після цього 2-3 ізольовані колонії кожного типу з агару Ендо знімають петлею і переносять штрихом на змочений реактивом папір. Відсутність зміни в забарвленні паперу (негативний результат оксидазної проби) а наявність грамнегативних паличок в препараті (мазку) свідчать про зростання кишкової палички.

Титр кишкової палички для водопровідної води допускається не менше 333 мл, для води відкритих водосховищ – орієнтовно не менше 111 мл.

*Спосіб мембранних фільтрів частіше застосовують в лабораторній практиці. Полягає він у тому, що певний об'єм води пропускають під тиском через фільтри, виготовлені з нітроцелюлози, з наступним накладанням їх матовою стороною на поверхню агару Ендо. Їх витримують у термостаті 18-24 год. Після цього підраховують кількість колоній, визначають колі-титр і колі-індекс.*

### **Санітарне-бактеріологічне дослідження повітря.**

Повітря не є сприятливим середовищем для існування мікроорганізмів. Мікроби потрапляють у повітря з ґрунту, з поверхні рослин, з води. Кількість та склад мікрофлори у повітрі не постійні. Для санітарної оцінки повітря враховують кількість мікробів у 1 м<sup>3</sup>.

*Визначення забрудненості повітря седиментаційним методом. Седиментаційний - спосіб Коха полягає у тому, що чашки Петрі з МПА залишають відкритими на 5-10 хв. в приміщенні. Для визначення цим*

способом санітарно-показових мікроорганізмів (гемолітичних, стафілококів, стрептококів) чашки Петрі з кров'яним агаром залишають відкритими протягом 40 хв. Після цього чашки закривають, ставлять у термостат на 24 год, підраховують колонії мікробів.

Щоб визначити мікробне число у повітрі (кількість бактерій, що містяться в 1 м<sup>3</sup>), його підраховують за формулою Омелянського. Правилком Омелянського передбачається, що на поверхні агару у чашці Петрі з площею 100 см<sup>2</sup> за 5хв. з повітря осідає така кількість мікробів, що міститься в 10 л повітря.

При санітарно-бактеріологічній оцінці повітря по наявності патогенних мікроорганізмів (мікобактерій туберкульозу, збудників пастерельозу, бруцельозу та ін.) використовують спеціальні (елективні) середовища. Після інкубації в термостаті проглядають колонії, що вирости, виділяють характерну для цього виду мікроба колонію і вивчають її; з неї готують мазки, фарбують за Грамом, мікроскопують. Колонію пересівають для одержання чистої культури з наступною її ідентифікацією.

### **Санітарно-бактеріологічне дослідження ґрунту.**

Медично-ветеринарну службу цікавить виявлення патогенних мікроорганізмів, що потрапляють в ґрунт з трупами тварин, які загинули від інфекційних хвороб з виділеннями хворих тварин, з неззараженими стічними водами. В таких випадках ґрунт може виявитися чинником інфікування (сибірка, правець, злякисний набряк та ін.) людей та виникнення інфекційних хвороб.

Бактеріологічний аналіз ґрунту потрібний при виборі території під пасовище, господарські будівлі – гідростанції, дитячі, спортивні майданчики, сади, лікарні. Дослідження зводяться до визначення: мікробного числа (кількість бактерій, що містяться в 1 г ґрунту), колітитру, перфрінгенс-титру, та в окремих випадках проби ґрунту досліджують на наявність певних патогенних мікробів. Таблиця 1.

*Відбір проб ґрунту.* На території що обстежується площею до 1000 м<sup>2</sup>, виділяють дві ділянки по 25 м<sup>2</sup> (одну – поблизу джерела забруднення, іншу у віддаленні від нього) . На кожній з двох ділянок (з дотриманням стерильності) беруть проби з 5 місць (4 – по кутах ділянки, одну — по центру на глибині 10-20 см стерильним совком. Відбирають по 200-300 г ґрунту в стерильні банки з ватними корками (можна усі проби з однієї ділянки перемішати і на дослідження направити 1 кг). На банки наклеюють етикетки, відправляють з супровідним листом. Проби ґрунту потрібно досліджувати одразу ж або

протягом 6-18 год., зберігаючи їх при температурі не вище 1-5°C. В лабораторії пробу ґрунту подрібнюють, відокремлюють від каменів, коренів рослин, просівають через сито, ретельно перемішують і відважують 30 г.

В колбу ємністю 500 мл наливають 270 мл стерильної водопровідної води і вносять в неї відважену пробу ґрунту, усе інтенсивно струшують 10 хв. і, не даючи відстоятися часткам суспензії, готують серію десятиразових послідовних розведень. Для відносно чистих ґрунтів достатньо 4 міри розведення, для забруднених – 6-9 розведень. З цією метою в штатив ставлять пробірки з 9 мл стерильної води, нумерують. В першу вносять 1 мл суспензії проби ґрунту, змішують, після цього 1 мл з першої пробірки переносять в другу, змішують, з неї 1мл – в третю і т. і. У результаті в пробірці №1 одержують розведення ґрунту 1: 100, № 2 – 1: 1000 і т. і. Підготовлені таким чином проби ґрунту досліджують.

*Визначення загального мікробного числа.* З останніх 3-4 пробірок з розведеною суспензією окремими стерильними піпетками вносять по 1 мл в стерильні чашки Петрі (кожне розведення окремо). В кожену чашку додають ще по 15-20 мл розплавленого (і охолодженого) до 45°C МПА. Рівномірними обережними обертливими рухами вміст чашок перемішують, залишають на столі для ущільнення агару. Далі чашки перевертають і ставлять у термостат на 24 години. Підраховують колонії що вирости в кожній чашці, множать на ступінь розведення, отримані числа складають і обчислюють середньоарифметичне число, що складе кількість мікробів, які містяться в 1 г ґрунту.

*Визначення колі-титру ґрунту.* Різноманітні розведення суспензії проби ґрунту окремою стерильною піпеткою засівають у пробірки із середовищем Кеслера. Посіви витримують в термостаті при 43°C протягом 48 годин. Після цього пробірки з посівами продивляються. З тих пробірок, де є газоутворення, висівають штрихом на агар Ендо в чашки Петрі, культивують при 37°C 24 год. Червоні колонії, що вирости на агарі, типові для бактерій роду ешерихія, досліджують: мазки фарбують за Грамом, мікроскопують. При наявності у мазках поліморфних коротких грамнегативних паличок червоні колонії знов пересівають у середовище Кеслера для підтвердження газоутворення в чистій культурі *E. coli*. Найбільше розведення ґрунтової суспензії, в якій відзначена ферментація лактози (з газоутворенням), відповідає колі-титру ґрунту.



*Визначення перфрінгенс-титру в ґрунті.* Різноманітні розведення проби ґрунту засівають в пробірки з розплавленим та охолодженим середовищем Вільсона-Блера, інкубують в термостаті 24 – 48 год. при 43°C. *Cl. perfringens* росте в глибині середовища, утворюючи чорні колонії, внаслідок відновлення сульфату натрію до сульфіту натрію, що реагує з хлористим залізом, і утворює сірчисте залізо (чорного кольору). Гази, що накопичуються в середовищі в результаті ферментації глюкози, розривають агар, де розміщені колонії *Cl. perfringens*. Найбільше розведення ґрунту або найменша її кількість, яка викликала почорніння і розривання щільного середовища Вільсона-Блера в перші 12 год. зростання, відповідає (або прийнято вважати) її перфрінгенс-титру. Виявлення інших патогенних видів мікробів здійснюють посівом суспензії проби ґрунту на спеціальні елективні живильні середовища з наступною ідентифікацією виділених чистих культур збудників хвороб, включаючи біопробу і інші засоби.

Таблиця 1

**Показники санітарно-бактеріологічної оцінки ґрунту**

Оцінка ґрунту	Загальне число бактерій в 1г ґрунту	Колі-титр	Перфрінгенс-титр
Чиста	10000	Вище 1	Вище 0,1
Слабо забруднена	Не більше 10000	1-0,01	0,01-0,001
Помірно забруднена	100000-900000	0,01-0,001	0,001-0,0001
Сильно забруднена	1000000 і вище	Нижче 0,001	Нижче 0,0001

**Контрольні питання**

1. Як визначити загальну кількість мікробів у 1 грамі ґрунту?
2. Порядок визначення колі-титру ґрунту.
3. Санітарно-бактеріологічне дослідження повітря.
4. Відбір проб води для бактеріологічного дослідження.
5. Визначення загальної кількості мікробів у воді.
6. Живильні середовища для визначення мікробного числа та колі-тиру води, ґрунту.

## ЗАНЯТТЯ 12

### Тема: ІМУНІТЕТ. СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ

**Мета заняття:** Розібрати сутність і продемонструвати постановку реакції аглютинації (РА), реакції зв'язування комплементу (РЗК), роз бенгал проби (РБП) і реакції преципітації (РП). Ознайомитися з виготовленням вакцин і імунологічних сироваток.

**Матеріальне забезпечення.** У штативі: пробірочний метод реакції аглютинації сироваток у розведеннях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400; сироватки: бруцельозна на + + + + , + + + , ++ і — (негативна). Для крапельної реакції аглютинації: предметні скельця, випробувана (розведена 1:10) сироватка (позитивна), антиген бруцельозний, ізотонічний розчин натрію хлориду, піпетки, скляні палички для змішування. Для реакції преципітації: сибірковий антиген, сибіркова преципітуюча сироватка (профільтрована), екстракт зі шкіри. Лійка з азбестовою ватою, поставлена у флакон (колбочку) з невеликою кількістю фільтрату. Шматочки шкіри, що направляється для дослідження. Штатив, пробірки Уленгута, пастерівські піпетки. Компоненти й устаткування для демонстрації РБП. Вакцини, сироватки.

**Реакція аглютинації (РА).** Реакцію ставлять з метою виявлення в досліджуваній сироватці специфічних антитіл (аглютинінів) по відомому антигену чи визначення мікробів по відомій аглютинуючій сироватці. Реакція аглютинації має специфічний характер і проходить у двох фазах. Спочатку відбувається взаємодія антитіл з антигенами, їх детермінантами, розташованими на поверхні мікробних клітин. Притягання антигену й антитіла обумовлено електростатичними (вони володіють протилежними електричними зарядами) і міжмолекулярними силами. Це специфічна і невидима фаза. Друга фаза протікає в присутності електроліту (ізотонічного розчину натрію хлориду), відбувається адгезія (склеювання) і осідання на дно пробірки імунних комплексів (антиген – антитіло), що видно неозброєним оком. Утворені комплекси можуть дисоціювати. При цьому обидва компоненти зберігають свої вихідні властивості.

Мікроби (антиген) вирощують на щільному живильному середовищі (агарі), змивають ізотонічним розчином натрію хлориду, а потім розводять до визначеної концентрації (кількість клітин у 1 мл середовища). Антитіла (аглютиніни) утворюються в організмі і містяться в сироватці крові хворих чи перехворілих тварин. Аглютинація — специфічна реакція, що протікає в ізотонічному розчині натрію

хлориду. У неелектролітних розчинах цукру й у дистильованій воді адгезія антигену й антитіла не відбувається. Взаємодія між мікробами (збудниками) і антитілами використовується для діагностики багатьох інфекційних хвороб.

Для постановки реакції аглютинації необхідно мати: сироватку крові досліджуваної тварини, антиген, ізотонічний розчин натрію хлориду, штативи для пробірок, градуйовані піпетки з різними поділками, склянки, ванночки, колби, негативну (нормальну) і позитивну сироватки. Сироватки, що використовуються повинні бути свіжими чи консервованими борною кислотою в порошок, по 0,5–0,7 г на одну пробірку.

Найбільш широке застосування реакція аглютинації одержала при діагностиці бруцельозу. Її ставлять на ізотонічному розчині натрію хлориду в чотирьох розведеннях: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 (для овець, кіз, свиней і собак); у розведеннях 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 (для великої рогатої худоби, коней і верблюдів) у кількості 1 мл кожного розведення. Як контроль використовують негативну (нормальну) сироватку в тих же розведеннях, що і досліджувану; позитивну сироватку до граничного титру й антиген у 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

**Техніка розливу сироваток.** На кожную сироватку беруть чотири пробірки. У першу вносять 2,4 мл, а в наступні по 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. До ізотонічного розчину в першій пробірці додають 0,1 мл досліджуваної сироватки, ретельно перемішують, виходить основне розведення 1:25. З основного розведення 1 мл переносять у другу пробірку і перемішують, із другої – у третю, із третьої – у четверту. Після перемішування з четвертої пробірки видаляють піпеткою 1 мл розведення, з першої – 0,5 мл. У результаті в кожній пробірці залишається по 1 мл розведеної сироватки, тобто той об'єм, у якому йде реакція аглютинації. Після розливу сироваток в усі пробірки додають по 0,05 мл антигену.

Сироватку можна розливати і мікропіпеткою в дозах 0,04; 0,02; 0,01; 0,005 мл, що відповідає розведенням 1:25, 1:50, 1:100, 1:200. Фабричний антиген (10 млрд. мікробних клітин у 1 мл) розводять у 20 разів до 500 млн мікробних клітин у 1 мл і додають у кожную пробірку по 1 мл. Кожну сироватку розливають окремою піпеткою ретельно промивають її до 6 разів у двох-трьох склянках з ізотонічним розчином натрію хлориду. Для прискорення постановки реакції аглютинації застосовують апаратуру Флоринського, що дає можливість розливати

кожен компонент одночасно в десять пробірок. Пробірки струшують, ставлять у термостат на 4 год., потім витримують при кімнатній температурі до 18 год., після чого реакцію читають. Спочатку переглядають пробірки з контрольними сироватками, а потім з досліджуваною. Для більш об'єктивної оцінки реакції аглютинації одночасно готують стандарт мутності з антигену.

При позитивній реакції аглютинації на дно пробірки випадає осад зі склеєного комплексу антиген – антитіло, утворюючи «парасольку», а рідина (розчин) просвітлюється, тобто стає прозорою. При струшуванні осад розбивається на пластівці чи крупинки. При негативній реакції аглютинації рідина залишається мутною, у центрі дна пробірки мікроби (антиген) осідають у вигляді крапки.

+ + + + Повне просвітління рідини при наявності різко вираженої «парасольки», при струшуванні розбивається на пластівці, грудочки.

+ + + Те ж, але рідина злегка опалесцирує.

+ + Слабке просвітління рідини, «парасолька» розбивається при струшуванні на пластівці, грудочки, крупинки.

+ Просвітління відсутнє, «парасолька» виражена слабо.

– Каламуть, «парасолька» відсутня.

Позитивною сироватка вважається при наявності мікроскопічної аглютинації (+ + ) у розведенні 1:50 для свиней, овець, кіз, собак і 1:100 для великої рогатої худоби, коней і верблюдів.

#### **Пластинчаста (крапельна) реакція аглютинації.**

Мікропіпеткою на чисте рівне скло наносять 0,04; 0,02; 0,01 мл одержаної сироватки. До кожної дози сироватки додають по одній краплі антигену, який у кожній пробі, починаючи з 0,01 мл, змішують із сироваткою чистою скляною паличкою. Перше розведення відповідає 1:50, друге – 1:100, третє – 1:200. Якщо сироватка містить специфічні аглютиніни, то через кілька хвилин після змішування її з антигеном у краплі з'являються крупинки або пластівці, а рідина стає прозорою. Якщо в сироватці аглютинінів немає, то крапля залишається рівномірно мутною.

**Прискорена реакція аглютинації.** Прискорену реакцію аглютинації ставлять шляхом нанесення на один кінець предметного скла розбавленої досліджуваної сироватки, на іншій — краплі ізотонічного розчину натрію хлориду (контроль). Потім до обох крапель піпеткою додають таку ж кількість суспензії мікробів і розмішують до одержання однорідної суміші. При наявності у досліджуваній сироватці специфічних антитіл відбувається адгезія

мікробів. У контролі рівномірна каламуть, аглютинації немає; у досліді – склеювання мікробів і антитіл, утворення крупинок і пластівців.

**Реакція зв'язування комплементу (РЗК).** За своєю чутливістю реакція зв'язування комплементу (РЗК) займає перше місце, що дозволяє виявити більшу кількість реагуючих. Сутність реакції полягає в тому, що комплемент, будучи доданий до специфічного комплексу (антиген–антитіло), зв'язується останнім. Це можна установити після додавання гемолітичної системи (гемолітична сироватка + еритроцити барана). Якщо комплекс зв'язаний у бактеріальній системі, то гемоліз еритроцитів не відбудеться – реакція позитивна. При наявності вільного комплементу, а це буває в тому випадку, якщо в досліджуваній сироватці немає специфічних антитіл, він переходить у гемолітичну систему і викликає гемоліз еритроцитів – реакція негативна. Для постановки реакції необхідні найменші кількості кожного з компонентів, що визначають титруванням. При цьому треба мати: досліджувану сироватку (інактивовану), антиген (сапний, бруцельозний і т.д.), комплемент – свіжа чи консервована сироватка морської свинки, гемолітичну сироватку (сироватка кролика, імунізованого еритроцитами барана), еритроцити барана, ізотонічний розчин натрію хлориду (середовище, у якому йде реакція). Антиген і гемолітичну сироватку готують біофабрики, інші компоненти одержують у лабораторії.

У ветеринарній практиці РЗК ставлять при діагностиці сапу, бруцельозу, лістеріозу і ін. Реакція йде в двох системах: бактеріальній і гемолітичній. Бактеріальна система містить у собі розведені: досліджувану сироватку, антиген і комплемент, по 0,5 мл кожного компонента. Досліджувана сироватка попередньо інактивується у водяній бані при температурі 58–60° С. При з'єднанні всіх компонентів пробірки ставлять у водяну баню на 20 хв при температурі 37–38°С. Потім вносять гемолітичну систему (гемолітичну сироватку в робочому титрі і 2,5%-ну суспензію еритроцитів барана, по 0,5 мл кожного компонента) і знову витримують у водяній бані при 37–38°С протягом 20 хв. Загальний об'єм компонентів, що беруть участь у реакції, становить 2,5 мл. При масових дослідженнях об'єм компонентів зменшують наполовину.

Облік реакції проводять двічі: після закінчення досліді і після 14-годинної витримки при кімнатній температурі.

Позитивна реакція характеризується повним просвітлінням середовища, еритроцити осідають на дно.

Сумнівна – середовище злегка забарвлене, відбулося часткове руйнування еритроцитів.

Негативна – середовище інтенсивно забарвлене в червоний колір – повний гемоліз еритроцитів.

Поряд із РЗК ставлять РТЗК – реакцію тривалого зв'язування комплементу, що відбувається на холоді.

**Роз бенгал проба (РБП)** – пластинчаста реакція аглютинації з роз бенгал антигеном (бруцельозним антигеном, який забарвлений бенгальським рожевим). РБП застосовують при дослідженні сироватки крові для діагностики бруцельозу у великої рогатої худоби, овець, кіз, свиней, верблюдів і північних оленів.

Для постановки реакції необхідні: роз бенгал антиген (бруцельозний); позитивна аглютинуюча і негативна сироватки великої рогатої худоби; 0,5%-ний фенолізований ізотонічний розчин натрію хлориду. Сироватки крові повинні бути прозорі, без домішки еритроцитів, і досліджуються не пізніше ніж через 4 дні зберігання при температурі 4–8°C. Сироватки, консервовані сухою борною кислотою (2% борної кислоти до об'єму сироватки), придатні для дослідження протягом 14 днів.

Техніка постановки РБП. Досліджувані сироватки крові в дозі 0,03 мл за допомогою шприца-напівавтомата або піпетки-крапельниці вносять на дно виймки чистих сухих металевих емальованих пластинок. Шприц або піпетку після внесення сироватки тричі промивають фенолізованим ізотонічним розчином натрію хлориду і висушують. Поруч із сироваткою за допомогою піпетки-крапельниці вносять 0,03 мл (дві краплі) антигену (при дослідженні сироваток великої рогатої худоби, коней, верблюдів і свиней) і 0,015 мл (одну краплю) при дослідженні сироваток крові овець, кіз і північних оленів. Потім краплю ретельно змішують і погойдують протягом 4 хв. Якщо в розчині з'являються пластівці рожевого кольору, то реакція вважається позитивною. При наявності гомогенної рівномірно пофарбованої суміші, відсутності аглютинації реакція вважається негативною. Сироватки, визначені в РБП як позитивні, потім досліджують у РА і РЗК (РТЗК), за допомогою яких установлюють титр аглютининів і наявність комплементзв'язуючих антитіл.

Остаточний результат визначають з обліком даних усіх реакцій.

Сироватка вважається позитивною при такій оцінці реакцій: РБП +, РА + + +, РЗК + + ; сумнівною – при РБП +, РА –, РЗК – . Сумнівну сироватку через 15–30 днів досліджують повторно. Якщо вона дає таку

ж реакцію, то її вважають позитивною. Негативна РБП вважається кінцевим результатом, подальше дослідження сироватки крові в РА і РЗК не проводиться.

**Реакція преципітації.** При реакції преципітації, як і інших імунологічних реакціях, відбувається специфічне з'єднання антигену й антитіла. На місці з'єднання преципітуючої сироватки й екстракту (антигену) з'являється преципітат (сіро-біле кільце). Перевага цієї реакції в тому, що з її допомогою можна досліджувати матеріал, що розклався, шкіряно-хутрянну сировину. Реакцію преципітації ставлять при дослідженні шкіряно-хутряної сировини на сибірку. Антигеном тут буде соматичний полісахарид (гаптен), що міститься в стінці бацили антракса. Він термостабільний. Перед постановкою реакції сировину стерилізують у паровому стерилізаторі, щоб забезпечити подальшу роботу з ним.

Антиген готують у такий спосіб: беруть 1–2 г здрібноної шкіри, заливають 10 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, кип'ятять 30–40 хв (гарячий спосіб) чи витримують при кімнатній температурі 16–18 год. (холодний спосіб), після чого фільтрують через лійку із азбестовою ватою. Фільтрат повинний бути абсолютно прозорим. Преципітуючу сироватку готують на біологічних фабриках шляхом гіперімуназації коней вбитими і живими ослабленими бацилами сибірки. Перед постановкою реакції преципітації сироватку фільтрують.

Постановка реакції преципітації. У спеціальні, чисто вимиті, прозорі і сухі пробірки Уленгута наливають по 0,3 мл преципітуючої сироватки (сибіркової). Потім пастерівською піпеткою нашаровують екстракт у тій же кількості. Можна підшаровувати сироватку (питома вага сироватки вища, ніж в екстракта).

У лабораторіях при масових дослідженнях шкіряно-хутряної сировини на сибірку застосовують апаратуру Флоринського. Реакція вважається позитивною, якщо на границі обох рідин з'являється преципітат – сіро-біле кільце. Прісно-суху, парну, морожену шкіряно-хутрянну сировину читають через 15 хв, мокросолену – через годину. Перед початком роботи ставлять такі контролі: сибірковий антиген і преципітуюча сироватка – реакція позитивна; сибірковий антиген і нормальна сироватка – реакція негативна; ізотонічний розчин натрію хлориду і преципітуюча сироватка – реакція негативна.

**Реакція преципітації в агаровому гелі.** Реакція преципітації строго специфічна і дозволяє знайти в матеріалі незначні кількості

антигену (до  $10^{-6}$  білка). Дифузійну реакцію преципітації ставлять у чашках Петрі з агаром, у якому на однаковій відстані один від одного за допомогою порожньої металевої трубки, з'єднаної з вакуумом, вирізують кілька виямок округлої форми. У центральну виямку вносять сироватку, що містить антитіла, в інші – досліджувані антигени або один антиген у різних розведеннях. Внесені речовини в шарі агарового гелю дифундують назустріч один одному. На місці зустрічі антитіла й антигену утворюються зони преципітації (мутні смуги у вигляді дуг). Є різні модифікації цієї реакції. У лабораторній практиці застосовують також імуноелектрофорез, імунофлюоресцентний і інші методи.

**Вакцини.** Вакцини застосовують із запобіжною метою, вводять здоровим тваринам, після чого в них через 10–14–20 днів виробляється імунітет. Вакцини готують з ослаблених (атенуйованих) живих культур або оброблених формаліном, фенолом і іншими хімічними речовинами (інактивовані вакцини). Прикладом живих атенуйованих і інактивованих можуть служити такі вакцини.

Живі атенуйовані вакцини. Сибіркова вакцина СТІ – суспензія спор безкапсульного слабо вірулентного штаму збудника сибірки в 30%-ному розчині гліцерину або дистильованій воді.

Гідроокисалюмінієва вакцина ДНКІ проти сибірки. Суспензія живих слабовірулентних спор штаму Ш-15 у гідроокисі алюмінію. Такі вакцини з 1961р. випускаються в сухому вигляді (без гліцерину і гідроокисі алюмінію). Їх одержують методом ліофілізації (висушування із замороженого стану під вакуумом).

*Суха вакцина проти бруцельозу зі штаму 19.* Слабовірулентна культура живих бруцелл Вг. abortus у захисному сахарозно-желатиновому середовищі.

*Депонована вакцина проти бешихи свиней.* Культура бешихи свиней з матрикса Конєва, адсорбована на фосфатно-буферному розчині гідрату окису алюмінію й ін.

Інактивовані вакцини. *Концентрована гідроокисалюмінієва формолвакцина проти емфізематозного карбункула великої рогатої худоби.* Формалінізована бульйонна культура збудника емкару, осаджена гідратом окису алюмінію.

**Імунні сироватки.** Їх одержують при гіперімунізації тварин — введенні збудників в дозах, що збільшуються, проти якого хочуть виробити сироватку. Для цієї мети на біофабриках використовують тварин-продуцентів: коней, велику рогату худобу, свиней, овець і ін. У результаті гіперімунізації тварин (до трьох місяців) у них виробляються



антитіла.

Сироватка здатна захистити тварину від захворювання або запобігти подальшому розвитку інфекції, якщо вона з'явилася. Сироваткою протягом декількох годин створюється пасивний імунітет, що триває 10–14 днів. Сироватки являють собою злегка опалесцюючі рідини жовтого кольору. При тривалому зберіганні на дно ємкості випадає осад, при струшуванні він розбивається в рівномірну каламуть. Відомі імунні сироватки проти багатьох хвороб: сибірки, бешихи свиней, сальмонельозу і колібактеріозу телят (бівалентна антитоксична сироватка), диплококової інфекції молодняку, а також проти правця (антитоксична) і ін.

## СПЕЦІАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

### ЗАНЯТТЯ 13

#### Тема: ПАТОГЕННІ КОКИ

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників:стафілококозу, стрептококозу, миту коней. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

**Стафілококи.** Стафілококоз - захворювання, супроводжуване характерним утворенням у різних місцях тіла тварини гнійників, розвитком гноєридних процесів типу маститу, післяродового ендометриту, пневмонії, артритів, гнійного запалення ран тощо. До хвороби схильні коні, велика рогата худоба, вівці, кози, свині, рідко птиця.

Збудник стафілококозу - бактерії роду *Staphylococcus*, які належать до виду *Staph. aureus*. Інші види (*Staph. epidermidis*, *Staph. saprophyticus*) непатогенні.

Стафілококи мають кулясту форму діаметром 0,8-1,0 мкм, у чистих культурах розміщуються різними за величиною скупченнями типу виноградного грона. В мазках із патологічного матеріалу, крім грона, зустрічаються моно- і диплококи. Стафілококи грампозитивні, не рухливі, не утворюють спор та капсул, добре ростуть на простих середовищах у звичайних умовах. Активність їх в організмі досить висока за рахунок виділення екзотоксинів типу гемо- і некротоксину,

летального токсину, біологічно активних речовин (коагулаза, фібринолізин, гіалуронідазатощо).

У зв'язку з продукуванням ентеротоксину у людей стафілококи здатні зумовлювати харчові отруєння.

Для бактеріологічної діагностики стафілококозів у лабораторію надсилають проби молока з ураженої частини вим'я при маститах, гній з абсцесів, ексудат із ран, маткові виділення при ендометритах. З доставленого матеріалу готують мазки, які фарбують за Грамом й досліджують під мікроскопом з використанням імерсійної системи.

Характерні форма і розміщення стафілококів дають змогу легко їх розпізнати. Звертають увагу на невеликі скупчення клітин, іноді - їх наявність у цитоплазмі фагоцитів.

Виділення культур стафілококів здійснюють за допомогою простих середовищ, на які пастерівською піпеткою висівають гній, ексудат та інші матеріали. При культивуванні в аеробних умовах на МПА через 24-48 годин утворюються випуклі, непрозорі, з золотистим пігментом колонії діаметром 2-4 мм. На МПБ стафілококи обумовлюють інтенсивне помутніння та утворення значної кількості осаду. На кров'яному МПА патогенні типи утворюють навколо колоній зону гемолізу. При дослідженні патологічного матеріалу краще використовувати селективне середовище - кров'яний МПА з вмістом 8-10 % хлористого натрію, на якому ростуть стафілококи, тоді як розвиток інших видів бактерій стримує висока концентрація солі.

Певне діагностичне значення має здатність стафілококів рости на МПА з кристалічним фіолетовим (до 1 л 3,5 % МПА додають 3,3 мл 0,1 % розчину кристалічного фіолетового). На цьому середовищі патогенні стафілококи утворюють колонії фіолетового або оранжевого кольору, ріст непатогенних стафілококів пригнічується.

**Біохімічна активність.** Стафілококи мають протеолітичні і цукролітичні властивості, зокрема розріджують желатину, пептонізують молоко, ферментують до утворення кислоти глюкозу, лактозу, маніт, сахарозу, гліцерин.

Патогенність виділених культур стафілокока підтверджують шляхом визначення гемолітичної активності при культивуванні штмів на кров'яному МПА, постановкою реакції плазмокоагуляції, виявленням у фільтратах бульйонних культур летального й некротизуючого токсинів, визначенням ДНК-азної активності.

Реакцію плазмокоагуляції ставлять у двох преципітатних пробірках, що містять по 0,5 мл цитратної плазми крові кролів,

розведеної фізіологічним розчином у співвідношенні 1 : 4. В першу пробірку висівають досліджувану культуру стафілокока, другу залишають контрольною. Пробірки поміщають у термостат при температурі 37 °С. Патогенні стафілококи через 3-10 годин коагулюють плазму. Якщо пробірки залишити в термостаті довше, то під дією фібринолітичного ферменту згусток плавиться.

Біопробу ставлять на кролях або кошенятах. Для виявлення дермонекротоксину культуру стафілокока, вирощену на МПБ із концентрацією 2 млрд клітин в 1 мл, вводять у товщу шкіри кроля в дозі 0,2 мл. У позитивних випадках через 24-48 годин спостерігається некроз шкіри.

Наявність летального токсину можна доказати шляхом внутрішньовенного введення фільтрату бульйонної культури стафілокока кролям у дозі 0,75 мл на 1 кг маси тіла. Під дією названого токсину тварини гинуть через 15 хвилин.

Кошенята досить чутливі до орального введення стафілококового ентеротоксину.

*Патогенні диплококи* викликають у тварин диплококову інфекцію (диплококоз, диплококова пневмонія) - інфекційне захворювання, яке найчастіше уражає молодих тварин і перебігає у септичній, легеневій, суглобовій та змішаній формах. У молодняка розвиваються бронхопневмонія, артрит, кон'юнктивіт, у дорослих тварин - гнійно-катаральний ендометрит, гнійно-катаральний або фібринозний мастит.

Збудник захворювання – *Diplococcus lanceolatus* (*Dipl. pneumoniae*, *Dipl. septicus*, *Streptococcus pneumoniae*) попарно розміщені коки, зовнішні кінці яких загострені по типу ланцета, за Грамом забарвлюються позитивно, спор не утворюють, у мазках із патологічного матеріалу оточені капсулою. Зустрічаються короткі ланцюжки типу диплострептокока.

Для бактеріологічного дослідження в лабораторію надсилають внутрішні органи (печінка, селезінка), головний мозок, кров із серця, трубчасті кістки, вміст уражених суглобів. У дорослих тварин відбирають секрет ураженої частини вим'я, виділення з родових шляхів. Патологічний матеріал повинен бути надісланий не пізніше ніж через 6 годин від моменту загибелі тварини.

Мікроскопічне дослідження є першим етапом діагностики - завдяки характерній формі збудника, наявності у нього капсули можна зробити попередньо позитивний висновок. Мазки забарвлюють за Грамом, Романовським - Гімзою, Ольтом. Для виділення чистої куль-

тури збудника із патологічного матеріалу здійснюють посіви у глюкозо-сироватковий бульйон (МПБ + 1 % глюкози + 15-20 % нормальної сироватки крові коня, інактивованої при температурі 58 °С протягом 30 хв.), глюкозо-кров'яний МПА (1 % глюкози + 10 % дефібрированої крові барана або кроля). В МПБ диплокок зумовлює слабе рівномірне помутніння з наступним утворенням незначного осаду. На глюкозо-кров'яному МПА збудник утворює дрібні, напівпрозорі колонії, оточені зеленуватою зоною α-гемолізу.

В мазках із молодих культур збудник має форму диплокока, старих - розміщується за типом диплострептокока. Диплококи чутливі до дії жовчі, яка зумовлює їх лізис, та оптохінону, здатного гальмувати ріст збудника на живильних середовищах. Інші α-гемолітичні стрептококи не чутливі до впливу цих речовин, що має диференціальне значення.

Диплокок ферментує з утворенням кислоти глюкозу, лактозу, сахарозу, інουλін, рафінозу, коагулює молоко, не утворює індолу, не розщеплює сорбіт та маніт. Біопробу ставлять на білих мишах з метою підтвердження патогенності виділених диплококів або доказу наявності їх у патологічному матеріалі.

Трьох білих мишей заражають у черевну порожнину добовою культурою диплококів, вирощених на глюкозо-сироватковому бульйоні, або суспензією патологічного матеріалу в дозі 0,5 мл. Біопробу вважають позитивною при загибелі не менше двох тварин протягом однієї чи двох діб.

Таким чином, ідентифікацію збудника диплококової інфекції роблять на підставі морфологічних, тинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей, а також результатів біопроби.

**Патогенні стрептококи** - збудники стрептококозу, стрептококової септицемії птиці, миту коней.

Стрептококоз — інфекційне захворювання багатьох видів тварин усіх вікових груп. Гострий і підгострий перебіги хвороби спостерігаються у молодняка і характеризуються гарячкою, загальним пригніченням, набряками, порушенням координації рухів, артритами, діареєю. У дорослих тварин найчастіше розвивається латентна інфекція, активізація якої призводить до абортів, метритів, маститів.

Збудник стрептококозу належить до роду *Streptococcus* і нараховує 17 серологічних груп, які позначаються великими літерами латинського алфавіту.

Діагностика стрептококозу комплексна і передбачає обов'язкове проведення лабораторних досліджень. У лабораторію надсилають головний мозок, кров із серця, печінку, селезінку, суглобову рідину. Від абортіваних плодів відбирають головний мозок і кров з серця; від дорослих тварин - секрет з ураженої частки вим'я, виділення з родових шляхів.

Бактеріологічна діагностика передбачає мікроскопію мазків із патологічного матеріалу, виділення культури стрептокока та його ідентифікацію, підтвердження патогенності виділених культур для білих мишей.

Із патологічного матеріалу готують мазки-відбитки, які фарбують за Грамом. Типові ланцюжки стрептококів зустрічаються рідко. Найчастіше можна помітити моно-, диплококи, невеличкі скупчення коків. У зв'язку з цим мікроскопія в системі діагностики має другорядне значення й дає можливість лише передбачувати наявність стрептококової інфекції.

З патологічного матеріалу посіви здійснюють на глюкозо-сироватковий бульйон та глюкозо-кров'яний МПА. Засіяні пробірки витримують у термостаті при температурі 37-38 °С протягом 18-24 годин.

На глюкозо-кров'яному МПА стрептококи утворюють дуже дрібні колонії типу крапельок роси, прозорі або трохи каламутні, з рівними краями, оточені зоною гемолізу. Залежно від типу гемолізу стрептококи поділяють на три групи:  $\alpha$ -гемолітичні - колонії оточені зеленуватою зоною, що є ознакою неповного гемолізу;  $\beta$ -гемолітичні – зумовлюють повний гемоліз, у зв'язку з чим навколо колоній утворюється прозора зона;  $\gamma$ -стрептококи - гемолізу не зумовлюють.

В глюкозо-сироватковому бульйоні більшість стрептококів росте ближче до дна з поступовим підніманням по стінці пробірки та зумовленням незначного помутніння. В мазках зі щільних середовищ вони розміщуються парами, короткими ланцюжками, невеликими скупченнями, тоді як у препаратах із рідких культур знаходять ланцюжки різної довжини.

Стрептококи диференціюють не лише за гемолітичною активністю, а й з урахуванням їх здатності культивуватись на середовищі з жовчю, підвищеним вмістом хлористого натрію, а також ферментативними властивостями.

Для постановки біопробі використовують молоді (18-20 годинні) культури стрептококів, вирощені на глюкозо-сироватковому бульйоні.

При цьому трьом білим мишам у черевну порожнину вводять 0,5 мл. культури. Виділену культуру стрептокока вважають патогенною, якщо вона спричиняє смерть не менше двох мишей протягом однієї-двох діб. Із внутрішніх органів загиблих тварин повинна виділятися початкова культура.

### **ЗБУДНИК СТРЕПТОКОКОЗУ ПТИЦІ**

Стрептококоз птиці (стрептококова септицемія птиці, стрептококова хвороба курей) - інфекційне захворювання, супроводжуване депресією, кон'юнктивітом, парезом, паралічем, артритом. Найбільш чутливі до хвороби кури, менше - голуби, качки, індики, гуси.

Збудники хвороби — *Streptococcus gallinarum*, *Str. zooepidermicus*, *Str. zymogenes* - морфологічно представлені короткими і довгими ланцюжками грампозитивних коків.

У лабораторію для бактеріологічного дослідження надсилають свіжі трупи або хвору птицю. Здійснюють мікроскопію мазків із патологічного матеріалу, виділяють чисті культури збудників, патогенність яких підтверджують біопробою.

Мазки для мікроскопії готують із крові серця, внутрішніх органів і фібринозного ексудату черевної порожнини забитої хворої птиці. Препарати фарбують за Романовським - Гімзою. В позитивних випадках знаходять коки, розміщені парами та різними за довжиною ланцюжками, іноді - оточені капсулою.

Для виділення чистої культури збудника здійснюють посів проби патологічного матеріалу на 0,5 % глюкозний МПА, сироватковий МПА, МПБ чи кров'яний МПА.

Колонії стрептококів розвиваються в аеробних умовах і бувають дрібними, напівпрозорими, оточеними зоною  $\beta$ -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.

Окремі види стрептококів диференціюють за їх біохімічною активністю відповідно до існуючих методичних вказівок щодо лабораторної діагностики стрептококозу птиці (див. таблицю 2).

## Ознаки диференціації стрептококів, що виділяються від птиці

Вид стрептококів	Р-гемоліз на кров'яному агарі	Ферментація й зміна кольору молока з метиленовим синім	Ріст на МПБ	Ріст на МПБ з 40 % ЖОВЧІ	Середовище з вуглеводами				
					Лактоза	Маніт	Сорбіт	Трегалоза	Інулін
Патогенні стрептококи	+	-	Найчастіше ближче до дна	-	+	-	+	-	
Ентерококи	±	+	Дифузний	+	+	+	-1-	-	
Інші стрептококи, які рідко зустрічаються у птиці	+	-	Дифузний, рідко-природний	-			-	-	-
Диплококи	±	+	Слабко дифузний	±	+	±	-		+

Для постановки біопроби виділеною молодою культурою стрептококів у дозі 0,2 мл заражають дві миші живою масою 20-25 г. В позитивних випадках гризуни гинуть через 24-96 годин. Із крові серця, внутрішніх органів при розтині виділяється початкова культура збудника.

**ЗБУДНИК МИТУ**

Мит-гостре інфекційне захворювання коней, переважно лошат, яке в типових випадках проявляється катарально-гнійним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів й ураженням регіональних лімфатичних вузлів. Збудник *Streptococcus equi* - коки, що утворюють різні за довжиною ланцюжки і належать до серологічної групи С. За Грамом фарбуються позитивно, не утворюють спор, не рухливі, культивуються в аеробних умовах. У мазках із молодих культур, вирощених на середовищах, збагачених кров'ю або її сироваткою, утворюють капсулу.

Для бактеріологічного дослідження в лабораторію надсилають пунктати уражених лімфовузлів, гній з абсцесів, носові виділення, шматочки печінки, селезінки, легень, гній з абсцесів лімфатичних вузлів, кров із серця загиблих тварин.

**Мікроскопія.** Із патологічного матеріалу готують мазки, які фарбують за Грамом. Митний стрептокок у мазках із гною утворює довгі ланцюжки, причому 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.

Для виділення чистої культури збудника із патологічного матеріалу здійснюють посіви на глюкозо-сироватковий МПБ, МП А, кров'яний МПА, збагачений глюкозою (1 %). Засіяні пробірки інкубують у термостаті при температурі 36-37 °С протягом доби. В результаті МПБ злегка мутніє, в ньому з'являються пухнасті пластівці, які в наступні дні випадають в осад, і рідина стає прозорою. На МПА та кров'яному МПА утворюються дрібні (як краплі роси) сірувато-білі слизисті колонії, навколо яких (зокрема, на кров'яному МПА) помітно зону гемолізу.

При ідентифікації виділених культур, крім характерної форми клітин, враховують ще й той факт, що митний стрептокок не культивується на середовищах із 40 % жовчі, не змінює колір молока з метиленовим синім, не зброджує лактозу, сорбіт і маніт, не росте при наявності митного антивірусу (фільтрат 20-денної бульйонної культури митного стрептокока), однак ферментує до утворення кислоти без виділення газу глюкозу й мальтозу.

Біологічну пробу ставлять при негативному або сумнівному результаті мікроскопії препаратів. Гноєм із абсцесів лімфатичних вузлів або молодою культурою, вирощеною на МПБ, підшкірно заражають двох білих мишей живою масою 13-15 г. Суспензію із внутрішніх органів або виділення з носової порожнини вводять у дозі 0,5 мл.

За зараженими мишами спостерігають протягом десяти днів. У позитивних випадках гризуни гинуть через два - сім днів від початку постановки біопробы.

Відповідно до діючої інструкції лабораторний діагноз на мит вважають поставленим при одержанні одного із результатів:

- виявлення в мазках із патологічного матеріалу характерних для збудника миту форм стрептокока при наявності типової клінічної картини захворювання;
- виділення із патологічного матеріалу культури з властивостями, характерними для збудника миту;



• загибелі хоча б однієї миші із заражених патологічним матеріалом з наступним виділенням культури, характерної для збудника миту, навіть за умови, що з вихідного матеріалу збудника не виділено.

### **Контрольні питання**

1. Які процеси в організмі зумовлюють стафілококи?
2. Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості стафілококів.
3. Як здійснювати бактеріологічну діагностику стафілококозів?
4. Збудник диплококозу і його морфологія.
5. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію при підозрі на диплококоз?
6. Основні етапи бактеріологічної діагностики диплококозу.
7. Які захворювання у тварин зумовлюють стрептококи?
8. Особливості бактеріологічної діагностики стрептококозів.
9. Як диференціюють різні види патогенних стрептококів?
10. Що таке мит?
11. Збудник миту і його морфологія.
12. Бактеріологічна діагностика миту.

## **ЗАНЯТТЯ 14**

### **Тема: РОДИНА КИШКОВИХ БАКТЕРІЙ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників: ешерихіозів, сальмонельозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Родина *Enterobacteriaceae* - об'єднує 14 родів бактерій, серед яких найчастіше зумовлюють захворювання тварин *Escherichia* (кишкова паличка) і *Salmonella* (паратифозні бактерії, або сальмонели). Одержано нові дані про участь представників роду *Proteus*, *Yersinia* та *Klebsiella* в етіології хвороб молодняка сільськогосподарських тварин.

Ентеробактерії подібні між собою за морфологічними, культуральними й тинкторіальними властивостями. Біохімічна активність їх значно коливається і перебуває у прямій залежності від патогенності: у міру підвищення хвороботворної здатності біохімічна активність знижується, і навпаки, чим більше мікроорганізми подібні до сапрофітів, тим більші у них ферментативні можливості.

Клебсієли відомі як збудники захворювань органів дихання, в першу чергу пневмоній. В гуманній медицині описано їх виділення при хворобах уrogenітального тракту, мозкових оболонках, очей, суглобів і хребта, при різних гнійно-септичних ускладненнях, а також при гострих шлунково-кишкових хворобах.

Запропоновано розглядати хвороби, що викликаються клебсієлами і такі, що характеризуються загальним сепсисом, а також при локальному ураженні окремих органів - як окрему нозологічну одиницю - клебсієльоз.

У тварин клебсієли описані як збудники маститів, пневмоній, септицемії у корів, свиней, коней, мавп. Ці мікроорганізми широко розповсюджені у природі і зустрічаються в ґрунті, воді, забруднюють корми та продукти.

### **ЗБУДНИКИ ЕШЕРИХІОЗІВ**

Ешерихіоз (колібактеріоз, колієнтеротоксемія) – гостре інфекційне захворювання новонароджених тварин, супроводжуване профузним проносом, зневодненням організму, явищами септицемії й токсемії. Хвороба перебігає у трьох клінічних формах: септичній, колієнтеротоксемічній 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. Збудник - *Echerichia coli* - коротка (близько 3 мкм) товста поліморфна паличка із заокругленими кінцями. Рухлива, не утворює спор, за Грамом забарвлюється негативно, добре росте на звичайних середовищах в аеробних і анаеробних умовах при температурі 37-38 °С. Окремі серотипи з підвищеною вірулентністю можуть утворювати слабку капсулу.

Кишкова паличка ферментує деякі вуглеводи (зокрема, лактозу), утворює індол, не виділяє або виділяє досить мало сірководню, молоко коагулює без пептонізації згустка казеїну, дає позитивну реакцію з метилротом і негативною за Фогес-Проскауером, не розщиплює сечовину, не утилізує нітрати, у зв'язку з чим не росте на середовищі Сіммонса й не змінює його кольору.

Антигенна структура ешерихій складна. Виявлено три типи антигенів: О-антиген - соматичний, термостабільний, повний; Н-антиген - джгутиковий, термолабільний; К-антиген - поверхневий, з безпосереднім зв'язком з оболонкою (капсулою) й декількома компонентами, позначеними L, А, В. За останніми даними Міжнародного бюлетеня бактеріологічної номенклатури і таксономії, у кишкової паличці виявлено 150 різновидів О-антигенів, 99 - К-антигенів і 50-Н-антигенів. Відповідно до такої кількості антигенів існує адекватна кількість серологічних типів ешерихій. При позначенні повної антигенної структури конкретного серотипу антигени відділяють двома крапками, вказуючи при цьому їх порядковий номер, наприклад, 0141 : K85 (В).

Патогенні серотипи ешерихій колонізують кишечник тварин за рахунок наявності особливих адгезивних К-антигенів, що містяться в капсулі чи мікроворсинках (пілях). Найчастіше факторами колонізації є антигени K88, K99, 987P та ін.

Діагноз захворювання тварин на колібактеріоз ставлять на підставі клінічно-епізоотологічних, патологоанатомічних даних з обов'язковим проведенням бактеріологічного дослідження патологічного матеріалу.

У 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 кишечника.

При діагностиці колібактеріозу птиці одночасно із свіжими трупами відправляють п'ять-шість живих хворих особин, яких забивають у лабораторії й відбирають необхідний матеріал.

Бактеріологічна діагностика передбачає мікроскопію мазків із патматеріалу; виділення чистої культури збудника, вивчення її морфологічних, тинкторіальних, культуральних властивостей і ферментативної активності; визначення патогенності культури на лабораторних тваринах; серологічну ідентифікацію культури.

**Мікроскопія.** Із патологічного матеріалу готують звичайні мазки і кляч-препарати, які фарбують за Грамом і досліджують з використанням імерсійної системи мікроскопа. У позитивних випадках, за умови перебігу хвороби в септичній формі, знаходять характерні грамнегативні палички, які розміщуються по одній, іноді формують короткі ланцюжки і навіть нитки. Молоді клітини можуть забарвлюватись біполярно.

Виділення чистої культури. Із патологічного матеріалу пастерівською піпеткою здійснюють посів на МПА і МПБ у пробірках, а також на диференційні середовища Ендо і Левіна у бактеріологічних чашках. Із кишечника висівають скарифіковану слизову оболонку.

Засіяні пробірки й чашки витримують у термостаті протягом 18-24 годин при температурі 37—38 °С. На МПА утворюються колонії S-типу, округлої форми, з рівними краями, гладкою або злегка піднятою (на 2-3 мм) поверхнею. На середовищі Ендо, до складу якого входять звичайний МПА, лактоза та індикатор (основний фуксин, знебарвлений сульфідом натрію), колонії ешерихій набувають червоного кольору. Фуксин надає їм металевого блиску. Причиною забарвлення колоній є здатність ешерихій ферментувати лактозу (на відміну від сальмонел, які інертні до цього вуглеводу) з наступним відновленням фуксину, який і надає колоніям ешерихій відповідного кольору. На середовищі Левіна кишкова паличка утворює колонії фіолетового або чорного кольору. В рідких середовищах ешерихії зумовлюють інтенсивне рівномірне помутніння.

Надалі культури вивчають за такою схемою: із двох колоній, вирощених з двох матеріалів (селезінка, печінка, кістковий мозок тощо), відсівають у пробірки з МПБ, які протягом 4 годин культивують у термостаті. Одержану молоду культуру у фазі активного росту висівають у дві пробірки з МПА з метою одержання антигену для РА, а також на барвистий ряд для вивчення біохімічних властивостей. Останній включає середовище Гісса з лактозою та манітом, цитратно-амонійне середовище Сіммонса, МПЖ й середовище Клігlera або Олькеницького.

Родову належність виділених культур визначають за даними, що характеризують ферментативні властивості основних представників родів, які складають сімейство *Enterobacteriaceae*.

Замість рідких диференційно-діагностичних середовищ при вивченні біохімічних властивостей представників сімейства *Enterobacteriaceae* з метою визначення їх роду іноді застосовують системи індикаторні паперові (СПІ). Наприклад, для визначення утворення сірководню добову досліджувану культуру сіють уколом у стовпчик напіврідкого МПА й на поверхню середовища кладуть відповідний індикаторний диск. Пробірки витримують у термостаті при температурі 37 °С ( $\pm 1^\circ$ ). У позитивних випадках через 5—18 годин диск чорніє. При відсутності  $H_2S$  колір диска не змінюється.

Патогенність виділених культур визначають постановкою біопробу на білих мишах. Використовують дві культури, виділені з внутрішніх органів і вирощені наМПА. Культури змивають фізіологічним розчином і одержану суспензію вводять у черевну порожнину трьом гризунам живою масою 14—16 г в дозі 500 млн мікробних клітин. Якщо протягом двох діб після зараження загине хоча б одна миша, культуру вважають патогенною.

Біопробу на курчатах ставлять у випадку виділення *E. coli* у птиці. Трьом курчатам 4-5-тижневого віку у черевну порожнину вводять змив добової агарової культури (1 млрд мікробних клітин). Культуру відносять до патогенної, якщо протягом перших чотирьох днів після зараження загине хоча б одне курча.

Серологічна типізація виділених культур передбачає визначення серологічного типу ешерихій за О-антигеном з використанням специфічних аглютинуючих О-колі-сироваток в РА на склі.

Культури ешерихій вирощують на МПА при температурі 37 °С протягом 18-20 годин змивають фізіологічним розчином, прогрівають на водяній бані при 100 °С протягом години або витримують в автоклаві при температурі 120 °С протягом 2 годин для руйнування термолабільних L- і В-антигенів й термостабільного А-антигену.

Прогріті культури центрифугують протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. Надосадову рідину видаляють, осад ділять на дві частини. Першу без будь-якої обробки використовують як антиген для РА на склі, другу розводять фізіологічним розчином до концентрації 500 млн мікробних клітин в 1 мл й використовують як антиген для пробіркової РА.

**Постановка РА на склі.** У краплю полівалентної колі-сироватки бактеріологічною петлею вносять перший антиген і ретельно перемішують до одержання рівномірної суспензії. У позитивних випадках (за умови, що виділена культура належить до роду *Echerichia*) протягом перших 3 хв. при кімнатній температурі утворюються дрібні крупинки - пластівці аглютинату.

Всі культури, антигени яких дали позитивну реакцію аглютинації на склі, досліджують у пробірковій РА з монорецепторними сироватками у розведенні 1:10, які входять до складу полівалентної сироватки.

У пробірках готують розведення монорецепторної сироватки, починаючи з 1 : 25 і до титру. Кожне розведення в об'ємі 0,5 мл змішують з таким же об'ємом антигену з концентрацією 500 млн клітин

в 1 мл. Пробірки витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 16-18 годин, при кімнатній температурі - 6-8 годин й починають читати реакцію. Її вважають позитивною, якщо на дні пробірки випаде осад у вигляді тонкої плівки з нерівними краями, яка злегка піднімається на стінки пробірки. При цьому відбувається повне прояснення рідини. При струшуванні осаду утворюються крупинки, грудочки, пластівці. У негативних випадках рідина прояснюється частково. На дні пробірки утворюється осад у вигляді щільного концентрованого диска з рівними краями, який при струшуванні утворює рівномірну суспензію.

Досліджувану культуру відносять до конкретного О-серотипу в тому випадку, якщо її антиген реагує в РА з відомою О-монорецепторною сироваткою, розведеною не нижче половини її титру.

Щоб виділену культуру ешерихій вважати збудником колібактеріозу у ссавців, слід зважати на такі показники: культура повинна бути виділеною із селезінки та кісткового мозку, причому немає необхідності в даному випадку визначати її патогенність і серотип; культуру виділяють не менш як з двох досліджуваних органів, вона повинна бути патогенною для білих мишей або аглютинуватись діагностичним набором О-колі-сироваток.

Важливого діагностичного значення набув метод визначення наявності у виділених культур ешерихій адгезивного антигену, який є показником патогенності і дає підставу вважати культуру збудником захворювання.

Бактеріологічний діагноз на набрякову хворобу (колі-ентеротоксемія) поросят вважають поставленим при виділенні β-гемолітичних ешерихій від поросят з типовою патологоанатомічною картиною або при виділенні таких же штамів при відсутності патологоанатомічних змін за умови, що штами зумовлюють загибель не менше двох заражених білих мишей і аглютинуються діагностичним набором О-колі-сироваток.

### **ЗБУДНИКИ САЛЬМОНЕЛЬОЗУ**

Сальмонельоз (паратиф) - інфекційне захворювання, до якого схильні всі види тварин. Клінічний прояв його залежить від виду й віку тварин. У вагітних хворих особин нерідко бувають аборти або вони народжують ослаблених, нежиттєздатний молодняк з ураженими шлунково-кишковим трактом, органами дихання й суглобами. Періодична гарячка, проноси, прогресивне виснаження, ціаноз, кон'юнктивіт - ознаки сальмонельозу.

Збудники сальмонельозу об'єднано у великий рід *Salmonella*, що належить до сімейства *Enterobacteriaceae*. Рід містить кілька сотень видів, серед яких найбільш поширені: *Salm. enteritidis var. dublin*, *Salm. typhimurium* - збудники сальмонельозу телят; *Salm. choleraesuis* - збудник сальмонельозу поросят; *Salm. abortusovis* - збудник сальмонельозу овець та кіз; *Salm. abortusequi* - збудник сальмонельозу коней; *Salm. pullorum*, *Salm. typhigallinarum*, *Salm. anatum*, *Salm. london* - збудники сальмонельозу птиці. У хутрових звірів захворювання найчастіше викликають ті види сальмонел, які виділяються від великої рогатої худоби і свиней.

Сальмонели - середні за величиною палички із заокругленими кінцями, довжиною 1,5-4,0, шириною 0,3-0,8 мкм, грамнегативні, не утворюють спор і капсул. Переважна більшість видів рухливі (перитрихи), аероби. Добре культивуються на простих середовищах, порівняно стійкі до несприятливих факторів, щодо біохімічних властивостей - досить варіабельні. Ферментують вуглеводи до кислоти або кислоти й газу. Не розщеплюють лактозу, адоніт і сахарозу, не утворюють індоли та ацетилметилкарбінолу, не розріджують желатин, не розщеплюють сечовину. Особливе значення має нездатність сальмонел ферментувати лактозу, що покладено в основу їх диференціації. У межах роду сальмонели диференціюють переважно за антигенною структурою з урахуванням біохімічних та культуральних властивостей.

Вирішальне значення у діагностиці сальмонельозу мають лабораторні методи. У хворих тварин беруть проби фекалій, кров, виділення з родових шляхів після абортів. 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.

Матеріал запаковують у водонепроникну тару. Вона повинна бути чистою, стерильною. У холодну пору року проби доставляють у лабораторію не пізніше ніж через 12 годин з моменту відбирання. Якщо швидко відправити проби неможливо, їх консервують 30 % водним розчином гліцерину. Фекалії в лабораторії висівають на середовища протягом 3-4 годин або консервують гліцериновою сумішшю (до 1 л фізіологічного розчину додають 0,5 л нейтрального гліцерину, доводять рН до 8,0, додаючи 20 % розчин фосфорнокислого натрію).

Виділення чистої культури. Проби патологічного матеріалу сіють на МПБ, МПА у бактеріологічних чашках і одне з диференційних середовищ (Ендо, Плоскірева, Левіна, вісмутсульфідний агар), а при хронічній формі захворювання - на одне із середовищ нагромадження (Мюллера, селенітне, Кауфмана тощо). Засіяні пробірки і чашки витримують у термостаті при температура 37 °С протягом 18—20 годин після чого оцінюють за допомогою лупи.

На середовищі Ендо сальмонели утворюють прозорі колонії S-типу діаметром 2-3 мм. На середовищі Левіна вони також прозорі, інколи – з ледь помітним фіолетовим відтінком. На вісмутсульфідному агарі сальмонели утворюють чорні, з металевим блиском колонії.

Ріст більшості видів сальмонел на МПА типовий: утворюють середні за величиною колонії сіруватого кольору, які потім темніють, інколи — утворюють слизові вали. *Salm. abortusovis* на звичайних середовищах росте погано, утворюючи дрібні прозорі колонії з нерівною поверхнею.

На МПБ більшість сальмонел зумовлюють рівномірне помутніння з наступним випаданням незначного осаду, інколи - поверхневої плівки й пристінного кільця.

Із характерних для сальмонел колоній готують мазки, фарбують за Грамом і вивчають морфологію бактерій. Одночасно здійснюють висів на строкатий ряд для вивчення біохімічних властивостей культур (середовище Гісса з глюкозою, лактозою, сахарозою, манітом), а також у пробірки з МПБ й 1 % лептонною водою на здатність культур утворювати сірководень та індол.

Для визначення рухливості мікроорганізмів культури висівають у напіврідкий МПА (0,2 % агар-агару) уколом у стовпчик середовища. Нерухливі види ростуть за ходом уколу, рухливі дають дифузний ріст.

Культури, які не здатні ферментувати лактозу та сахарозу, утворювати індол, проте спроможні розщеплювати глюкозу, при потребі досліджують у РА на склі із сальмонельозними аглютинуючими сироватками груп В, С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, Е тощо.

**Постановка РА на склі.** У краплю діагностичної сироватки (на склі) бактеріологічною петлею вносять молоду (не старше 20 годин) культуру, вирощену на МПА, і ретельно її перемішують. Реакція відбувається у перші хвилини й характеризується утворенням аглютинату у вигляді досить щільних грудочок та пластівців. Якщо позитивну реакцію дала одна з групових сироваток, то обов'язково ставлять аналогічну РА з О-сироватками, які входять до складу цієї



самої серологічної групи. Остаточну культуру випробовують з монорецепторними Н-аглютинуючими сироватками першої та другої фаз, на підставі чого визначають її вид.

Щодо антигенної структури сальмонел, розрізняють термо-стабільний соматичний О-антиген та термолабільний джгутиковий Н-антиген. У представників роду *Salmonella* нараховують 39 різновидів О-антигену, проте у будь-якого конкретного виду їх кількість не перевищує чотирьох.

Сальмонели, у яких повторюються одні й ті самі фракції О-антигену, об'єднано у дев'ять серологічних груп, які позначають великими літерами латинського алфавіту. Джгутиковий антиген має дві фракції (фази, різновиди). Перша - специфічна, притаманна конкретному виду, друга — частіше групова і може повторюватися в інших представників роду. На біофабриках готують аглютинуючі сироватки до згаданих антигенів, за допомогою яких визначають вид виділених культур сальмонел.

Постановка біопроб. Виділеною добовою культурою, орієнтовно віднесеною до сальмонел, заражають молодих білих мишей живою масою 15-18 г кожна. Культуру вводять підшкірно у дозі 0,2-0,3 мл, довівши концентрацію мікробних тіл в 1 мл до 50-100 млн. У заражених гризунів розвивається септичний процес, який призводить до їх загибелі на 3-10-й день.

Виділену культуру відносять до сальмонел, якщо вона має типові морфологічні, культуральні та біохімічні властивості, реагує в РА на склі з монорецепторними О- і Н-аглютинуючими сальмонельозними сироватками.

**Експрес-метод вияву сальмонел.** Для швидкого вияву сальмонел у патологічному матеріалі та м'ясі, визначення належності виділених сальмонел до однієї із серогруп використовують флуоресціюючі сальмонельозні сироватки, тобто глобуліни імунних сироваток, антитіла яких мічено флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ).

Із досліджуваного матеріалу та типових для сальмонел колоній готують тонкі рівномірні мазки, які фіксують метанолом протягом 5 хвилин або етанолом протягом 15 хвилин. На підсушені мазки наносять робочий розчин флуоресціюючої сальмонельозної сироватки. Після цього їх поміщають у термостат (37 °С) або залишають при кімнатній температурі на 15 хвилин. Препарати чотири-п'ять разів промивають фізіологічним розчином протягом 5 хв., наносять краплю забуференого гліцерину (дев'ять частин гліцерину + частина 0,2 М

фосфатного буферу; рН 8,0), накривають покривним склом і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Периферійна частина клітини сальмонел характеризується зелено-жовтим світінням, інтенсивність якого оцінюють за чотирибальною системою (+ + + +).

Позитивним вважають результат, коли спостерігають світіння типових для сальмонел форм інтенсивністю не менш як на два хрести. У контрольних препаратах, оброблених гетерологічною (не сальмонельозною) сироваткою, світіння відсутнє.

Діагноз на сальмонельоз ставлять на підставі клініко-епізоотологічних, патологоанатомічних даних, результатів бактеріологічних, серологічних та імунофлуоресцентних досліджень.

### **Контрольні питання**

1. Які роди, сімейства ентеробактерій мають домінуюче значення у ветеринарії?
2. Патологічні процеси, зумовлені ешерихіями.
3. Загальна характеристика біологічних особливостей кишкової палички.
4. Основні прийоми при здійсненні бактеріологічних досліджень на колібактеріоз.
5. На підставі яких даних ставлять позитивний бактеріологічний діагноз на колібактеріоз?
6. Основні збудники сальмонельозу сільськогосподарських тварин.
7. Морфологічні, культуральні й біохімічні властивості сальмонел.
8. Антигенна структура сальмонел.
9. Диференціація сальмонел.
10. Основні етапи лабораторних досліджень при сальмонельозі.
11. Які існують експрес методи вияву сальмонел у патологічному матеріалі й продуктах харчування?

### **ЗАНЯТТЯ 15. ЗБУДНИК ЛІСТЕРІОЗУ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника лістеріозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Лістеріоз - інфекційне захворювання тварин і людини. Характеризується ураженням центральної нервової системи та генітального

апарату. 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 бувають септична й нервова форми лістеріозу. У всіх видів тварин реєструють аборти та мастити.

Збудник *Listeria monocytogenes* належить до роду *Listeria*. Це - поліморфна (0,6-22 мкм x 0,3-0,5 мк), грампозитивна, рухлива у молодій культурі паличка. Зустрічаються також кокоподібні та нитчасті форми. Мікроаерофіл. Росте на звичайних живильних середовищах. Оптимальні: рН-7,0-7,4, температура для росту - 36-38 °С. Ферментує глюкозу, мальтозу, рамнозу, саліцин з утворенням кислоти без газу; дульцит, інулін та рафінозу не розщеплює; утворює фермент каталазу; редукує лакмус, нейтральний червоний та метиленовий синій. Лабораторна діагностика лістеріозу базується на бактеріологічному та інколи серологічному дослідженнях.

**Бактеріологічне дослідження** включає виявлення збудника безпосередньо у мазках з патологічного матеріалу за допомогою світлового чи люмінесцентного мікроскопу, шляхом постановки біопроби, виділення культури та її ідентифікації.

Бактеріологічна діагностика. 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, в т. ч. з мозку. Фарбують за Грамом.

Виділення чистої культури. З патологічного матеріалу роблять посіви на звичайний або печінковий агар та бульйон з додаванням 1 % глюкози та 2-3 % гліцерину. Крім того, посіви роблять на 5 % кров'яний агар та елективні середовища, МПА з телуритом калію й сироваткою крові, МПА з телуритом калію, флориміцином і поліміксином.

При дослідженні абортіваних плодів посіви роблять з вмісту шлунка та внутрішніх органів. Культивують у мікроаерофільних умовах (5-10% CO<sub>2</sub>). При відсутності росту збудника посіви витримують у термостаті протягом двох тижнів.

Частину патологічного матеріалу залишають у холодильнику (4 °С) на один місяць і при відсутності позитивних результатів первинного

посіву через кожні 10 днів здійснюють повторний посів. При наявності збудника МПБ робиться каламутним. На МПА утворюються дрібні колонії-росинки. На кров'яному агарі з'являються ознаки Р-гемолізу.

У мазках, зроблених з культури, спостерігають поліморфні, розміщені поодинокі, у вигляді римської цифри п'ять (V) та коротких ланцюжків грампозитивні палички.

З метою ідентифікації *L. monocytogenes* використовують пластинчасту РА на склі. Для цього 24-30-годинну агарову культуру, вирощену при температурі 18-26 °С, змішують спочатку з полівалентними, а у разі позитивного результату - з серогруповими сироватками. РА ставлять загальноприйнятим методом. Результат її постановки аналізують через 3 хв. Позитивна реакція характеризується утворенням пластівців (аглютинату) й проясненням краплі.

Біопробу ставлять на білих дорослих мишах або мишенятах 5-6-денного віку. Суспензію з патматеріалу вводять у дозі 0,3-0,5 мл. При наявності у матеріалі збудника лістеріозу мишенята гинуть через 18-37 годин, а дорослі миші - на другу - четверту добу. У мазках-відбитках внутрішніх органів знаходять грампозитивні поліморфні палички. Здійснюють посів на живильне середовище.

З метою диференціації збудників лістеріозу й бешихи свиней добовою культурою заражають морських свинок і кролів. На морських свинках ставлять кон'юнктивальну пробу. Матеріал наносять на кон'юнктиву ока тварини. Через дві — чотири доби *L. monocytogenes* зумовлює розвиток ознак гнійно-катарального кератокон'юнктивіту.

Ставлять також шкірну пробу. 0,3-0,5 мл добової бульйонної культури вводять підшкірно. Збудник зумовлює некроз шкіри, який спостерігають через одну-дві доби після введення матеріалу.

У таблиці 3 приводяться загальні дані, на підставі яких диференціюють збудників лістеріозу і бешихи.

Серологічна діагностика. У лабораторію надсилають кров (сироватку крові), відібрану від хворих тварин або при підозрі на захворювання. Ставлять РА і РЗК загальноприйнятими методами.

Результат серологічної діагностики позитивним вважають тоді, коли виявляють специфічні аглютиніни (РА не нижче як у два плюси) у розведеннях крові 1 : 200 і вище (вівці, кози, свині), 1 : 400 і вище (коні, велика рогата худоба), 1 : 500 і вище (кролі).

Половинна кількість аглютинінів у крові відповідних видів тварин свідчить про сумнівний результат серологічної діагностики. Виявлення комплементзв'язуючих антитіл у сироватці, розведеної 1 : 10, свідчить

про позитивний (якщо РЗК оцінюють у три і чотири плюси) або сумнівний (при оцінці реакції в один або два плюси) результат серологічної діагностики.

**Таблиця 3**

**Диференціація *L. monocytogenes* та *E. rhusiopathiae***

Показник	Збудник лістеріозу	Збудник бешихи свиней
Рухливість у молодій культурі	+	-
Ферментація саліцину	+	-
Кон'юнктивальна проба на морських свинках	+	-
РА з позитивною протилістеріозною сироваткою	+	
РА з позитивною протибешиховою сироваткою	--	+

Експрес-діагностику лістеріозу здійснюють за допомогою РІФ. Реакцію ставлять прямим методом. При виявленні у мазках з патологічного матеріалу типових бактерій і специфічної люмінесценції (на три - чотири плюси) діагноз вважають установленим.

Таким чином, лабораторний діагноз на лістеріоз може бути встановлений бактеріологічним (виділення та ідентифікація збудника з урахуванням постановки біопроби), серологічним (РА, РСК) та люмінесцентно-серологічним (РІФ) методами.

### **Контрольні питання**

1. Лабораторні методи діагностики лістеріозу.
2. Який матеріал надсилають у лабораторію для бактеріологічної діагностики лістеріозу?
3. Морфологія лістерій.
4. Диференціація збудника лістеріозу і бешихи свиней.
5. Експрес-діагностика лістеріозу.

## **ЗАНЯТТЯ 16. ЗБУДНИК БЕШИХИ СВИНЕЙ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника бешихи свиней. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія,

особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Бешиха свиней - захворювання свиней переважно 3-12-місячного віку. Характеризується септицемією, порушенням травлення, ураженням серцево-судинної системи, набряком легень. Перебіг захворювання може бути блискавичним, гострим, підгострим та хронічним. Досить часто захворювання перебігає у вигляді "кропивниці", при якій на шкірі тварин утворюються локальні еритеми. Хронічний перебіг характеризується бородавчастим ендокардитом, некрозами шкіри.

Збудник *Erysipelothrix rhusiopathiae* (*Erysipelothrix insidiosa*, *Bact. erysipelatis suis*) належить до роду *Erysipelothrix* з невизначеним місцем у систематиці мікроорганізмів. Це - маленька (1,0-0,5 x 0,3-0,3 мкм), нерухлива грампозитивна паличка. Зустрічаються ниткоподібні форми (у мазках з уражених клапанів серця, старих культур; рис. 9). Спор і капсул не утворює. Мікроаерофіл. Росте на звичайних живильних середовищах. Ферментує глюкозу, лактозу й білки з утворенням H<sub>2</sub>S, не розщеплює сахарозу, маніт.

**Бактеріологічна діагностика.** У лабораторію надсилають труп тварини, паренхіматозні органи (серце, печінку, селезінку, нирки), трубчасту кістку. При хронічному перебігу серце надсилають обов'язково.

**Мікроскопія.** Готують мазки-відбитки, які фарбують за Грамом. Збудник виявляють у вигляді поодиноких, розміщених парно чи невеликими купками паличок. У мазках з уражених клапанів серця він має вигляд переплутаних ниток.

**Виділення чистої культури.** Посів роблять на МПБ та МПА. Інкують при температурі 37 °С протягом 18-24 годин (при відсутності ознак росту збудника середовища витримують у термостаті 48 годин).

*Erysipelothrix rhusiopathiae* росте в аеробних умовах, проте оптимальним для нього є мікроаерофільне середовище (5-10 % CO<sub>2</sub>). МПБ трохи каламутніє. Через 48-72 години на дні пробірки з'являється осад, що при струшуванні пробірки піднімається у вигляді хмаринки.

На МПА утворюються маленькі прозорі, S-подібні колонії. Інколи (частіше з патматеріалу від хворих тварин з хронічним перебігом захворювання) виростають R-колонії (рис. 9б). Останні трохи більші, мають шорстку поверхню та краї з коренеподібними відростками.

У мазках, зроблених з колоній S-форми, виявляють маленькі грампозитивні палички, а з колоній R-форми - ланцюжки або нитки, інколи грамнегативні.

Біопробу ставлять на білих мишах. Гризунам живою масою 16-18 г підшкірно вводять суспензію з паренхіматозних органів або змив 1-2-добової агарової культури в дозі 0,1-0,2 мл. При наявності збудника миші гинуть через 48-96 годин.

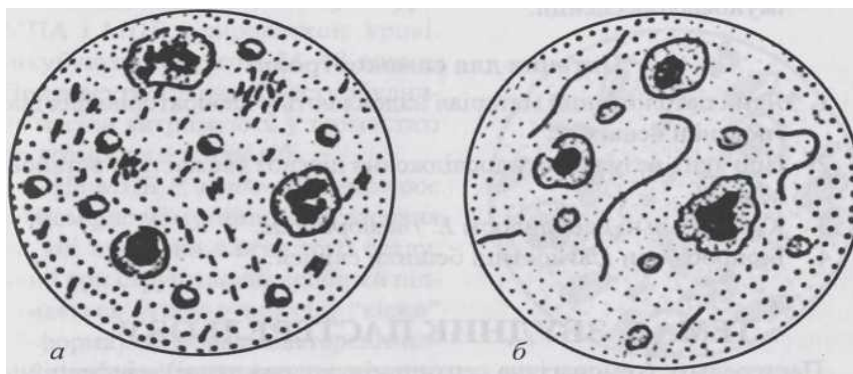


Рис. 9. Збудник бешихи свиней:

а - мазок з печінки; б - мазок з уражених клапанів серця загиблого поросяти. Імерсія

Трупи мишей розтинають, роблять мазки-відбитки з крові, внутрішніх органів, які мікроскопують, висівають на живильне середовище.

**Серологічна ідентифікація *E. rhusiopathiae*.** На предметне скло наносять краплю специфічної сироватки (у розведенні 1 : 50), бактеріологічною петлею вносять добову агарову культуру й перемішують. Якщо культура є *E. rhusiopathiae*, то спостерігаються ознаки аглютинації - утворення крупинок та прояснення рідини.

**Експрес-діагностика.** Мазки-відбитки з патологічного матеріалу обробляють флуоресцентною протибешиховою сироваткою (прямий метод імунофлуоресценції) і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. При наявності типових форм та яскравої специфічної імунофлуоресценції (вираженої у трьох-чотирьох хрестах) результат вважають позитивним.

Збудника бешихи свиней слід відрізняти від збудника лістеріозу.

Бактеріологічний діагноз на бешиху свиней вважають установленим:

- у випадку виділення з патологічного матеріалу збудника;
- при загибелі інфікованих патологічним матеріалом мишей із наступним виділенням *E. rhusiopathiae* (якщо навіть у патологічному

матеріалі збудник не був виявлений мікроскопією чи посівом на живильне середовище);  
- при виявленні збудника у патологічному матеріалі методом імунофлуоресценції.

### Контрольні питання

1. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію для діагностики бешихи?
2. При яких результатах дослідження діагноз вважається встановленим?
3. Культуральні особливості *E. rhusiopathiae*.
4. Біопроба при діагностиці бешихи свиней.

### ЗАНЯТТЯ 17. ЗБУДНИК ПАСТЕРЕЛЬОЗУ

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника пастерельозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Пастерельоз, (геморагічна септицемія, холера птиці) - інфекційне захворювання тварин багатьох видів. Характеризується септицемією, ураженням легень, запально-геморагічними процесами на серозних і слизових оболонках. Перебіг захворювання може бути надгострим, гострим, хронічним; у курей і кролів - може набувати характер епізоотій, щодо інших тварин — частіше має місце ензоотичний перебіг.

Збудник *Pasteurella multocida* належить до роду *Pasteurella*, родини *Pasteurellaceae*. Це грамнегативна, нерухлива, дрібна (0,3 x 1,5 мкм), із закругленими кінцями (інколи яйцеподібна) паличка. У мазках із культури - кокоподібна. Синькою Леффлера, фарбою Романовського - Гімзи забарвлюється біполярно (середина залишається непофарбованою). Утворює капсули, не утворює спор. Факультативний анаероб. Потребує оптимального рН (7,3-7,4) і температури 37-38 °С. Може рости на звичайних живильних середовищах, проте інтенсивніше росте на середовищах з додаванням кров'яної сироватки або крові. Ферментує лактозу, дульцит, гліцерин, саліцин, інулін, рамнозу, рафінозу. Редукує нітрати. Утворює індол.



**Бактеріологічна діагностика.** У лабораторію надсилають шматочки печінки та селезінки, нирку, лімфатичні вузли, кров із серця, трубчасту кістку.

**Мікроскопія.** Роблять мазки з крові, внутрішніх органів. Фарбують за Грамом, синькою Леффлера; фарбою Романовського - Гімзи.

При мікроскопії пастерели мають вигляд грамнегативних, біполярних кокобактерій, розміщених по одній, дві й кілька клітин вільно чи у цитоплазмі фагоцитів.

**Виділення чистої культури.** Патологічний матеріал сіють на МПА і МПБ з сироваткою крові.

Інкубують протягом 24-48 годин. При відсутності ознак росту збудника посіви витримують у термостаті до чотирьох - п'яти діб.

На МПБ *P. multocida* зумовлює рівномірне помутніння й утворення на дні пробірки слизистого осаду, який при струшуванні пробірки піднімається угору у вигляді "кіски" (S-форма). R-форми пастерели помутніння середовища не викликають. Вони утворюють дрібнозернистий або у вигляді пластівців осад.

На МПА пастерели утворюють дрібні, випуклі, прозорі, округлі колонії, які при боковому освітленні помітно флуоресціюють (S-форма).

Біологічну пробу ставлять з метою виділення чистої культури та визначення її вірулентності. Матеріалом від птиці заражають голубів, курей, качок, від великої рогатої худоби, свиней та овець - 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. При наявності пастерел заражені тварини гинуть через 18-36 годин. Вірулентність ізольованих пастерел визначають, заражаючи підшкірно названих лабораторних тварин аналогічними способами.

Враховуючи поширене пастерелоносійство у кролів, перед постановкою біопроби на пастерельоз їх необхідно дослідити таким чином.

По дві краплі 0,5 % водного розчину брильянтового зеленого кролям вводять протягом трьох днів у ніздрі. У пастерелоносіїв з'являються гнійні виділення з носової порожнини. Як лабораторних тварин їх не використовують.

## **Контрольні питання**

1. Морфологія пастерел.

2. Особливості тинкторіальних властивостей пастерел.
3. Схема бактеріологічного дослідження при діагностиці пастерельозу.

## **ЗАНЯТТЯ 18. ЗБУДНИК ТУЛЯРЕМІЇ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника туляремії. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Туляремія - гостре інфекційне захворювання сільськогосподарських тварин, для якого характерні явища септицемії, збільшення лімфатичних вузлів, ураження центральної нервової системи, у корів розвивається мастит, кобили абортують. Туляремією хворіють також люди. Завдяки широкому носійству збудника різними гризунами, рептиліями, амфібіями у певних регіонах створюються природно-вогнищеві зони туляремії.

Найбільш чутливі до захворювання поросята, ягнята, кролі, курчата. Високорезистентні до збудника індики, гуси, качки, голуби.

Зараження людей туляремією здійснюється при безпосередньому контакті з хворими тваринами, через інфіковані об'єкти зовнішнього середовища (вода, повітря, пил, корми тощо) та укуси кровосисних комах - переносників збудника. Слід пам'ятати, що мікроби туляремії здатні проникати в організм навіть через неушкоджену шкіру й слизові оболонки.

Збудник хвороби *Francisella tularensis* має форму коків або палички довжиною 0,3-0,7 мкм та діаметром 0,5-0,6 мкм. Не утворює спор, має слабку капсулу, фарбується негативно за Грамом, облігатний аероб, не культивується на простих живильних середовищах.

Біохімічна активність бактерій туляремії невисока. На спеціальних середовищах вони ферментують до кислоти без утворення газу глюкозу, мальтозу, манозу, інколи - левульозу, гліцерин і декстрин; інертні щодо лактози, сахарози, рамнози, маніту. Розщеплюють білки з утворенням сірководню.

**Лабораторна діагностика.** Від хворих тварин для досліджень відбирають пунктати уражених лімфатичних вузлів, фекалії, сечу, беруть абортівані плоди. Після загибелі тварин відбирають шматочки паренхіматозних органів, збільшені лімфатичні вузли. Трупні гризунів

надсилають у лабораторію цілими. Матеріал кладуть у термоси з льодом відразу після відбирання або консервують 30 % водним стерильним розчином гліцерину.

**Бактеріологічна діагностика** туляремії включає: мікроскопію мазків-відбитків із патологічного матеріалу, які забарвлюють протягом 1,5 години за Романовським - Гімзою або Грамом. Наявність у препаратах дрібних кокоподібних бактерій (інколи біполярів) у поєднанні з клініко-епізоотологічними даними дає змогу зробити припущення про наявність збудника туляремії. Проте слід зауважити, що мікроскопією можна виявити збудника лише за умови значного обмінення ним досліджуваного матеріалу; виділення чистої культури *Fr. tularensis* безпосередньо з патологічного матеріалу у більшості випадків неможливе. Доказати наявність збудника у первинних матеріалах можна лише за умови постановки спеціальної біологічної проби, що є проміжним етапом дослідження.

Суспензією патологічного матеріалу заражають морських свинок і білих мишей підшкірно або у порожнину очеревини. При достатній кількості збудника в матеріалі тварини гинуть протягом 10 днів. При розтині трупів звертають увагу на характерне запалення та збільшення лімфатичних вузлів, наявність у печінці, селезінці, легенях сірувато-білих дрібних вогнищ некрозу.

У більшості випадків виникає необхідність проведення двох – трьох “сліпих” пасажів збудника туляремії через організм лабораторних тварин.

Із внутрішніх органів, лімфатичних вузлів загиблих морських свинок або білих мишей готують мазки-відбитки для мікроскопічного дослідження і здійснюють посіви на спеціальні живильні середовища з метою виділення чистої культури збудника. При цьому використовують: яйцево-жовткове середовище Мак-Коя, яке готують змішуванням 60 частин жовтків курячих яєць та 40 частин стерильного фізіологічного розчину (рН 7,0-7,2). Суміш нагрівають до температури 80 °С протягом години; глюкозо-цистиновий кров'яний агар, який містить відповідно 0,1 % цистину, 1 - глюкози та 10 % стерильної дефібрированої крові кроля; глюкозо-цистиновий рибно-дріжджовий агар, який відрізняється від попереднього середовища лише субстратною основою.

При проведенні посіву з глибини паренхіматозного органа асептично вирізають невеликий шматок тканини, яку прикладають до поверхні живильного середовища.

На середовищах з кров'ю збудник туляремії через 24-48 годин після посіву утворює дрібні білуваті, з блакитним відтінком колонії S-типу правильної округлої форми, з рівними краями і поверхнею. В процесі культивування бактерії туляремії розщеплюються, що призводить до появи колоній R-типу з нерівними краями.

Ідентифікацію виділеної культури здійснюють на основі: а) мікроскопії мазків з патологічного матеріалу й одержаних культур; б) характеру росту культури на спеціальних живильних середовищах з кров'ю; в) нездатності культури рости на звичайних середовищах; г) постановки РА із специфічною туляремійною сироваткою; д) проведення біопроби на лабораторних тваринах з одержанням характерної патологоанатомічної картини й вияву у матеріалі цих тварин типових для збудника туляремії мікробних форм.

Із серологічних методів діагностики певне значення мають РА та РЗК, які дають можливість виявити специфічні антитіла в сироватці крові досліджуваних тварин.

Для швидкого доказу наявності туляремійного антигену в патологічному матеріалі ставлять реакцію преципітації (РП) за методикою, описаною стосовно сибірки.

У медицині з метою діагностики захворювання застосовують алергічний метод. Обстежуваним особам підшкірно вводять алерген тулярин, що є суспензією *Fr. tularensis* в фізіологічному розчині з концентрацією 100 млн мікробних клітин в 1 мл, інактивованих нагріванням при температурі 70 °С. У хворих через 6-10 годин на місці введення препарату розвиваються гіперемія, набряк і болючий інфільтрат.

### **Контрольні питання**

1. Які основні клінічні ознаки туляремії у сільськогосподарських тварин?
2. Збудник туляремії і його основні біологічні властивості.
3. Як здійснюють бактеріологічну діагностику туляремії?

### **ЗАНЯТТЯ 19. ЗБУДНИК БРУЦЕЛЬОЗУ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника бруцельозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Бруцельоз - хронічне інфекційне захворювання сільськогосподарських тварин багатьох видів, яке, в першу чергу, характеризується абортами, ендометритами, бурситами, тендовагінітами, артритами, орхітами, епідидимітами. Часто перебігає у латентній формі.

Збудник віднесений до роду *Brucella*, який об'єднує шість видів: *Brucella melitensis* - виділяється переважно від кіз та овець, становить найбільшу небезпеку для людей; *Br. abortus* - уражає переважно велику рогату худобу; *Br. suis* - виділяється від свиней; *Br. ovis* — збудник інфекційного епідидиміту баранів; *Br. canis* і *Br. neotome* - виділені відповідно від собак і чагарникових пацюків.

Бруцели - дрібні кокоподібні бактерії, не рухливі, не утворюють спор і капсул, грамнегативні. Величина клітини коливається в межах від 0,5 x 0,7 до 0,6 x 1,5 мкм.

Лабораторні методи діагностики бруцельозу включають проведення бактеріологічних і серологічних досліджень. Масове обстеження тварин у господарствах здійснюють алергічною пробою.

Для бактеріологічного дослідження в лабораторію надсилають дрібні абортвані плоди (від свиноматки - не менше трьох). Від великих плодів відбирають шлунок із вмістом, а також шматочки печінки і селезінки. Крім того, відбирають ділянки плодових оболонок з вогнищами геморагічної інфільтрації, виділення з родових шляхів, вміст уражених бурс. Одночасно від тварин, що абортували, для серологічного дослідження відбирають проби крові та молока.

Патологічний матеріал упаковують в поліетиленові пакети, вміщують у водонепроникний ящик або банку й негайно відправляють в лабораторію. При відсутності можливості доставити протягом 24-30 годин матеріал консервують 30 % стерильним водним розчином гліцерину.

Бактеріологічна діагностика бруцельозу основана на бактеріоскопії мазків із патологічного матеріалу, виділенні культури бруцел і при необхідності - постановці біопроби.

Мазки (по два з кожного об'єкта) фіксують полум'ям, фарбують за Грамом і на вибір - за Козловським або Стемпом.

**Фарбування мазків за методом Козловського.** Фіксовані мазки фарбують протягом 2 хв. 2 % водним розчином сафраніну з підігріванням до появи пухирців. Препарати швидко промивають водопровідною водою, дофарбовують протягом 30-60 секунд 0,75-1,0 % водним розчином малахітового зеленого, знову промивають водою і висушують.

Бруцели порівняно з іншими бактеріями повільно сприймають анілінові фарби, тому не встигають перефарбуватись малахітовим зеленим зберігають яскраво-червоне забарвлення, тоді як інша мікрофлора й основний фон препарату набувають зеленого кольору.

**Метод Стемпа.** Фіксовані мазки протягом 10 хвилин фарбують карболовим фуксином Ціля (1 : 10), промивають водою протягом 30 секунд, диференціюють 0,5 % розчином оцтової кислоти, промивають водою, дофарбовують (20-30 с) 1 % розчином метиленового синього. Після наступного промивання водою мазки висушують і мікроскопують. Бруцели мають червоне забарвлення, інші мікроби, клітини патологічного матеріалу та фон - синє. В мазках бруцели розміщуються ізольовано, парами і невеликими скупченнями.

Для виділення чистої культури бруцел використовують спеціальні середовища типу: м'ясо-пептонний печінковий бульйон (МППБ), печінково-глюкозо-гліцеринний бульйон (ПГГБ), аналогічний агар (ПГГА), гліцеринна картопля тощо. Для пригнічення сторонньої мікрофлори до середовищ додають бактеріостатичні препарати - генціанвіолет і малахітовий зелений в концентрації 1 : 200 тис., кристалвіолет у концентрації 1 : 100 тис. або оцтовокислий натрій із розрахунку 0,125 мг/мл.

Перед посівом із паренхіматозних органів вирізають шматочки розміром 2 x 1,5 x 2,5 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 шлунка плода сіють на щільні й рідкі середовища.

Для знищення сторонньої мікрофлори у матеріалі з плодів оболонки шматочки проби на 30 хв. заливають 3 % розчином гідроксиду калію, промивають стерильним фізіологічним розчином і приготувану в ступці суспензію висівають на середовища з бактеріостатиками.

Засіяні бактеріологічні чашки (пробірки) поміщують у термостат при температурі 37-38 °С, а посіви від великої рогатої худоби інкубують в атмосфері з вмістом 10-15 % CO<sub>2</sub>. Цього можна досягти заповненням ексикатора з посівами вуглекислим газом з апарата Кіппа або спалюванням в ньому невеликої кількості спирту.

За посівами спостерігають протягом 30 днів. Пробірки, чашки, в яких відмічено ріст мікрофлори через 24 години, видаляють.

Бруцели розвиваються досить повільно. Перші ознаки росту з'являються через 7-10, інколи - через 30-40 днів. Одержані культури в іншій генерації ростуть значно швидше (на 3-5-й день).

На поверхні щільних живильних середовищ бруцели утворюють дрібні, блискучі, випуклі, з рівними краями й поверхнею, голубуваті колонії, які згодом сіріють. У рідких середовищах вони зумовлюють рівномірне помутніння з пристінковим кільцем. Через кілька днів випадає невеликий осад.

Виділені культури ідентифікують на основі морфологічних, тинкторіальних культуральних особливостей, а також за допомогою реакції аглютинації на склі з бруцельозною діагностичною сироваткою. При цьому на добре знежирене предметне скло наносять краплю бруцельозної сироватки в розведенні 1:50 поряд - краплю цієї ж сироватки у розведенні 1:2. Бактеріологічною петлею в обидві краплі вносять

культуру й ретельно перемішують до утворення рівномірної суспензії. Якщо виділена культура виявиться бруцельозною, то через 1-3 хвилини утворюються пластівці або грудочки з одночасним проясненням рідини. Контролем є нормальна (негативна) сироватка в таких же розведеннях + виділена культура. Аглютинації в контролі не повинно бути.

**Біологічну пробу** при діагностиці бруцельозу ставлять на морських свинках (не менше двох особин) живою масою 300-400 г, в сироватці крові яких відсутні антитіла до бруцельозного антигену. Тварин заражають суспензією із органів і вмісту шлунка на фізіологічному розчині у співвідношенні 1 : 10 підшкірно, в дозі 1 мл, з внутрішнього боку стегна. Аналогічну суспензію готують також із плодових оболонок і плаценти. Вміст бурс вводять підшкірно в дозі 0,2-0,3 мл.

У заражених свинок інфекція розвивається в латентній формі без будь-яких клінічних ознак. У зв'язку з цим у піддослідних тварин беруть проби крові на 15, 25 і 40-й дні після зараження. Одержану сироватку досліджують за допомогою пробіркової РА з бруцельозним антигеном в розведеннях від 1 : 10 до 1 : 80. У випадку вияву антитіл щодо згаданого антигену в розведенні 1 : 10 і більше біопробу вважають

позитивною.

Морських свинок забивають, відмічають патологоанатомічні зміни в селезінці, печінці й лімфатичних вузлах. Проводять бактеріологічне дослідження. При негативній РА тварин витримують до 60 днів, і

остаточний результат біопроби оцінюють за даними серологічних та бактеріологічних досліджень.

**Серологічні методи діагностики бруцельозу** основані на виявленні в сироватці крові тварин специфічних антитіл до бруцельозного антигену, чого досягають постановкою РА, роз-бенгал проби (РБП), реакції зв'язування комплементу (РЗК), реакції тривалого зв'язування комплементу (РТЗК).

Реакцію вважають позитивною при наявності аглютинації з сироватками крові великої рогатої худоби, коней і верблюдів, починаючи з розведення 1 : 100; кіз, овець, буйволів, оленів і собак — з розведення 1 : 50; хутрових звірів та морських свинок - починаючи з розведення 1 : 10 з інтенсивністю не менше ніж на два хрести. Сумнівною вважають реакцію, при якій виникає аглютинація в розведенні 1 : 50 з сироватками крові великої рогатої худоби, коней і верблюдів, у розведенні 1 : 25 – з сироватками крові овець, кіз, буйволів, оленів і собак з оцінкою не менш як на два хрести.

Роз-бенгал пробу (*Rose Bengal Test*) відповідно до вимог ГОСТ 25385 - 82 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<sup>3</sup> мікропіпеткою вносять на дно лунки. При дослідженні сироваток крові великої рогатої худоби, коней, верблюдів і свиней у кожную лунку з сироваткою вносять також 0,03 мл бруцельозного антигену, пофарбованого бенгальським рожевим, а при дослідженні сироваток крові овець, кіз, буйволів і оленів - 0,015 мл. Компоненти ретельно перемішують, пластину злегка погойдують протягом 2 хв. У 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 у неблагополучних господарствах, то цих тварин вважають хворими на бруцельоз. Сироватки крові від інших тварин з таких господарств, що позитивно реагують у РБП, додатково досліджують постановкою РА і РЗК.

*РЗК* та *РТЗК* ставлять за описаною вище схемою. Реакції 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.** В уленгутівські пробірки наливають по 0,05 мл кольорового бруцельозного антигену і додають по 1 мл молока. Якщо реакцію ставлять у пробірках Флоринського або серологічних, то компоненти беруть відповідно в об'ємах 0,1 і 2 мл. Після ретельного перемішування компонентів пробірки її вміщують на водяну баню або термостат при температурі 37-38 °С на годину.

Якщо в сироватці молока будуть присутні антитіла до бруцельозного антигену, то 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 ВІЕВ.

### **Контрольні питання**

1. Основні види бруцел.
2. Характеристика біологічних властивостей бруцел.
3. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію для бактеріологічного дослідження на бруцельоз?
4. Основні етапи бактеріологічного дослідження.
5. Як ставлять біопробу при діагностиці бруцельозу?
6. Які критерії оцінки сироваток крові при їх дослідженні на бруцельоз в РА та РЗК?
7. Які ще реакції ставлять при серологічній діагностиці бруцельозу?

### **ЗАНЯТТЯ 20. ЗБУДНИК СИБІРКИ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника сибірки. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Сибірка-гостре інфекційне захворювання, що характеризується явищами септицемії, інтоксикацією, утворенням специфічних карбункулів. Чутливі до сибірки всі види диких і домашніх тварин,

люди. Найчутливіші травоядні, більш стійкі свині, малочутливі - собаки, кішки.

Збудник *Bacillus anthracis* - нерухлива, грампозитивна, що утворює капсули і спори, паличка (3-10 × 1-1,5 мкм).

Аероб, не вибаглива до умов вирощування, добре росте на звичайних живильних середовищах (оптимальна рН - 7,3-7,6). Капсули утворює в організмі, а також на середовищах, збагачених кров'ю чи сироваткою (рис. 10а). 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.

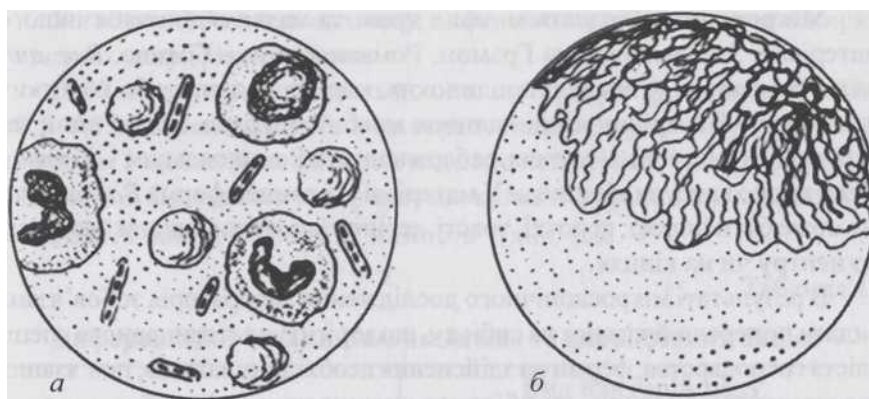


Рис. 10. *Bac. anthracis*:

а - мазок із патологічного матеріалу (імерсія);

б - край колонії (збільшення x 15)

**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. Культу 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 стеклах 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 заглотові 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. 10а). 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, запобіганням поширенню інфекції.

**Виділення чистої культури.** Посіви здійснюють на МПА і МПБ. Інкують 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 (див. рис. 10б). Інколи *Bac. anthracis* утворює S- чи M-форми колонії (при підвищеному вмісті CO<sub>2</sub> 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, поодинокі 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 “антропоїди” *Bac. megatherium*, *Bac. subtilis*, *Bac. cereus* та ін.

Щоб визначити чутливість до пеніциліну, культури сіють на МПА з 0,5-0,05 ОД пеніциліну (в 1 мл середовища). Інкують у термостаті протягом 3 годин. *Bac. anthracis* під дією пеніциліну трансформується у L-форми. При цьому утворюються кулясті форми. При мікроскопії виявляють ланцюги форми “намиста”.

**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. Трупні розтинають і досліджують бактеріологічно.

**Дослідження шкіряної сировини на сибірку за допомогою РП.** Проводять за методикою, описаною на сторінці 102 (Лабор. зан. 2. Реакція преципітації).

**Експрес-діагностику** сибірки здійснюють за допомогою прямого чи непрямого МФА. Використовують також МФА, оснований на системі фаг - флуоресцентний антифаг. Цей метод належить до непрямих.

### **Контрольні питання**

1. Який матеріал надсилають у лабораторію для дослідження?
2. Особливості відбирання матеріалу при підозрі на сибірку.
3. Морфологія та культуральні властивості збудника.
4. Диференціація *Vac. anthracis* і сапрофітів.
5. Серологічні методи виявлення сибіркового антигену у різних матеріалах.
6. Схема дослідження шкіряної сировини.

## **ЗАНЯТТЯ 21. ПАТОГЕННІ АНАЕРОБИ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників: емфізематозного карбункула, злякисного набряку, брадзоту, анаеробної ентеротоксемії, анаеробної дизентерії ягнят, правця, ботулізму, некробактеріозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Патогенні анаероби - це збудники багатьох захворювань: злякисного набряку, дизентерії ягнят, брадзоту, ентеротоксемії 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 КАРБУНКУЛА**

Емфізематозний карбункул, емкар - гостре інфекційне захворювання великої рогатої худоби, рідше - овець, кіз, лосів, оленів та ін. Характеризується лихоманкою, розвитком в окремих групах м'язів крепітуючих пухлин.

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 в трупах та у зовнішньому середовищі. Останні розміщуються центрально або субтермінально.

Капсул збудник не утворює, анаероб. Оптимальна температура для росту - 36-38 °С. Ростає на спеціальних живильних середовищах (Кітт - Тароцці, глюкозо-кров'яний агар). В рідких середовищах зумовлює помутніння, газоутворення, на твердих утворює колонії у вигляді перламутрового гудзика чи виноградного листка (рис. 51). 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.

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 поодинокі, попарно, інколи - у вигляді коротеньких ланцюжків.

**Виділення чистої культури.** Посів роблять на середовище Кітт - Тароцці, МПБ, МПА. Несвіжий матеріал перед посівом прогривають 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.

**Біопроба.** Морських свинок заражають підшкірно або внутрішньом'язово суспензією з патматеріалу, до якого додають пісок чи бите скло, що зумовлює травмування тканин і полегшує розвиток інфекції. Тварини гинуть через 24-96 годин після ін'єкції.

## **ЗБУДНИК ЗЛОЯКІСНОГО НАБРЯКУ**

Злоякісний набряк - захворювання різних видів тварин. Характеризується виникненням запальних набряків з утворенням газу, змертвінням уражених тканин, загальною інтоксикацією організму, високою летальністю.

Захворювання має полімікробну етіологію. З патматеріалу від хворих тварин найчастіше виділяють *Cl. perfringens*, *Cl. odematiens*, *Cl. novyi*, *Cl. histoliticum*, *Cl. sordelii*, *Cl. septicum* зрідка *Cl. chauvoci*. Кожний з них може викликати захворювання.

**Бактеріологічна діагностика.** В лабораторію надсилають шматочки ураженої тканини, запальний ексудат. Перед дослідженням матеріал розтирають у ступці, додавши ізотонічний розчин.

**Мікроскопія.** Мазки фарбують за методом Грама. *Cl. perfringens* поліморфна, грампозитивна, довжиною 4-8 мкм паличка, *Cl. septicum* - грампозитивна паличка (3-8 x 0,8 - 1,0 мкм). *Cl. novyi* грампозитивна паличка довжиною 4—10 мкм, *Cl. histoliticum* - тоненька, шириною 0,3-0,5 й довжиною 3-5 мкм грампозитивна паличка.

Таким чином, мікроскопія дає змогу лише зорієнтуватись відносно наявності патогенних анаеробів у матеріалі. Визначити видову належність збудника можна тільки ізолювавши його у чистій культурі.

Крім характерних для патогенних анаеробів форм при мікроскопії досить часто можна виявити стафілококи, стрептококи та ін.

**Виділення чистої культури.** Суспензію, одержану з патологічного матеріалу, висівають на середовище Кітт - Тароцці чи Вільсона - Блера.

Інкубують у термостаті і, як правило, спостерігають ріст змішаної культури. Для одержання чистих культур роблять пересів на кров'яний МПА за методом Дригальського. Інкубують в анаеробних умовах. Колонії вивчають і роблять з них відсіви на середовище Кітт - Тароцці, кров'яний агар та інші, які дають змогу ідентифікувати збудника. *Cl. perfringens* зумовлює помутніння бульйону та газоутворення. Через 2-3 дні мікробна маса осідає на дно, й бульйон стає прозорим. На кров'яному агарі збудник утворює випуклі, з рівними краями колонії, навколо колоній - зона  $\alpha$ -гемолізу. На середовищі Вільсона - Блера утворюються чорні колонії. Інколи формуються колонії М- чи R-форми.

При рості *Cl. septicum* середовище Кітт-Тароцці мутніє рівномірно, спостерігаються ознаки газоутворення. Через 48 годин бульйон стає прозорим, на дні утворюється осад. Середовище з мозку

*Cl. septicum* не змінює. На глюкозо-кров'яному агарі утворюються колонії, навколо яких - зона  $\beta$ -гемолізу. *Cl. novyi* (*Cl. oedematicus*) зумовлює слабке помутніння з незначним газоутворенням. Через 18-24 години бульйон стає прозорим, на дні з'являється осад у вигляді пластівців. На твердому живильному середовищі утворюються великі, з нерівними краями колонії.

*Cl. histolyticum* викликає значне помутніння середовища Кітт - Тароцці. Пізніше воно стає прозорим, утворюється осад. Газ не утворюється. На глюкозо-кров'яному агарі спостерігаються колонії-росинки. Зона гемолізу відсутня.

**Біопроба.** Суспензію патологічного матеріалу (1 мл) морським свинкам вводять підшкірно або внутрішньом'язово. При наявності збудника злоякісного набряку тварини гинуть протягом 16-48 годин. На місці ін'єкції у них - кров'яний набряк, крапкові крововиливи. Підшкірна клітковина - набрякла й геморагічно інфільтрована, м'язи темно-червоного кольору, присутні ознаки газоутворення. Труп розтинають, роблять мазки-відбитки з місця ін'єкції та з поверхні печінки.

Інколи біопробу ставлять з метою оцінки вірулентності збудника. Добову бульйонну культуру морським свинкам вводять підшкірно чи внутрішньом'язово в дозі 0,5-1,0 мл.

**Серологічна ідентифікація збудника.** З метою ідентифікації збудника використовують реакцію нейтралізації токсину специфічною сироваткою. Мінімальну, смертельну для білих мишей дозу культури або її фільтрату змішують з 0,3-0,5 мл відповідної типоспецифічної сироватки й витримують у термостаті протягом 45 хвилин. Після цього вводять гризунам підшкірно або внутрішньочеревно. Для контролю одночасно вводять культуру або фільтрат, не оброблені специфічною сироваткою.

Вид збудника визначають за сироваткою, яка "захищає" білих мишей від загибелі, тобто нейтралізує його токсини.

## **ЗБУДНИК БРАДЗОТУ**

Брадзот - гостре неконтагіозне захворювання овець і кіз, що характеризується геморагічним запаленням сичуга й дванадцятипалої кишки, судомами, високою летальністю.

Збудники брадзоту- *Cl. septicum* та *Cl. novyi* типу А. Нерідко виділяються *Cl. novyi* типу В (*Cl. gigas*), *Cl. perfringens*, *Cl. sordelii*.

**Бактеріологічна діагностика.** У лабораторію надсилають шматочки сичуга, тонкого відділу кишечника, ексудат з грудної та черевної порожнин, некротичні ділянки печінки. Порядок дослідження такий, як і при діагностиці злякисного набряку.

### **ЗБУДНИКИ АНАЕРОБНОЇ ЕНТЕРОТОКСЕМІЇ**

Інфекційна анаеробна ентеротоксемія овець - неконтагіозне захворювання переважно молодняка тварин. Характеризується геморагічним ентеритом, некрозом у тонкому відділу кишечника, загальною інтоксикацією. Збудник захворювання у овець, кіз та кролів - *Cl. perfringens* типу D, у телят - типів C, D, E, у поросят - B і C.

**Бактеріологічна діагностика.** У лабораторію надсилають труп або уражену нирку, відрізки уражених кишок з вмістом, ексудат з черевної порожнини.

Лабораторна діагностика анаеробної ентеротоксемії включає два етапи: 1) виявлення токсину збудника у вмістимому кишечнику;

2) виділення збудника та ідентифікація його на основі культурально морфологічних, патогенних і токсичних властивостей.

**Визначення токсину.** Вміст кишечника у колбі (банці) змішують з подвійною кількістю ізотонічного розчину NaCl, шутелюють і центрифугують протягом 30 хв. при 2000 об/хв. або фільтрують через бактерійний фільтр. Фільтрат вводять кролю у вену (1-2 мл), білим мишам - внутрішньочеревно (0,3-0,5 мл). При наявності токсину кролі гинуть через кілька хвилин, білі миші - через 1,5-3 години. Специфічність токсину визначають у реакції, нейтралізації за допомогою типоспецифічних сироваток. Як свідчать дані таблиці, антисироватка щодо типу A нейтралізує лише гомологічний токсин; типу B - токсини типів A, B, C, D; типу C - токсини типів A, B, C й типу D - токсини типу A і D. За аналогічним принципом можна ідентифікувати також ізольовану культуру *Cl. perfringens*. З цією метою використовують 16-18-годинну бульйонну культуру ізольованого штаму.

**Бактеріологічні дослідження.** Роблять мазки з ураженої нирки і вмісту тонкого відділу кишечника, фарбують за Грамом. При наявності *Cl. perfringens* знаходять грампозитивні, товсті короткі палички із заокругленими кінцями.

**Виділення чистої культури.** Посіви роблять на середовище Кітт - Тароцці, інкубують в умовах термостата 2-3 годин і роблять пересів у пробірки з середовищем Кітт - Тароцці. Після 3-5 таких



пересівів (протягом доби) культури висівають на глюкозо-кров'яний агар у бактеріологічних чашках. Можна робити й інакше. Після первинного посіву на середовище Кітт - Тароцці пробірки прогрівають на водяній бані при температурі 65 °С протягом 10 хв. і інкубують 16-18 годин у термостаті при 33 °С, а потім пересівають на глюкозо-кров'яний агар. Інкубацію здійснюють в анаеробних умовах.

*Cl. perfringens* утворює дрібні колонії з рівними краями і трохи випуклим центром. Спочатку вони мають сіруватий колір, пізніше стають зеленуватими.

### **ЗБУДНИК АНАЕРОБНОЇ ДИЗЕНТЕРІЇ ЯГНЯТ**

Анаеробна дизентерія - гостра токсикоінфекція новонароджених ягнят. Характеризується геморагічним запаленням кишечника, діареєю.

Збудник - *Cl. perfringens* типу В (*Lamb Dysentery bacillus*).

**Бактеріологічна діагностика.** У лабораторію надсилають свіжий труп або перев'язаний з обох боків відрізок ураженого кишечника з вмістом, шматочки паренхіматозних органів, трубчасту кістку.

**Мікроскопія.** У мазках, пофарбованих за Грамом, *Cl. perfringens* - короткі, товсті грампозитивні палички, розміщені поодинокі, попарно або у вигляді коротеньких ланцюжків.

**Виділення чистої культури.** Шматочки тканини з уражених ділянок кишечника вносять у середовище Кітт - Тароцці. Через 3-4 години спостерігаються чіткі ознаки розмноження мікроорганізмів помутніння, газоутворення. Двічі - тричі роблять пересів у пробірки з аналогічним середовищем. З останніх пересівів (після інкубації протягом 3-4 годин) роблять посів на глюкозо-кров'яний агар. Інкубують в анаеробних умовах. Колонії *Cl. perfringens* можуть бути гладенькими (S-форма) або шорсткими (R-форма), інколи - змішаними (O-форма), зеленуватого кольору. Навколо колоній - зона  $\alpha$ -гемолізу.

Ідентифікацію *Cl. perfringens*, визначення токсину, який він виділяє, здійснюють за допомогою типоспецифічних антисироваток в реакції нейтралізації.

Біопробу ставлять на кролях, морських свинках, ягнятах. При введенні матеріалу (внутрішньом'язово, підшкірно) тварини захворюють й гинуть протягом 16-24 годин. При розтині трупів спостерігають картину геморагічного ентериту.

Крім виділення збудника і його ідентифікації, лабораторна діагностика анаеробної дизентерії ягнят передбачає виявлення його

токсину безпосередньо у вмісті кишечника (див. “Збудник анаеробної ентеротоксемії овець”).

### **ЗБУДНИК ПРАВЦЯ**

Правець - гостре інфекційне захворювання тварин і людини. Характеризується високою рефлекторною збудливістю, судомними скороченнями м'язів.

Збудник правця - *Cl. tetani* - представник роду *Clostridium*. Це тоненька грампозитивна рухлива паличка довжиною 4—8 мкм: Утворює спори, які розміщено переважно термінально (рис. 53). Облігатний анаероб. Оптимальна температура вирощування - 37-38 °С, рН 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 слабе газоутворення, характерний запах. З культури роблять мазки й мікроскопують. При наявності сторонньої мікрофлори - прогрівають 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.

Біопробу 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 роз-

чину кухонної солі й залишають на годину при кімнатній температурі. Фільтрують через ватно-марлевий фільтр (можна паперовий). Фільтрат вводять 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.

**Ідентифікація токсину *Cl. tetani*.** Змішують в однаковій кількості фільтрат з протиправцевою сироваткою й витримують протягом 45 хв. у термостаті. Вводять білим мишам або морським свинкам. Якщо тварини не загинули, значить, у фільтраті є токсин.

## **ЗБУДНИК БОТУЛІЗМУ**

Ботулізм — 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 споруюючих клітин - ракеткоподібного вигляду. Збудник - суворий анаероб, продукує сильнодіючий екзотоксин, неоднорідний за антигенною структурою. Розрізняють токсини А, В, С, D, Е та F. Кожний з них нейтралізується лише типоспецифічною сироваткою.

**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 шлунка, відрізки кишок з вмістом, кров.

Проби корму і вміст шлунка ретельно розтирають у ступці зі стерильним піском чи склом, заливають подвійною кількістю ізотонічного розчину кухонної солі й використовують для вияву токсину і виділення збудника.

**Виявлення токсину *Cl. botulinum*.** Підготовлену описаним вище способом 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°C - 30 хв.) матеріалом. При наявності токсину *Cl. botulinum* тварини, яким ввели непрогрітий матеріал, захворюють 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 полівалентними (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..

**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. На агарі утворюються колонії неправильної форми з відростками, навколо яких - зона гемолізу. 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.

### **ЗБУДНИК НЕКРОБАКТЕРІОЗУ**

Некробактеріоз (фузобактеріоз) - інфекційне захворювання з ознаками гнійно-некротичного розкладу тканин. Інколи процес генералізується. При цьому утворюються метастази - некротичні вогнища у печінці, легенях, нирках тощо.

Збудник — *Fusobacterium necrophorum* — поліморфна, нерухлива, неспороутвірنا паличка довжиною 3-5 мкм (у патматеріалі і культурах часто зустрічаються ниткоподібні, довжиною до 30-300 мкм форми).

Грамнегативна. 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. Оптимальна для росту температура - 36-38 °С, рН середовища - 7,4—7,6. Ферментує арабінозу, глюкозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, саліцин з утворенням кислоти і невеликої кількості газу.

**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 фарбують за Грамом. *P. necrophorum* у мазках з патматеріалу має вигляд нитко подібних ланцюжків, фарбується нерівномірно.

**Виділення чистої культури.** Посів матеріалу здійснюють на середовище Кітг - Тароці. Інкубують протягом двох - трьох діб при температурі 37 °С. Збудник зумовлює помутніння середовища. 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 біопробы використовують також білих мишей, вводячи їм 0,3-0,5 мл культури підшкірно. Гризуни гинуть на 6-10-й день.

### **Контрольні питання**

1. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію для діагностики емкару?
2. Морфологія, тинкторіальні й біохімічні властивості збудника.
3. Культуральні властивості збудника.
4. Бактеріологічний метод діагностики емкару.
5. Порівняльна характеристика морфологічних властивостей збудників злякисного набряку.
6. Схема бактеріологічного дослідження злякисного набряку.
7. Принцип ідентифікації збудників злякисного набряку.
8. Біопроба при діагностиці злякисного набряку.
9. Схема бактеріологічної діагностики захворювання.
10. Методика визначення типу токсину *CI. perfringens*.

11. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію для діагностики анаеробної дизентерії?
12. Принцип і схема визначення *Cl. perfringens* і типу її токсину.
13. Морфологія й тинкторіальні властивості *Cl. tetani*.
14. Культуральні властивості збудника правця.
15. Схема бактеріологічної діагностики правця.
16. Характеристика біопроби при діагностиці правця.
17. Суть вияву правцевого токсину у патологічному матеріалі та мікробній культурі.
18. Особливості лабораторної діагностики ботулізму.
19. Методика виявлення ботулінічного екзотоксину.
20. Виділення й ідентифікація *Cl. botulinum*.
21. Морфологія й культуральні властивості *F. necrophorum*.
22. Бактеріологічна діагностика некробактеріозу. Особливості біопроби.

## **ЗАНЯТТЯ 22. ЗБУДНИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ І ПАРАТУБЕРКУЛЬОЗУ**

### **ЗБУДНИК ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників: туберкульозу, паратуберкульозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

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.

Збудник захворювання - *Mycobacterium tuberculosis*. Розрізняють такі його типи: *typus bovinus* - уражує велику рогату худобу; *typus avium* - уражує птицю; *typus humanus (tuberculosis)* - уражує переважно людей. Другорядне значення мають типи, виділені від мишей – *typus murium* і холоднокровних - *typus poykilothermorum*.

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 жиривоскових 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.

Для **бактеріологічної діагностики** 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. Трупі 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. Надосадову рідину 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 ( $10 \text{ см}^3$ ) поміщають у вузькогорлу колбу місткістю  $250 \text{ см}^3$ , додають таку ж кількість 1 % розчину гідроксиду натрію і на шуттель-апараті доводять до однорідної консистенції. Матеріал розводять дистильованою водою у співвідношенні 1 : 9, додають 1-2  $\text{см}^3$  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.

- **Бактеріоскопія.** Із нативного матеріалу, підготовленого для досліджень, готують по два мазки з кожного органа і лімфатичного вузла. Після висушування препарати фіксують полум'ям і фарбують за методом Ціля - Нільсена: карболовий розчин фуксину Ціля (див. додаток) наносять на мазок через смужку фільтрувального паперу і нагрівають протягом 5 хвилин (до пароутворення);

- після остигання залишок фарби зливають, мазок промивють водою;

- препарат обробляють 3 % розчином солянокислого спирту (до  $97 \text{ см}^3$  70 % етилового спирту додають  $3 \text{ см}^3$  концентрованої соляної кислоти) до появи ледь помітного рожевого відтінку;

- 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.

Серед типів збудника туберкульозу існують певні морфологічні відмінності. Зокрема, людський тип представляє собою тонкі прямі або трохи зігнуті палички довжиною 2,5-3,5 та товщиною 0,3 мкм. У зв'язку з виразним поліморфізмом зустрічаються палички більшої до-



вжини з потовщенням на кінці або досить короткі кокоподібні форми. Представники типу *bovinus* значно коротші і товстіші, клітини пташиного типу 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. Збудник культивують в аеробних умовах. Перші ознаки росту з'являються через два тижні і пізніше. На щільних середовищах мікобактерії типу *bovinus* через 20-60 діб утворюють дрібні кулясті колонії кольору слонов'ячої кістки. Колонії типу *humanus* - зморщені, сухі (R-варіант). Інколи зустрічаються гладенькі колонії S-варіанта. Представники пташиного типу 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.

Важливою ознакою, характерною для трьох типів 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 вимог ГОСТ 26Р73-89, 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.

**Метод біологічної проби.** 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 вводять підшкірно в ділянці пахвини в дозі 1-2 см<sup>3</sup> або інтратестикулярно в дозі 0,2 см<sup>3</sup>. 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, а й 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.

Збудник туберкульозу людського і бичачого типів у курей не викликає захворювання і не сприяє появі якихось змін в органах. Пташиний тип зумовлює загибель курей протягом 30 днів. Іноді птиця живе до 90 днів. У внутрішніх органах забитих або загиблих курей знаходять велику кількість сіро-жовтих туберкулів.

Позитивність біопроби у заражених тварин підтверджується також туберкуліновою пробою. Морським свинкам через 30 днів після зараження підшкірно вводять ППД-туберкулін у дозі 26 туберкулінових одиниць в об'ємі 0,1 см<sup>3</sup>. В позитивних випадках через 24-48 годин на місці введення туберкуліну виникає гіперемія шкіри й утворюється ущільнена припухлість діаметром 5 мм, в центрі якої інколи розвивається некроз.

Курам ППД-туберкулін пташиного типу вводять підшкірно в се-режку в дозі 0,1 см<sup>3</sup>, внаслідок чого остання помітно набрякає і збільшується.

## **ЗБУДНИК ПАРАТУБЕРКУЛЬОЗУ**

Паратуберкульоз (паратуберкульозний ентерит великої рогатої худоби) - хронічне захворювання переважно великої рогатої худоби, рідко - овець, верблюдів, кіз та оленів, яке характеризується тривалою стійкою діареєю, потовщенням слизової оболонки кишечника з утворенням поздовжніх і поперечних складок.

Збудник — *Mycobact. paratuberculosis* — короткі палички довжиною 0,5-1,5 і шириною 0,3-0,5 мкм, для яких характерні кислото-, спирто- та лугостійкість. У зв'язку з цим паратуберкульозні бактерії фарбуються за методом Ціля - Нільсена. Збудник не утворює спор і капсул, нерухливий, аероб, за Грамом фарбується позитивно.

При підозрі на паратуберкульоз за життя від тварин відбирають проби фекалій в об'ємі 10 см<sup>3</sup> і беруть зіскрібки з прямої кишки. Від загиблих або забитих з діагностичною метою тварин відбирають 3-5 різних ділянок клубової кишки, 3-4 лімфатичних вузли брижі, шматок ілеоцекальної заслінки з поряд розміщеним лімфовузлом. Проби надсилають у лабораторію свіжими в термосі з льодом або замороженими. Допускається консервування матеріалу 30 % розчином хімічно чистого гліцерину.

Для серологічної діагностики в лабораторію надсилають також проби крові в об'ємі 5-10 см<sup>3</sup>.

При проведенні бактеріоскопічного дослідження слизову оболонку кишечника відмивають від фекалій фізіологічним розчином або водою, зрізають невеличкий шматочок, який розтирають між двома предметними стеклами. Аналогічні мазки готують також з лімфатичних вузлів брижі. Після висушування їх фіксують полум'ям і фарбують за методом Ціля - Нільсена.

Паратуберкульозні бактерії фарбуються у темно-червоний колір, розміщуються скупченнями по декілька паличок або своєрідними рядами (палісадами). Серед кислотостійких бактерій паратуберкульозні мікобактерії найдрібніші, що враховують при мікроскопії препаратів. Звертають також увагу на помітний поліморфізм збудника: поряд з типовими короткими паличками знаходяться палички з розширеним кінцем, розгалужені та кокоподібні форми.

Для виділення чистої культури збудника використовують спеціальні збагачені середовища, а патологічний матеріал піддають спеціальній обробці.

Фекалії розтирають у ступці, змішують з 10 частинами 5 % розчину щавлевої кислоти, ретельно струшують, вміщують на водяну

баню при температурі 37 °С на 20-30 хв., потім центрифугують при 2500-3000 об/хв. протягом 15 хв. Надосадову рідину видаляють, осад промивають стерильним фізіологічним розчином і здійснюють посів у 5-6 пробірок з живильним середовищем Дюбо - Сміта в модифікації Алікаєва. Основа середовища - гідролізат казеїну, інактивована нормальна сироватка крові великої рогатої худоби, аспарагін і суміш мінеральних солей (однозаміщений фосфорнокислий калій, двозаміщений фосфорнокислий натрій, сірчанокислий магній, хлористий кальцій та ін.). Середовище ущільнюють агаром Діфко й додають мікобактин - ростовий стимулюючий фактор, що є спиртовим екстрактом із сапрофітних мікобактерій тимофіївки (*M. phlei*).

Лімфатичні вузли, слизову оболонку кишечника подрібнюють ножицями, заливають 3-6 % розчином сірчаної кислоти і витримують 15 хвилин. Після відмивання стерильним фізіологічним розчином шматочки розтирають до суспензії, яку також сіють у 5-6 пробірок із згаданим вище середовищем і для контрасту - в середовище Левенштейна - Йенсена.

Засіяні пробірки вміщують у термостат при температурі 38 °С і витримують протягом 3-4 місяців. Швидкість росту культури залежить від рівня обсіменіння вихідного матеріалу збудником: при високій його концентрації ознаки росту з'являються через 18-20 днів, слабкій - протягом 3-4 місяців. Колонії сірувато-білі, плоскі, з нерівними краями, які пізніше набувають горбкуватого вигляду.

Для диференціації виділеної культури від збудника туберкульозу посів здійснюють на середовища з мікобактином і без нього. Паратуберкульозні бактерії ростуть тільки при наявності стимулятора, що не характерно для мікобактерій туберкульозу. Крім того, збудник паратуберкульозу для лабораторних тварин непатогенний.

При серологічній діагностиці паратуберкульозу ставлять РЗК. Досліджувану сироватку крові, а також контрольні сироватки в розведенні 1 : 10 інактивують на водяній бані при температурі 61-62 °С протягом 30 хвилин. В реакції використовують спеціальний паратуберкульозний антиген. Тривалість зв'язування комплексу в бактеріолітичній та індикаторній системах - по 20 хвилин. Результати реакції враховують через 16-18 годин перебування пробірок у прохолодному місці. Позитивними вважають ті сироватки, які дають затримку гемолізу не менше ніж на два хрести (+ +), що відповідає 50 % розпаду еритроцитів.

Для масового обстеження тварин на паратуберкульоз застосовують алергічний метод з використанням алергена іоніну або пташиного туберкуліну.

### **Контрольні питання**

1. Біологічні властивості збудника туберкульозу.
2. Основні типи мікобактерій туберкульозу.
3. Які основні критерії диференціації типів мікобактерій туберкульозу?
4. Який матеріал надсилають у лабораторію для бактеріологічної діагностики туберкульозу?
5. Основні етапи бактеріологічного дослідження при туберкульозі.
6. Які середовища застосовують для культивування мікобактерій туберкульозу?
7. Суть біопроби при діагностиці туберкульозу.
8. Характеристика збудника паратуберкульозу.
9. Особливості бактеріологічної і серологічної діагностики паратуберкульозу.

### **ЗАНЯТТЯ 23. ЗБУДНИКИ ЛЕПТОСПІРОЗУ І КАМПІЛОБАКТЕРІОЗУ (ВІБРІОЗУ)**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників лептоспірозу і кампілобактеріозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

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.

Збудник належить до роду *Leptospira*, який об'єднує сапрофітні форми під загальною назвою *L. biflexa* і патогенних представників, що одержали назву *L. interrogans*.

Патогенні лептоспіри зібрано у 18 серологічних груп, серед яких як збудники хвороби найбільш відомі *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*, *L. canicola*, *L. tarassovi*, *L. hebdomadis*.

Лептоспіри - звивисті мікроорганізми довжиною 7-15 і шириною 0,1-0,25 мкм, що мають центральну осьову нитку з “накрученою” навколо неї цитоплазмою. 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.

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. Труп дрібних тварин відправляють цілими, від великих відбирають шматочки паренхіматозних органів, серце, трансудат грудної і черевної порожнин, перикардіальну й спинномозкову рідини, сечовий міхур із вмістом. Дрібні абортвані 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.

**Бактеріоскопічне дослідження.** 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 абортваних 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 40 x 7-10 або 40 x 10-15. 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.

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 відрізнити 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.

**Постановка біопробі.** 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 абортваного 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 пробною 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 лептоспир 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 лептоспир.

**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 лептоспир, 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 лептоспир, що використовуються як антигени, повинні бути віком 5-15 днів, без ознак спонтанної аглютинації, з концентрацією 70—100 лептоспир 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.

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 серотипу лептоспир, то відбудеться аглютинація з утворенням характерних клубочків, “павучків” склеєних лептоспир, які починають розпадатись на окремі фрагменти.

Результат реакції оцінюють у хрестах за чотирибальною системою:

(++++)	аглютиновано	100 %	лептоспир
(+++)	аглютиновано	75 %	лептоспир
(++)	аглютиновано	50 %	лептоспир
(+)	аглютиновано	25 %	лептоспир



(-) аглютинація відсутня.

В контрольних лунках, що містять фізіологічний розчин з культурою лептоспир, 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 дослідженні через 7-10 днів у цих самих тварин наростання титру антитіл повинно бути у п'ять і більше разів.

### **ЗБУДНИК КАМПІЛОБАКТЕРІОЗУ (ВІБРІОЗУ)**

Кампілобактеріоз - 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.

Вібріони, що викликають кампілобактеріоз (вібріоз), мають форму коротких, зігнутих у вигляді коми або літери “S” паличок. Зустрічаються також довгі спірили, які утворюються в результаті утримання зв'язків між окремими клітинами, що розділились. Величина збудника коливається в межах 1,5—7 x 0,3-0,5 мкм. Палички мають джгутик на одному чи обох кінцях, за Грамом фарбуються негативно, не утворюють спор і капсул.

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.

**Лабораторна 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 бугаїв-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.

**Бактеріологічна діагностика** передбачає мікроскопію мазків, виділення культури збудника та її ідентифікацію. 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, і особливо тих, яких лікували, збудник зустрічається у формі довгих спірил, малозвитих ниток і навіть дрібних коків.

Чисту культуру збудника одержують за допомогою напіврідких і щільних живильних середовищ типу напіврідкого 0,15-0,2 % м'ясно-печінкового лептонного агару (ППА), сафраніно-залізо новобіоцинового середовища (СЗН), звичайного МПА, середовища Кітг - 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 ексікатор або мікроанаеростат, в яких 10-15 % кисню замінюють 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.

Нерідко з патологічного матеріалу одночасно з патогенними виділяються й непатогенні вібріони та інші види мікробів. Чисту культуру збудника вібриозу можна виділити двома методами: одержаною сумішшю мікробних культур в дозі 0,5 мл заражають у черевну порожнину або піхву вагітних морських свинок. З абортів можна виділити чисту культуру *Camp. foetus*. При відсутності абортів 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 вібриозної 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 формалінованим (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 вібриозного 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 : бівал ентну - 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 формалізованого 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 попередньо вносять по 0,5 мл формалізованого 3 % розчину кухонної 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 кожную 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 год 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 формалізованого 3%-ного 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.

### **Контрольні питання**

1. Основні серотипи лептоспир.
2. Біологічні властивості лептоспир.
3. Як виявляють лептоспир у патологічному матеріалі?
4. Які середовища використовують для культивування лептоспир?
5. Реакція мікроаглютинації - лізису; її компоненти, техніка постановки, оцінка результатів.
6. Якими клінічними ознаками характеризується кампілобактеріоз (вібріоз)?
7. Види збудника хвороби і його морфологічні ознаки.
8. Диференціація патогенних і непатогенних видів вібріонів.
9. Виділення чистих культур збудника вібріозу.
10. Які методи застосовують при ідентифікації виділених вібріонів.
11. Основні етапи лабораторної діагностики кампілобактеріозу.
12. Які реакції ставлять при серологічній діагностиці захворювання?

### **ЗАНЯТТЯ 24. ЗБУДНИК САПУ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника сапу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості

росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Сап - переважно хронічне інфекційне захворювання однокопитних тварин, для якого характерним є утворення у внутрішніх органах, на слизових оболонках (особливо носової перетинки) та шкірі специфічних вузликів, що розпадаються з утворенням виразок. Хвороба досить небезпечна для людини.

Збудник - *Bact. mallei* (*Pseudomonas mallei*) — дрібна, часто зерниста, грамнегативна паличка, яка не утворює спор і капсул, культивується в аеробних умовах, циліндричної форми, із закругленими кінцями, трапляються загнуті палички довжиною 1-5 і шириною 0,5-0,8 мкм. У біохімічному відношенні мікроб малоактивний: желатину не розріджує, не утворює індолу, повільно коагулює молоко, лактозу і глюкозу ферментує до кислоти без утворення газу.

Діагностика сапу ґрунтується на бактеріологічному, серологічному й алергічному методах дослідження. За життя тварин матеріалом для бактеріологічного дослідження є виділення з виразок, кров, пунктати лімфатичних вузлів, гній з абсцесів. Після забою або загибелі від тварин відбирають уражені ділянки внутрішніх органів, лімфатичні вузли, носову перетинку, трахею, бронхи.

**Мікроскопічне дослідження.** Із патологічного матеріалу готують звичайні мазки, які фарбують за Грамом, Романовським - Гімзою або зрілою синькою Леффлера. Сапні бактерії схильні до поліморфізму, розміщуються окремо, парами або ланцюжками із 4—6 клітин, фарбуються зернисто (крім методу Грама).

**Виділення чистої культури.** Використовують середовище 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 годин утворюються напівпрозорі, гладенькі, середні за величиною колонії з перламутровим блиском, які через деякий час зливаються в загальне ослизле нашарування. У гліцериновому бульйоні виникає помутніння, випадає сірувато-білий слизовий осад, який при струшуванні пробірки піднімається у вигляді полум'я свічки.

Для ідентифікації виділеної культури вивчають її морфологічні, культуральні й біохімічні властивості, сіючи на гліцеринову картоплю, молоко, середовища Гісса з глюкозою, лактозою, сахарозою, мальтозою, манітом. У мазках із МПГА знаходять короткі

грамнегативні палички, часто нитчастої форми, в мазках із бульйону – короткі товсті палички.

Найбільш типовий ріст збудника сапу спостерігається на гліцериновій картоплі: через 48-72 годин утворюються дрібні, напівпрозорі, з жовтуватим відтінком колонії, що після злиття формують “медовий” наліт, колір якого змінюється до буро-коричневого і навіть червонуватого. Остаточну ідентифікацію виділеної культури здійснюють шляхом постановки РА на склі з сапною сироваткою, проте слід мати на увазі, що дана сироватка аглютинує не всі штами збудника.

**Біологічна проба.** Відбирають двох — трьох золотистих хом’яків або самців 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 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 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** ґрунтується на виявленні в сироватці крові хворих тварин специфічних антитіл в реакції зв’язування комплементу (РЗК). Досліджувані сироватки розводять фізіологічним розчином у концентрації 1 : 5 та 1 : 10, інактивують на водяній бані протягом 30 хв. при температурі 58-59 °С для коней і 63-63 °С - для ослів і мулів.

Реакцію ставлять за класичним варіантом й оцінюють за чотирибальною системою в хрестах. За діагностичний титр сироватки приймають розведення 1:10. При затримці гемолізу в цьому розведенні на (++++) і (+++) реакцію вважають позитивною, а при її інтенсивності

на (++) і (+) - сумнівною за умови, що в розведенні сироватки 1:5 спостерігають затримку гемолізу на (++++) або (+++).

РЗК доцільно ставити в період активізації сапного процесу, бо в хронічній стадії вона “виявляє” не більше 20 % хворих тварин. З інших серологічних реакції при сапі інколи ставлять реакції конглютинації, аглютинації та гемаглютинації.

Алергічну діагностику застосовують при масовому обстеженні коней на сап. При цьому тваринам в кон'юнктивальний мішок вводять декілька крапель алергену малеїну (фільтрат вбитої нагріванням культури збудника сапу, вирощеної на гліцериновому МПБ). Позитивна реакція характеризується розвитком слизово-гнійного кон'юнктивіту з набряканням й почервонінням кон'юнктиви. З кутка ока виділяється ексудат у вигляді своєрідного шнурка.

### **Контрольні питання**

1. Коротке визначення сапу.
2. Основні біологічні властивості збудника сапу.
3. Які дослідження проводять при бактеріологічній діагностиці сапу?
4. Особливості серологічної діагностики сапу.
5. Який алерген застосовують при масовому обстеженні тварин на сап?
6. Чому виконання ряду діагностичних робіт можна проводити лише у спеціальних режимних лабораторіях?

### **ЗАНЯТТЯ 25. ЗБУДНИК ДИЗЕНТЕРІЇ СВИНЕЙ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника дизентерії свиней. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Дизентерія - інфекційне захворювання свиней, що характеризується явищами гострого катарального або катарально-геморагічного коліту, який супроводжується слизово-кривавим проносом. Найбільш характерними клінічними ознаками хвороби є діарея й прогресуюче схуднення. Відмічаються спрага, порушення координації рухів.

Збудник захворювання - *Treponema hyodysenteriae* - належить до звивистих форм мікроорганізмів. Величина його - 0,3-0,4 x 8-10 мкм.



Можуть зустрічатись великі (до 20 мкм) і дрібні (до 8 мкм) форми трепонем шириною 0,1 мкм. Кількість завитків залежить від довжини клітини й коливається в межах від 3-4 до 8-12 мкм. Трепонемі активно рухаються, грамнегативні, не утворюють спор і капсул.

Збудник ферментує глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, виділяє індол, не утворює каталази, оксидази, лецитинази, уреазу і сірководню, не розріджує желатину й не редукує нітрати в нітрити.

У більшості випадків дизентерія ускладнюється кампілобактеріями, фузобактеріями, лістеріями, клостридiami, 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*.

Діагноз на дизентерію ставлять, керуючись клініко-епізоотологічними, патологоанатомічними даними й результатами лабораторних досліджень.

Для прижиттєвої діагностики в лабораторію від хворих свиней надсилають фекалії, а від забитих або загиблих - слизову оболонку великої ободової кишки. Проби фекалій беруть стерильним ватним тампоном на паличці з прямої кишки з глибини 7-8 см. Переносять у пробірку з 8-10 мл фізіологічного розчину. Відібрані матеріали транспортують у лабораторію в термостатах з льодом і досліджують протягом 3-4 годин, а в умовах холоду - протягом 6-8 годин.

Лабораторне дослідження на дизентерію зводиться переважно до виявлення трепонем у патологічному матеріалі шляхом його мікроскопії. Зі слизової оболонки кишечника і фекалій окремо готують суспензію на фізіологічному розчині, а з неї - препарати типу "роздавлена крапля". Останні досліджують методом фазового контрасту або в темному полі зору мікроскопа. У позитивних випадках в одному полі зору знаходиться 5-10 і більше середніх і великих трепонем у вигляді рухливих звивистих ниток з гострими кінцями.

Стаціонарні мазки із суспензії патологічного матеріалу фіксують метиловим спиртом, фарбують за методами Романовського - Гімзи, Грама або фуксином Пфейффера. В таких препаратах трепонемі зберігають характерну морфологію, фарбуються відповідно у блідо-синій і червоний кольори.

В лабораторних умовах збудник дизентерії свиней культивується погано. За повідомленнями А. В. Голика і В. В. Бондика (1983), кращим живильним середовищем для трепонем є триптикозо-соевий перевар, до

якого додають 10 % свіжої дефібринованої крові барана або великої рогатої худоби.

На такому ущільненому середовищі трепонеми в процесі росту 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 трепонеми виглядають малорухливими, короткими, із загостреними кінцями, в окремих колоніях зустрічаються тонкі, змієподібні, довгі, із загостреними кінцями форми.

В процесі культивування трепонем на напіврідкому триптикозо-соевому агарі було встановлено їх високу чутливість до тіамуліну, трихополу, диметридазолу, ранідазолу, пеніциліну, феноксиметилпеніциліну, лінкоміцину, ампіциліну, фуразолідону, діарексу.

Є окремі повідомлення про успішне виявлення спірохетоподібних мікроорганізмів у мазках із підслизового шару товстих кишок хворих на дизентерію свиней методом імунофлуоресценції. Перспективною в діагностиці захворювання є реакція аглютинації.

### **Контрольні питання**

1. Визначення дизентерії свиней як захворювання.
2. Збудник хвороби і його біологічні властивості.
3. Які мікроорганізми супроводжують дизентерію свиней?
4. Як проводиться лабораторне дослідження на дизентерію?

## **ЗАНЯТТЯ 26. ЗБУДНИКИ МІКОПЛАЗМОЗІВ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників мікоплазмозів. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Мікоплазми (плевропневмонієподібні організми - ПППО, *Pleuropneumoniae like organisms* — *PPLLO*), виділені у самостійний клас *Mollicutes*, відіграють певну роль в інфекційній патології сільськогосподарських тварин.

## **ЗБУДНИК КОНТАГІОЗНОЇ ПЛЕВРОПНЕВМОНІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

Контагіозна плевропневмонія (інфекційна перипневмонія, повальне запалення легень) великої рогатої худоби характеризується ознаками крупозної пневмонії і плевриту з наступним утворенням анемічних некрозів (секвестрів).

Збудник - *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* (*Mperipneumoniae bovis*, *Asterococcus mycoides*) — поліморфна паличка, що утворює ниткоподібні форми, які поступово розпадаються на гранули розміром 0,3-0,8 мкм. Добре росте на середовищах, виготовлених на основі мартенівського ферментативного гідролізату. Оптимальна температура для вирощування - 38 °С, рН - 7,0-8,0. Ферментує глюкозу, мальтозу, маніт, леульозу, декстрин і крохмаль.

**Бактеріологічна діагностика.** Матеріалом для мікоплазмологічного дослідження є легені, бронхіальний слиз, сеча, молоко, плевральний ексудат, уражені лімфатичні вузли, сироватка крові.

**Мікроскопія.** Готують мазки-відбитки й фіксують спиртом-ефіром. Фарбують за методом Романовського - Гімзи. В результаті виявляють дископодібні й зірчасті форми розміром 0,3-0,8 мкм.

**Виділення чистої культури.** З патологічного матеріалу готують 20 % суспензію на фізрозчині або МПБ, яку центрифугують протягом 5-7 хв. при 1000 об/хв. Надосадову рідину фільтрують крізь мембранні фільтри (№ 1, № 2) або обробляють пеніциліном 100-1000 од/мл, оцтовокислим талієм (кінцева концентрація повинна бути 1 : 1500-1 : 3000). Суспензію з інгібіторами витримують 60 хв. при кімнатній температурі, після чого сіють на мартенівський бульйон та агар з кров'яною сироваткою. При наявності збудника бульйон протягом 2-3 днів трохи каламутніє, на сироватковому агарі формуються коричневого кольору колонії величиною 0,5-1,0 мм.

Біопробу ставлять лише у виключних випадках. Заражають підшкірно телят. При наявності збудника тварини захворюють на 3—7-й день. Температура у них підвищується до 40—41 °С. На місці введення матеріалу утворюється флегмона; регіональні лімфовузли збільшено. Через 2—3 тижні телята гинуть.

Серологічну діагностику контагіозної плевропневмонії здійснюють за допомогою РЗК. Реакцію ставлять загальноприйнятими

методами. При цьому виявляють тварин з хронічним перебігом захворювання, інкубатиків.

### **ЗБУДНИК ІНФЕКЦІЙНОЇ АГАЛАКТІЇ ОВЕЦЬ І КІЗ**

Інфекційна агалактія овець і кіз - інфекційне захворювання, яке характеризується лихоманкою, маститами, артритами, кон'юнктивітами, кератитами.

Збудник - *Mycoplasma agalactiae* - поліморфний мікроорганізм. Величина окремих клітин коливається в межах 0,25-17,5 мкм.

**Бактеріологічна діагностика.** Від хворих тварин в лабораторію надсилають молоко і секрет з вим'я (при агалактії), синовіальну рідину ураженого суглоба, виділення з уражених очей; від загиблих чи забитих з діагностичною метою - шматочки печінки, селезінки, нирку, лімфатичні вузли, уражене око, вим'я, синовіальну рідину, гній з абсцесів.

**Мікроскопія.** Препарати фарбують за методом Романовського - Гімзи. Збудник виявляється у вигляді поліморфних клітин.

**Виділення чистої культури.** Посів здійснюють на мартенівський бульйон та агар з кров'яною сироваткою. Інкубують в аеробних умовах при температурі 37 °С. Ріст збудника повільний. Лише на 5-6-й день після посіву відмічається слабка опалесценція середовища.

На агарі збудник утворює ледь помітні неозброєним оком прозорі колонії, під мікроскопом — типові для мікоплазм: з тоненькою периферією й потовщеною центральною зоною.

**Біопроба.** Матеріалом, звільненим від сторонніх мікроорганізмів, підшкірно або інтрацистернально, заражають овець чи кіз. Клінічні ознаки захворювання розвиваються через 3-14 днів. Цим же матеріалом можна заражати кролів у передню камеру ока. Завчасно останне знеболюють новокаїном. Потім тонкою голкою обережно відсмоктують 0,05-0,1 мл рідини і, не виймаючи голки, вводять 0,1-0,2 мл. При наявності збудника через 5-12 днів розвивається кератит.

### **ЗБУДНИК ЕНЗООТИЧНОЇ ПНЕВМОНІЇ СВИНЕЙ**

Ензоотична пневмонія — інфекційне хронічне захворювання переважно молодих свиней. Характеризується непостійною

лихоманкою, бронхопневмонією, відставанням тварин у рості і розвитку, інколи - виразним схудненням.

Збудник — *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. suisneumoniae* — поліморфний мікроорганізм. Зустрічаються коковидні, зірчасті, ниткоподібні та інші його форми.

**Бактеріологічна діагностика.** В лабораторію надсилають свіжий матеріал: шматочки легенів, трахеї, регіонарні лімфатичні вузли.

**Мікроскопія.** Мазки фарбують за методом Романовського - Гімзи. Збудник виявляється у вигляді поліморфних клітин.

**Виділення чистої культури.** З уражених місць готують 10 % суспензію на фосфатно-буферному фізіологічному розчині (рН 7,2), вносять 500 ОД/мл пеніциліну і 100 ОД/мл стрептоміцину. Суспензію залишають на 12-18 годин при температурі 4 °С. Роблять посіви на МПА, МПБ, Кітт - Тароці і спеціальні напіврідкі середовища для вирощування мікоплазм. Інкубують в аеробних умовах. При відсутності видимих ознак росту здійснюють 3-4 серійних пасажі з інтервалом у 7-10 діб. При появі ознак росту на напіврідкому середовищі здійснюють пересів на спеціальний агар, на якому *M. suisneumoniae* утворює дрібні, типові для мікоплазм колонії. Остаточна ідентифікація збудника можлива шляхом постановки реакції інгібіції росту або іншої серологічної реакції з еталонною сироваткою.

Для діагностики ензоотичної пневмонії свиней застосовують також серологічні методи (РА, РЗК, РИГА тощо).

## **ЗБУДНИК РЕСПІРАТОРНОГО МІКОПЛАЗМОЗУ ПТИЦІ**

Респіраторний мікоплазмоз птиці - інфекційне захворювання курей та індиків. Характеризується ураженням органів дихання.

Збудник - *Mycoplasma gallisepticum* - найменший поліморфний серед мікоплазм відомих видів. В мазках з культури переважають кокоподібні форми. У процесі вирощування на живильних середовищах з'являються кільцеві, кулясті та інші клітини, величина яких коливається в межах 0,07-1,40 мкм.

**Бактеріологічна діагностика.** У лабораторію надсилають свіжі трупи птиці. Для приготування мазків і виділення культури використовують шматочки носових синусів, трахеї, легень, головний мозок.

**Мікроскопія.** Мазки фарбують за методом Романовського - Гімзи. В результаті виявляють коко- та паличкоподібні форми збудника.

**Виділення чистої культури.** Із перелічених тканин готують суспензію на ізотонічному розчині кухонної солі (1 : 10). До неї додають 500 ОД/мл пеніциліну і ацетат талію (до концентрації 1 : 2000 - 1 : 4000). Суспензію залишають при кімнатній температурі на 35-40 хв. і 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.

На твердих середовищах *M. gallisepticum* утворює дрібні (0,1-0,6 мм) округлі прозорі колонії.

Біопробу ставлять для визначення патогенності виділених штамів. Заражають курячі ембріони 9-добового віку на хоріоналантаїсну оболонку, вводячи 0,25 мл бульйонної культури. Інкубують при температурі 38 °С і щоденно овоскопують. При наявності збудника з виразною вірулентністю ембріони через 48 годин 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.** Ставлять РА з кров'ю або кров'яною сироваткою (ККРА і СКРА). Використовують антиген біофабричного приготування. Кров у птиці беруть до або через 5-6 годин 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 старших.

### **Контрольні питання**

1. Структурні особливості мікоплазм.
2. Принцип лабораторної діагностики мікоплазмозів.

## **ЗАНЯТТЯ 27. ЗБУДНИК ХЛАМІДІОЗУ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудника хламідіозу. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні

методи діагностики.

Хламідіоз - хронічне інфекційне захворювання сільськогосподарських і диких тварин багатьох видів, яке у більшості випадків перебігає латентно. При активізації збудника, особливо за первинного виникнення, захворювання характеризується абортами чи народженням нежиттєздатного приплоду, пневмонією, ентеритом, кон'юнктивітом, артритом, ураженням центральної нервової системи у молодняка, орхітами, уретритом у плідників. У людини хламідії зумовлюють трахому, венеричну лімфогранульому, уrogenітальну інфекцію, орнітоз.

Збудник - представник роду *Chlamydia*, який об'єднує два основних види: *Chid. psittaci*, *Chi. trachomatis*. Належить до бактерій - внутрішньоклітинних облигатних паразитів, що мають кулясту або овальну форму, діаметром 0,3-1,5 мкм, не утворюють спор і капсул, за Грамом фарбуються негативно. Культивуються тільки в живих чутливих клітинних системах: організмі тварин, у курячих ембріонах, що розвиваються, деяких клітинних культурах.

Діагностика хламідіозу комплексна й ґрунтується на клініко-епізоотологічних, патологоанатомічних даних з обов'язковим проведенням лабораторних досліджень, які передбачають виявлення хламідій у первинних матеріалах, виділення культур збудника і його ідентифікацію, виявлення специфічних антитіл у сироватці крові.

При підозрі на хламідіоз у лабораторію надсилають геморагічні ділянки плодових оболонок, паренхіматозні органи, сечовий міхур абортіваних плодів, виділення з родових шляхів маток після абортів чи патологічних родів, сперму плідників. При наявності у хворих тварин кон'юнктивіту зіскрібки з кон'юнктиви беруть затупленим очним скальпелем після анестезії 0,5 % розчином дикаїну. З одержаного матеріалу готують мазки, які фіксують сумішшю Никифорова, абсолютним метиловим спиртом або холодним абсолютним ацетоном.

Патматеріал транспортують у лабораторію в термосі з льодом. При відсутності можливості швидкого пересилання матеріал консервують середовищем: № 199 з 5 % фетальної сироватки великої рогатої худоби або сахарозо-фосфатний буферний розчин з 5-10 % тієї ж сироватки. В обох випадках додають стрептоміцин (100-200 мкг/мл), ністатин (25) і канаміцин (100 мкг/мл). Інша комбінація антибіотиків така: гентаміцин - 20 мкг/мл, ністатин - 25, ванкоміцин - 100 мкг/мл; рН середовища - 7,0-7,1.

**Бактеріологічна діагностика.** Із патологічного матеріалу, особливо з плаценти маток, що абортували, готують звичайні мазки або мазки-відбитки, які 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 (рН 7,2) додають 3-4 краплі маточного розчину фарби, вертикально опускають фіксовані мазки і витримують їх при кімнатній температурі протягом 20-24 годин. Після промивання дистильованою водою препарати диференціюють підкисленим етанолом близько 10 с, знову промивають, висушують і досліджують з використанням світлового мікроскопа.

Елементарні тільця хламідій - червоно-фіолетові, проміжні форми набувають фіолетового кольору. Хламідії розміщуються у цитоплазмі уражених клітин компактними скупченнями, а також за межами клітин

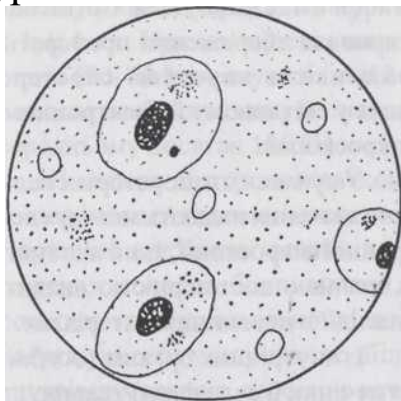


Рис 11. Тільця хламідій з локалізацією в цитоплазмі клітин та за їх межами. Імерсія

поодинокі, парами, скупченнями різної величини, інколи - по чотири (рис.11).

**Фарбування акридиновим оранжевим.**

Мазки фіксують рідиною Корнуа протягом 5 хв., дворазово відмивають фосфатно-цитратним буфером (рН 3,8) по 3—4 хв. й обробляють розчином акриди нового 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.

**Імунофлуоресцентний метод.** Ефективним є застосування прямого і непрямого методів імунофлуоресценції. У зв'язку з дефіцитом діагностиків для прямого методу з метою виявлення хламідій у різних видів тварин використовують імунні глобуліни проти хламідій овечого й козячого походження.

При прямому методі на мазки, фіксовані холодним ацетоном, наносять робочий розчин хламідійної флуоресціюючої сироватки, міченої ФІТЦ, і витримують у термостаті при температурі 37 °С протягом 45 хвилин. 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.

Елементарні тільця хламідій і скупчення їх проміжних форм світяться яскравим зеленим світлом на темно-сірому фоні препарату (рис. 12).

Останніми роками в процесі діагностики хламідіозу широкого застосування набув імунопероксидазний метод (для виявлення збудника і його антигена, визначення наявності специфічних антитіл у досліджуваних пробах сироватки крові). Безперечною перевагою цього методу є стабільність фарбування антигенів і тривале збереження препаратів, можливість кореляції спостережень у світловому й електронному мікроскопах.



Рис. 12. Виявлення хламідій методом імунофлуоресценції: а - тільця хламідій в клітинах печінки абортіваного плода свині; б - тільця хламідій в клітинах селезінки поросяти. РІФ. Гомаль. 3. Імерсія

У сучасних лабораторіях великого значення надають методу електронної мікроскопії, який дає змогу із значною достовірністю виявити хламідії в первинних матеріалах. Із внутрішніх органів (особливо печінки й селезінки) тварин, що підозрювались 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 грам негативних 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 %), яку звільняють від грубих часток і центрифугують при 3000 об/хв. протягом 30 хвилин. До надосадової рідини додають стрептоміцин і гентаміцин (орієнтовно 8-10 мг/мл), роблять посів на бактеріальні середовища. Якщо одержаний матеріал буде звільнено від бактерій і грибів, то 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. У наступних пасажах ембріони гинуть інтенсивніше (на 4—6-й день летальність у середньому досягає 100 %).

В мазках зі стінки 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. Звертає на себе увагу значне збільшення селезінки у тварин. У 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.

**Серологічна діагностика.** Сироватку крові тварин досліджують за допомогою РЗК з хламідійним антигеном. Сироватки від свиней рекомендують досліджувати в інгібіторній РЗК. Титри антитіл у межах 1:8-1:16 свідчать про латентний перебіг хвороби, а 1 : 32 — 1 : 128 — про активну фазу хламідіозу. У окремих тварин антитіла можна виявити у розведеннях сироваток 1 : 512 і вище.

## **ЗАНЯТТЯ 28. ЗБУДНИКИ РИКЕТСІОЗІВ**

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників рикетсіозів. Провести мікроскопію пофарбованих препаратів і замалювати виявлені форми мікробів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Рикетсії - дрібні мікроорганізми, які разом із хламідіями належать до облигатних внутрішньоклітинних паразитів (клас *Microrotatobiotetes*, сімейство *Rickettsiaceae*). Рикетсії паличкоподібної, кулястої та ниткоподібної форми. Довжина клітин - 0,3-2,5, ширина - 0,2-0,3 мкм.

Існування рикетсій у природі підтримують членистоногі (воші, кліщі, блохи тощо), які фігурують як основні переносники мікробів, причому виникнення рикетсіозів у більшості випадків пов'язане з укусами членистоногих. Рикетсії культивують в організмі вошей і кліщів, в епітеліальних клітинах жовткового міхура курячих ембріонів, що розвиваються, в клітинних культурах.

**Лабораторна діагностика.** 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 % лимонною, 0,05 % сірчаною або 0,15 % оцтовою кислотами, промивають водою і дофарбовують 0,5 % розчином метиленового синього протягом 10—20 с, знову промивають водою і висушують. Рикетсії набувають червоного кольору, фон мазка, клітини патологічного матеріалу - світло-синього.

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 ряді випадків (при діагностиці Ку-гарячки, гідроперикардиту жуйних тощо) ставлять біопробу на морських свинках, хом'яках, ховрах. Після забою у внутрішніх органах тварин, особливо в печінці і селезінці, знаходять рикетсії.

**Експрес-метод діагностики** рикетсіозів здійснюють методом імунофлуоресценції, який дає змогу швидко й надійно виявити збудника у патологічному матеріалі. Рикетсії за рядом ознак подібні до хламідій, у зв'язку з чим подано критерії їх диференціації (див. табл. 4).

**Таблиця 4**

**Ознаки диференціації рикетсій**

Показник	Рикетсії	Хламідії
Форма і величина клітин	Паличко-, кокоподібні, нитчасті (0,3 x <sup>x</sup> 2,5-0,2-0,3 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 тілень в ініціальні (ретиккулярні), бінарний поділ проміжних форм, розмноження бинарним способом або внутрішньою фрагментацією, зворотний розвиток до елементарних тілень
Метаболічна активність	Виробляють аденозин-трифосфат, містять цитохром, позцпліють глутамат	Не виробляють і не використовують макроергічні сполуки, не мають цитохрому

Наввіість 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)

### Контрольні питання

1. Які захворювання у тварин викликають хламідії?
2. Яка різниця між бактеріями, вірусами й хламідіями?
3. Загальна характеристика хламідій.
4. Етапи досліджень, які проводяться при лабораторній діагностиці хламідіозів.
5. Чому хламідії не культивуються на бактеріальних середовищах?
6. Біологічні особливості рикетсій.
7. Чому рикетсії тривалий час існують у природі і що цьому сприяє?
8. Як здійснюється лабораторна діагностика рикетсіозів?

### ЗАНЯТТЯ 29. ЗБУДНИКИ МІКОЗІВ

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників мікозів. Провести мікроскопію препаратів і замалювати виявлені форми грибів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Мікозами називають інфекційні захворювання грибної етіології, при яких достовірно встановлено паразитичне існування в організмі гриба - збудника хвороби. У ветеринарії найбільш поширеними є дерматомікози (трихофітія, мікроспорія, фавус), мікози, що викликаються аспергілами, пеніцилами, мукоровими грибами, кандидами, актиноміцетами.

### ЗБУДНИКИ ДЕРМАТОМІКОЗІВ

Дерматомікозами називають заразні хвороби тварин, птиці і риб багатьох видів, які характеризуються ураженнями шкіри та її похідних. Відповідно до збудників — незавершених грибів — розрізняють трихофітію, мікроспорію і фавус (паршу), які тривалий час були відомі під загальною назвою “стригучий лишай”.

**Трихофітія** - інфекційне захворювання тварин і людини, яке характеризується запальною реакцією шкіри і може перебігати у трьох клінічних формах: дисемінованій, плямистій і везикулярній.

Збудники захворювання - гриби із роду *Trichophyton*. Зокрема, *T. verrucosum*, *T. faviforme* є основним збудником трихофітії у великої рогатої худоби, буйволів, зебу, оленів. У інших видів тварин захворювання зумовлюють *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *T. gallinae*.

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 вміщують у стерильні пробірки або бактеріологічні чашки.

*Мікроскопічне дослідження.* Частину надісланого матеріалу перед мікроскопією освітлюють 10—20 % розчином їдкового калі або натру при слабкому підігріванні над полум'ям спиртівки. Кірочки, лусочки з шерстинками переносять на предметне скло, розрівнюють препарувальними голками, додають краплю спирту-гліцерину, накривають покривним склом і досліджують під малим і середнім збільшеннями мікроскопа.

В уражених шерстинках гіфи міцелію трихофітонів - прямі, з перетинками, розміщуються повздовжними рядами. При розпаді міцелію утворюються одноклітинні круглі або овальні спори, які розміщуються в шерстинці ланцюжками, а в її основі формують своєрідний чохол (рис. 13).

*Культуральні властивості.* Гриби з роду *Trichophyton* - аероби, культивуються на спеціальних живильних середовищах типу сусло-агар, агар Сабуро та ін. при оптимальній температурі 25-28 °С. Ріст грибів повільний, колонії з'являються на 10—30-й день після посіву. Колонії *T. verrucosum* щільні, складчасті, піднімаються над середовищем, сірувато-білого кольору. *T. mentagrophytes* росте швидше й утворює колонії рівні, плоскі, з характерним ущільненням у центрі. У *T. equinum* колонії бархатисті, білого кольору, з радіальними заглибленнями. Протилежний бік колонії забарвлений у жовтий колір.



Рис. 13. Ланцюжки спор збудника трихофітії в ураженому волоссі

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.

**Мікроспорія** найчастіше зустрічається у коней, котів, собак, свиней, кролів, хутрових звірів, лабораторних, а також деяких диких тварин. Дуже небезпечна для людини. Плямиста і дисемінуюча 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.

Збудники захворювання - гриби із роду *Microsporum*. У коней основний збудник - *M. equinum*, рідше - *M. canis*, інколи - *M. distortum*; у хутрових звірів, котів і собак захворювання викликають *M. canis*, *M. lanosum*, свиней — *M. populi*.

Діагноз мікроспорії комплексний і ґрунтується на клініко-епізоотологічних даних та результатах лабораторних досліджень. Для мікроскопії беруть лусочки, кірочки з уражених ділянок із залишками шерстинок. Матеріал обробляють і досліджують аналогічно трихофітії. В уражених шерстинках знаходять прямі, розгалужені гіфи міцелію з рідкими перетинками. При розпаді останнього утворюються округлі одноклітинні спори, що розміщуються хаотично.

Для виділення чистої культури посів із матеріалу здійснюють переважно на сусло-агар і середовище Сабуро. Представники роду *Microsporum* ростуть швидко. Колонії починають формуватись уже на 5-й день. Вони мають округлу форму, білий або сіруватий колір,

зморщену поверхню, інколи - з радіальними борозенками. Зворотний бік колонії - жовтого або червоного кольору.

При *мікроскопічному дослідженні* виділених культур виявляють розгалужений міцелій із септами, у деяких видів - з ракетоподібними потовщеннями. Іноді знаходять велику кількість макроконідій із заокругленими кінцями й декількома перетинками, хламідоспори та мікроконідії.

Люмінесцентний аналіз досить важливий при дослідженні матеріалу, відібраного від тварин з атиповим перебігом захворювання. Суть методу зводиться до того, що шерстинки, уражені грибами із роду *Microsporum*, здатні зумовлювати яскраво-зелене світіння в ультрафіолетових променях. При цьому досліджуваний матеріал у бактеріологічних чашках опромінюють ртутно-кварцевою лампою ПРК-2 із світлофільтром УСФФЗ (фільтр Вуда).

При диференціації трихофітії від мікроспорії звертають увагу на ланцюжкове розміщення спор у першому випадку і хаотичне - в другому. Спори збудників трихофітії не світяться в ультрафіолетових променях. Враховують також культуральні й морфологічні властивості представників обох родів.

**Фавус** (парша) - інфекційне захворювання птиці, рідко - ссавців, а також людини, яке характеризується ураженням шкіри, пір'я, кігтів, волосся, внутрішніх органів. У природних умовах найчастіше хворіють кури, качки, індики. На гребені й сережках птиці з'являються невеличкі плями, які, зливаючись, утворюють сірувато-білі зони, вкриті кірочками (скутулами). Через деякий час гребінь і сережки вкриваються товстим нашаруванням, яке важко відділяється. В інших місцях біля основи пір'їн утворюється чохол із спор збудника, внаслідок чого пір'я випадає. Збудники захворювання - гриби із роду *A.cho-rion* (син. *Trichophyton*), зокрема *A. gallinae*, *A. quinckeanum*, *A.Scho-nleini*). Останній є збудником хвороби у людини.

При мікроскопії препаратів із патологічного матеріалу знаходять тонкий міцелій з рідкими септами, в гіфах якого видно прямокутні клітини з двоконтурною оболонкою. Спори розміщені рядами або групами, мають округлу або багатогранну форму, діаметром 4-8 мкм. Гіфи гриба розміщуються вздовж пір'їн і часто оточені пухирцями повітря. Кінці гіфів мають веретеноподібні утворення.

Для культивування представників роду ахоріон використовують ті ж середовища, що й для інших грибів. На агарі Сабуро *A. gallinae* утворює гладенькі білі колонії, які пізніше набувають рожевого чи



червоного кольору, робляться складчастими й борошністими. Діаметр зрілих колоній - близько 12 мм.

### **ЗБУДНИКИ ЦВІЛЕВИХ МІКОЗІВ**

**Аспергільоз** - інфекційне захворювання птиці, рідше ссавців, яке характеризується ураженням органів дихання і супроводжується кон'юнктивітами, нервовими явищами, ознаками бронхіту і пневмонії.

Збудники захворювання - плісеневі гриби із роду *Aspergillus*. Зустрічаються переважно *A. fumigatus*, *A. flavus* рідше збудниками можуть бути *A. niger*, *A. nidulans*.

У зовнішньому середовищі аспергіли живуть як сапрофіти, однак при проникненні в ослаблений організм "перебудовуються" на паразитичний спосіб життя. Перебуваючи в тканинах, гриби продукують протеолітичні ферменти та ендотоксин, який зумовлює гемолітичну і токсичну дію. Присутність гриба в уражених тканинах, а також виникаюча загальна інтоксикація, перетворюють аспергільоз в аспергілотоксикоз.

При порушенні умов утримання птиці аспергіли проникають в яйця, що призводить до їх псування. При інкубації значна частина ембріонів гине.

Діагностика захворювання комплексна: враховують клінічні ознаки, патологоанатомічні зміни й обов'язково результати лабораторних досліджень. У лабораторію надсилають цілі трупи птиці або уражені повітроносні мішки, легені, в яких на розрізі знаходять нещільні сірі вузлики діаметром близько 1 мм. При генералізованій формі вузлики (гранульоми) знаходять у печінці, селезінці та серцевих м'язах.

Із патологічного матеріалу готують препарати, в яких знаходять гіфи знебарвленого міцелію.

Для виділення чистої культури збудника з уражених органів асептично вирізають шматочки з гранульомами, які розкладають на поверхню агару Чапека, середовища Сабуро, звичайний і кров'яний МПА (рН 5,5-6,5). Засіяні таким способом чашки інкубують в аеробних умовах при температурному оптимумі 20—35 °С.

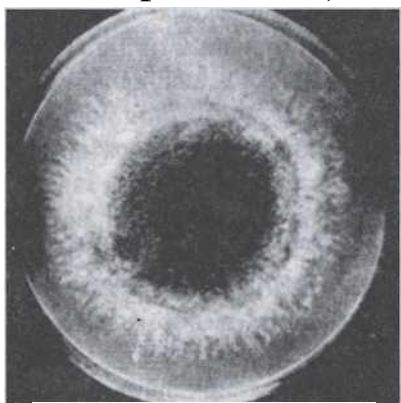


Рис. 14. Колонія *A. flavus* на агарі Чапека

Колонії *A. fumigatus* - бархатисті, рівні або шорсткуваті, спочатку білого, потім - майже чорного кольору. В препаратах знаходять короткі, без септ конідієносці, які закінчуються



колбоподібним розширенням з радіально розміщеними стеригмами й ланцюжками конідій на них. Субстратний міцелій має перетинки.

Колонії *A. niger* темно-коричневого кольору. *A. flavus* утворює дрібнозернисті колонії зеленувато-жовтого кольору (рис. 14).

Патогенність виділених культур підтверджується біопробою. Внутрішньовенно кролям, морським свинкам і білим мишам вводять суспензію спор гриба в дозі 500 тис. — 1 млн спор. У піддослідних тварин розвивається генералізована форма аспергільозу з гранулематозним ураженням внутрішніх органів.

**Мукормікоз** (фікомікоз) - інфекційне захворювання тварин і людини, при якому у внутрішніх органах, тканинах, лімфовузлах розвиваються жовтуваті гранульоми, а в ротовій порожнині, стравоход та шлунку утворюються виразки.

Збудники хвороби - нижчі гриби *Mucor racemosus*, *M. pusillus*, *Rhizopus nigricans*, *Hyphomyces destruens* та ін.

Для підтвердження діагнозу в лабораторію надсилають уражені органи з гранульомами, некротичну тканину із виразок, ексудат, гнійно-некротичну масу з вузликів, що розпалися.

Із патологічного матеріалу, який попередньо витримують у 20 % розчині їдкою калі протягом 10-15 хвилин, готують препарати. В позитивних випадках знаходять широкі гіфи міцелію без септ, які проростають у тканину.

Для виділення чистої культури збудника стерильно вирізані шматочки уражених тканин розкладають на поверхні агару Чапека або інших щільних середовищах для грибів.

*M. racemosus*, який найчастіше фігурує як збудник мукормікозу, утворює пухнасті, блідо-коричневі, згодом — темно-коричневі колонії. У препаратах помітно трохи звивисті спорангієносці з овальним спорангієм на кінці, заповненим спорангіє спорами.

Із лабораторних тварин до збудників мукормікозу чутливі кролі, миші, морські свинки.

### **ЗБУДНИК КАНДИДАМІКОЗУ**

Кандидамікоз (моніліоз, молочниця, поверхневий бластомікоз) - захворювання багатьох тварин і людини, при якому уражуються слизові оболонки шлунково-кишкового тракту з утворенням білуватих зернистих нашарувань. У внутрішніх органах формуються білі розм'якшені вузлики.

Збудники захворювання - дріжджоподібні гриби з роду *Candida* - переважно *C. albicans*, рідше - *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. slofii*. Досить

поширені в природі, існують на слизових оболонках здорових тварин на фоні зниження стійкості організму проти захворювання, особливо при різних травмах слизових оболонок зумовлюють запальний процес.

Представники роду *Candida* - одноклітинні організми, які при поділі утворюють псевдоміцелій та міцелій, мають бластоспори, гломерули, псевдоконідії. Від дріжджів відрізняються тим, що не формують плодових сумок (аск). Діаметр клітин залежно від їх зрілості коливається в межах від 3-5 до 5-9 мкм.

**Діагностика** захворювання ґрунтується переважно на даних лабораторних досліджень, для проведення яких використовують зскрібки нашарувань із слизових оболонок ротової порожнини й шлунково-кишкового тракту, молоко з уражених часток вим'я корів, частини внутрішніх органів з вузликами.

Із патологічного матеріалу готують мазки, які досліджують непофарбованими, а також після фарбування за Грамом, Цілем - Нільсенем, Романовським - Гімзою. В препаратах знаходять короткі нитки псевдоміцелію, який формується за рахунок поділу 2-4 клітин. Зустрічається також переплетений справжній міцелій із септами. В інших полях можна виявити овальні, подібні до дріжджів клітини, що брунькуються.

**Чисту культуру** збудника одержують посівом патологічного матеріалу на середовище Сабуро, пивне сусло, МПА з вмістом 2 % глюкози, картопляний і кукурудзяний агарі тощо.

Гриби роду *Candida* добре ростуть в аеробних умовах при температурі 25-30 °С. На щільних середовищах утворюють S- і R-колонії сірувато-білого або кремового кольору, що врастають у субстрат. Діаметр колоній на 10-12-й день після посіву досягає 1 см. На рідких середовищах випадає щільний осад, утворюється пристінне кільце.

Патогенність виділених культур підтверджують біопробою. Білих мишей заражають у черевну порожнину, кролів - у вену. В позитивних випадках тварини хворіють, у їх внутрішніх органах утворюються вузлики, що підлягають казеозному розпаду. Із патологічного матеріалу лабораторних тварин виділяється культура збудника, а в мазках виявляються його характерні форми.

### **ЗБУДНИК АКТИНОМІКОЗУ**

Актиномікоз - хронічне захворювання тварин, яке характеризується гранулематозним ураженням з некротичним розпадом

різних органів і тканин. Найчутливіша до актиномікозу велика рогата худоба, менш чутливі свині, вівці, кози та коні. Зрідка хворіють люди.

У великої рогатої худоби уражаються переважно підщелепні лімфовузли, кістки щелепи з утворенням ущільненої пухлини - актиномікоми. У коней найчастіше уражаються сім'яний канатик, холка, нижня щелепа. У свиней поширений актиномікоз вим'я.

Збудник захворювання — *Actinomyces bovis* (*Nocardia bovis*, *Streptothrix bovis*) - належить до класу *Actinomycètes*, порядку *Actinomycetales*, родини *Actinomycetaceae*, роду *Actinomyces*.

**Лабораторна діагностика** передбачає мікроскопічне дослідження гною, що виділяється із актиноміком, а також гранулематозних тканин, в яких знаходять дрібні сіруваті зерна - друзи. Ці структури промивають дистильованою водою, переносять на предметне скло в краплю 10-20 % лугу, трохи підігривають або витримують у лузі протягом 15 хв., наносять краплю 50 % гліцерину, накривають покривним склом. Під малим збільшенням мікроскопа друза має такий вигляд: від ущільненого гомогенного центру, здатного розпадатись, радіально розходяться променеві колбоподібні утворення (рис. 22). При середньому збільшенні можна помітити тонкий переплетений міцелій без перетинок.

**Виділення чистої культури** збудника рідко закінчується успіхом. Кількість позитивних випадків — 5-50 %. Патологічний матеріал відбирають асептично, промивають стерильним фізіологічним розчином, центрифугують. Осад сіють на спеціальні м'ясні середовища, збагачені кров'яною сироваткою, декстрозою, гліцерином, глюкозою. Збудник культивується як в анаеробних, так і в аеробних умовах при температурі 37 °С (рН середовища - 7,3-7,6). Величина колоній коливається в межах від 0,5 до 3,0 мм. Колонії нагадують округлі грудочки білуватого кольору.

В мазках із колоній актиноміцетів, пофарбованих за Грамом, виявляють довгі, темно-синього кольору палички, які розміщуються підкутом одна до одної (у вигляді римської п'ятірки). В аеробних умовах збудник формує колонії величиною до 4 мм, зі втиснутими в агар краями і нерівною поверхнею, які складаються з довгого міцелію без септ, здатного позитивно фарбуватись за Грамом. В біохімічному відношенні *A. bovis* — слабоактивний, ферментує до кислоти без утворення газу глюкозу, левульозу, галактозу, гліцерин, розріджує желатину.

## Контрольні питання

1. Які захворювання називають мікозами?
2. Основні збудники дерматомікозів.
3. Який патологічний матеріал надсилають у лабораторію при уточненні діагнозу на трихофітію?
4. Як диференціюють збудників трихофітії та мікроспорії?
5. Культуральні властивості збудників дерматомікозів.
6. Збудники цвілевих мікозів.
7. Якими ознаками супроводжується аспергільоз?
8. Які дослідження проводять при лабораторній діагностиці аспергільозу?
9. Морфологія аспергілових грибів.
10. Що таке мукормікоз?
11. Як діагностують мукормікоз у лабораторії?
12. Яке захворювання викликають дріжджоподібні гриби роду *Candida*?
13. Який патологічний матеріал досліджують на кандидамікоз?
14. Культуральні властивості збудника кандидамікозу.
15. Як клінічно перебігає актиномікоз?
16. Що таке друзи і яке вони мають значення при діагностиці актиномікозу?

## ЗАНЯТТЯ 30. ЗБУДНИКИ МІКОТОКСИКОЗІВ

**Мета заняття:** Вивчити морфологічні, культуральні, біохімічні і інші властивості збудників мікотоксикозів. Провести мікроскопію препаратів і замалювати виявлені форми грибів. Охарактеризувати збудників за схемою: назва, морфологія, особливості росту, біохімічні властивості, поширення. Специфічні методи діагностики.

Мікотоксикозами називають захворювання, які виникають у тварин внаслідок поїдання ними кормів, уражених токсичними грибами, причому останні в організмі у більшості випадків не приживаються. Найбільш поширені аспергіло-, фузаріотоксикози, стахіботріотоксикоз, дендродохіотоксикоз.

Мікотоксикози зустрічаються практично у всіх 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.

Основний метод діагностики мікотоксикозів - лабораторний. При цьому проводять мікологічні дослідження, спрямовані на виділення з корму токсиноутворюючих грибів та їх ідентифікацію, а також токсикологічні дослідження, мета яких - виявлення в кормах мікотоксинів, визначення їх природи і концентрації.

В лабораторію надсилають пробу корму масою 1-2 кг. Із зерна беруть не менше трьох проб 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. Маса проби соковитих кормів повинна бути в межах 0,5-1,0 кг, грубих - 100-200 г. Ці проби також відбирають із середнього зразка відповідного корму. Зернові корми та їх різновиди поміщають у скляні банки, які герметично закривають. У поліетиленових пакетах проби швидко псується. Грубі корми загортають у папір.

Перший етап досліджень передбачає проведення органолептичного аналізу для визначення кольору і запаху корму, після чого визначають його токсичність. З цією метою ставлять біопробы на кролях, акваріумних рибках гуппі, білих мишах, в деяких випадках - на сільськогосподарських тваринах.

**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-х годин. Після фільтрації розчинник повністю випарюють, а нашарування, що залишилось, розчиняють у невеликій кількості ефіру. Одержану рідину наносять на вистрижену поверхню шкіри кроля (площею 6 x 6 см) дворазово, з інтервалом у 24 години. 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 слаботоксичним. Якщо ж названі ознаки різко виражені, а після набряку на шкірі з'являються тріщини аж до некрозу з утворенням виразок, то корм вважають високотоксичним. Недоліки проби: виявляють лише дерматоцидні властивості токсину, а не загальну його токсичність; велика тривалість виконання (10-12 діб); значні матеріальні витрати, пов'язані з використанням великої кількості кролів (на одній тварині можна

перевірити не більше чотирьох проб). 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 відповідної проби 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 годин. Якщо за цей час загине одна рибка, корм вважають нетоксичним, при загибелі 3-4 особин - слаботоксичним і при загибелі усіх рибок - токсичним.

**Проба на білих мишах.** Досліджуваний корм згодують 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.** 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 із уражених соломинок скальпелем або лезом безпечної бритви зіскрібають міцеліальну масу гриба на предметне скло, додають краплю спирту-гліцерину, накривають покривним склом і 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.

## **ЗБУДНИКИ АСПЕРГІЛО-І ПЕНІЦИЛІОТОКСИКОЗІВ**

Аспергілотоксикози - надзвичайно поширена група мікотоксикозів, зумовлених токсинами грибів із роду *Aspergillus*. Власне аспергілотоксикоз викликають гриби *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. niger*. Захворювання супроводжується пригніченням, салівацією, м'язовим тремтінням, гіперемією слизових оболонок. У корів і свиней можливі аборти, у овець - ознаки ураження центральної нервової системи.

**Афлатоксикози** виникають після поїдання кормів, уражених грибами *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ruber*, *Penicillium cirinum*, *P. variable* та ін. Розрізняють декілька типів афлатоксинів, зокрема, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> та їх похідні. Це - складні органічні сполуки групи біс-фуранкумаринових метаболітів. Під дією ультрафіолетових променів афлатоксини інтенсивно світяться, що дає змогу виявити їх у низьких концентраціях. Деякі з цих сполук виводяться з молоком (афлатоксин М<sub>1</sub>). Розчиняються у хлороформі, метанолі, гірше - у воді.

Афлатоксини нагромаджуються у зернових кормах, насінні бавовнику при їх зберіганні у приміщеннях з відносною вологістю повітря 84 % і вище або за умови недостатнього вентилявання. Вони згубно діють на клітини печінки, в яких порушується синтез нуклеїнових кислот і білків, розвивається жирова й білкова дистрофія, що завершується відмиранням гепатоцитів.

**Охратоксикоз** - отруєння, що виникає після згодовування тваринам кормів, уражених грибами *A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *P. viridicatum*.

Охратоксини найчастіше нагромаджуються у вівсяному сінажі, силосі, соняшниковому лушпинні, сінному борошні. Найбільш токсичний - охратоксин А. Це - безбарвна кристалічна сполука, яка розчиняється в органічних розчинниках, досить термостабільна (температура плавлення залежно від стану речовини - 134-218 ° С).

В організмі уражених охратоксинами тварин розвиваються дистрофічні зміни (в епітеліальних клітинах, внутрішніх органах). У телят можливий фібринозний перитоніт, крововиливи на епікарді, некроз клітин печінки.

**Рубратоксикоз** зумовлюють токсини, виділювані грибами роду *Penicillium*, зокрема, *Penicillium purpurogenum*, *P. rubrum*. Рубратоксини поділяють на групи А, В і С. Перші дві - сполуки темно-кори-чневого кольору, остання — світлого. Всі вони мають властивості органічних кислот. Найбільш токсичний рубратоксин С, який в дозі 1-2 мг/кг при

введенні у вену зумовлює загибель морських свинок і кролів через 8-24 години.

Із сільськогосподарських тварин до рубратоксинів найчутливіші свині, які при високій концентрації токсину можуть раптово, без появи клінічних ознак, загинути. Одними з перших уражаються поросята-сисуни, бо токсин виділяється з молоком матері. Вже після першого ссання у молодняка виникає діарея, зневоднення організму, розвивається кома і на 3—5-й день він гине.

При діагностиці рубратоксикозів необхідно враховувати те, що токсин не викликає запальної реакції при нанесенні на шкіру кроля, проте до нього досить чутливі рибки гуппі й білі миші.

Аспергілові і пеніцилові гриби, такі як *A. fumigatus*, *P. crustosum*, *P. cyclopium*, *P. granulatum* та інші, продукують близько 20 вторинних метаболітів, які викликають у тварин тривалий тремор, атаксію, опістотонус і одержали загальну назву “треморгени”. Про існування цієї групи мікотоксинів слід пам'ятати, тому що в практичних умовах у сільськогосподарських тварин, переважно свиней, зустрічаються захворювання, які клінічно характеризуються тремтінням шкіри і м'язів, порушенням координації рухів.

Із інших мікотоксикозів, що мають зв'язок з грибами цих родів, заслуговує на увагу патулінотоксикоз, який розвивається у тварин при поїданні кормів із вмістом патуліну. Цей токсин продукують близько 10 видів пеніцилових і кілька видів аспергілових грибів. Патулін добре розчиняється у воді, спирті, ацетоні, не розчиняється в петролейному ефірі і гексані, температура плавлення його становить 110-112 °С.

До патуліну найчутливіші свині, у яких відмічають пригнічення, з'являється кашель, інтенсивно виділяється слина, можливе блювання, інколи розвиваються парези й паралічі з летальним кінцем.

Діагностику аспергіло- та пеніциліотоксикозів здійснюють за загальноприйнятими схемами з визначенням токсичності кормів на біологічних об'єктах (проби на кролях, рибках гуппі, білих мишах). Мікологічне дослідження ґрунтується на вивченні морфологічних та культуральних властивостей грибів.



Колонії грибів *A. flavus* і *A. fumigatus* на агарі Чапека в центрі зеленувато-жовті, по периферії - сірувато-білі. *A. niger* утворює колонію темно-коричневого кольору в центрі, тоді як периферія залишається світлою. Оригінальними є і колонії збудників пеніцилотоксикозів

## **ЗБУДНИКИ ФУЗАРІОТОКСИКОЗІВ**

Фузаріотоксикоз - це отруєння тварин кормами, ураженими грибами із роду *Fusarium*. Представники даного роду - *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. nivale*, *F. tricinctum* та інші (всього їх близько 18) - продукують близько 10 різновидів токсинів, таких як Т-2-токсин, ацетил Т-2-токсин, зеараленон, бутенолід, фузаренон Х та ін.

Для сільськогосподарських тварин досить небезпечні трихотеценові мікотоксини, які утворюються на зерні та інших кормах, що перезимували під снігом або зберігались в умовах високої вологості й прохолоди.

У великої рогатої худоби трихотеценові мікотоксини сприяють утворенню виразок на всьому протязі шлунково-кишкового тракту, крововиливів, набряків, уражують центральну нервову систему. Свині, вівці, птиця також досить чутливі до цих токсинів. Токсин Ф-2 (зеараленон) у свиней зумовлює естрогенний синдром, тому захворювання ще одержало назву мікотоксичний вульвовагініт. Клінічно відмічаються набряки вульви і молочних залоз, у кнурців - набряк препуція. До фузаріозних мікотоксинів чутливі також люди за умови поїдання хліба, спеченого з ураженого грибами зерна.

**Лабораторна діагностика** фузаріотоксикозу основана на проведенні мікологічного й токсико-біологічного аналізів. Обов'язково передбачають органолептичну оцінку зерна: виявляють легкі зерна, вкриті матово-сірою оболонкою з червонуватими плямами міцелію гриба.

Токсичність корму визначають біопробу на кролях. Для виділення культури гриба використовують середовища Чапека, Білай, сусло-агар, картопляний агар. Оптимальна температура культивування - 18-24 °С. Колонії *F. sporotrichiodes* на картопляному агарі пухкі, білого або ніжно-рожевого кольору, повітряний міцелій у них слабо розвинутий. На щільних середовищах іншого типу фузарії утворюють колонії з добре розвинутим повітряним міцелієм білого, червоного або фіолетового кольору. У препаратах із колоній видно своєрідне переплетіння кондієносців з утворенням спородохій, в яких

формується веретено- і серпоподібні макроконідії. Численні проміжні хламідоспори зібрано у ланцюжки або вузлики.

Колонії *P. graminearum* на картопляному агарі білого кольору, низькі, стеляться по поверхні середовища. В гіфах повітряного міцелію виявляють спородохії та псевдопіонноти з макроконідіями.

## **ЗБУДНИК СТАХІБОТРІОТОКСИКОЗУ**

Стахіботріотоксикоз - гостре або підгостре отруєння тварин, яке виникає внаслідок поїдання ними неякісних кормів, уражених грибом *Stachybotrys alternans*. До захворювання 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.

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 захворювання - сапрофітний гриб *Stachybotrys alternans* - добре розвивається на субстратах, збагачених клітковиною (солома, сіно, зерно), культивується на спеціальних середовищах.

**Діагностика.** Із проб підозрілих кормів гострим скальпелем знімають міцеліальну масу гриба (у вигляді темного нашарування) й кладуть на предметне скло, в краплю спирту-гліцерину. Накривають покривним склом і досліджують під середнім збільшенням мікроскопа. Конідієносії гриба гіллясті, з перетинками; кожна гілка закінчується пучком стеригм, на яких в один шар розміщуються конідії. Останні - темно-коричневого кольору, овальні, з шипами.

Для одержання культур гриба використовують різні штучні живильні середовища типу Чапека, сусло-агар, агар Сабуро, Ваксмана. Гриб добре розвивається на стерильному фільтрувальному папері, зволоженому середовищем Ван-Інтерсона. Колонії гриба - від темно-сірого до чорного кольору. На інших середовищах токсичні і нетоксичні варіанти колоній стахіботріса дещо відрізняються. Колонії токсиноутворюючих варіантів оточено ніжним міцеліальним кільцем, ширшим, 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.

Токсичність як самого ураженого корму, так і міцеліальної маси колоній підтверджується шкірною пробою на кролях. При наявності в екстракті токсину через 48-72 години 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 % розчином їдкою натру та хлором.

### **ЗБУДНИК ДЕНДРОДОХІОТОКСИКОЗУ**

Дендродохіотоксикоз - отруєння тварин неякісними кормами, особливо соломою і половою, в яких нагромаджується токсин гриба *Dendrodochium toxicum*. Вказаний гриб - типовий сапрофіт і розвивається на зволоженій пшеничній, ячмінній, вівсяній соломі, полові, сіні із деяких трав та інших субстратах, багатих на клітковину. Оптимальна температура росту - 20-25 °С.

До дендродохіотоксикозу чутливі коні, вівці, кури, лабораторні тварини, свині, у яких отруєння може клінічно не проявитись, загибель тварин буде раптовою. У свиней можливе м'язове тремтіння, виникає пронос, який змінюється запором, із носа витікає слиз із домішкою крові, на "п'ятачку", шкірі губ, у ротовій порожнині утворюються виразки. Тварини гинуть протягом 3-4 діб.

Для культивування гриба *Dendrodochium toxicum* використовують спеціальні середовища. На агарі Чапека утворюються круглі колонії з пухнастим міцелієм білого кольору на периферії та оливково-чорним - у центрі, в зоні якого виявляють особливі "подушечки" діаметром 0,3-1,0 мм (спородохії). Останні утворюються сплетіннями розгалужених конідієносців з продовгуватого-еліптичними, загостреними на кінцях конідіями. Гриб добре росте також на зволоженій соломі.

Діагноз дендродохіотоксикозу підтверджується виявленням гриба шляхом мікроскопії препаратів із ураженого корму, одержанням культури гриба й постановкою проби на токсичність на біологічних об'єктах. Слід зауважити, що корми мають нормальний вигляд, бо гриб розвивається в середині соломинок. Дендродохіни - найсильніші отрути з відомих мікотоксинів - належать до трихотеценів. 350-450 г ураженої

соломи, з'їденої конем, викликає отруєння, яке через декілька годин закінчується смертю.

Дендродохін витримує нагрівання в автоклаві при температурі 120 °С протягом години, тому будь-яка термообробка уражених кормів буде безрезультатною.

### **Контрольні питання**

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?

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бортнічук В. А., Скибіцький В. Г., Ібатулліна Ф. Ж. Практикум з ветеринарної мікробіології : начальний посібник / за ред. В. А. Бортнічука. 2-ге вид. перероб. і доп. Вінниця : Нова книга, 2007. 240 с.
2. Практикум з мікробіології: практикум / Ф. Ж. Ібатулліна, Г. В. Козловська, М. В. Мельник, В. Г. Скибіцький. Київ : ЦП «Компринт», 2016. 273 с
3. Мікробіологія : практикум для лабораторних робіт / В. В. Власенко та ін. Вінниця : Едельвейс і К, 2010. 100 с.
4. Ветеринарна мікробіологія : підручник / В. Г. Скибіцький та ін. ; за ред. В. Г. Скибіцького, В. В. Власенка. 2-ге вид., змінене і доп. Київ : ЦП «Компринт», 2016. 420 с
5. Ветеринарна мікробіологія / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : Біо-Тест-Лаб, 2013. 421 с.
6. Ветеринарна мікробіологія : начальний посібник / В. Г. Скибіцький та ін. ; за ред. В. Г. Скибіцький. Т. 1, 2. Київ : Видавничий центр "Нічлава", 2009. 638 с.
7. Ветеринарна мікробіологія : посібник / В. М. Зоценко та ін. Біла Церква, 2017. 184 с.
8. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Мікробіологія : підручник. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. 360 с.
9. Люта В. А., Кононов О. В. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія : підручник. 2-ге вид. Київ : Медицина, 2018. 576 с.
10. Мікробіологія : практикум для лабораторних робіт / В. В. Власенко та ін. Вінниця : Едельвейс і К, 2010. 100 с.
11. Мікробіологія з основами імунології : підручник / В. В. Данилейченко, Й. М. Федечко, О. П. Корнійчук, І. І. Солонинко. 3-тє вид. Київ : Медицина, 2020. 384 с.
12. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія. Київ : НУХТ, 2004. 471 с.
13. Ситник І. Д, Климюк С. І., Тварко М. С. Мікробіологія, вірусологія імунологія : підручник. Тернопіль : ТДМУ, 2017. 392 с.
14. Технічна мікробіологія: підручник / Л. В. Капрельянц та ін. ; за ред. Л. В. Капрельянца. Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2020. 432 с.
15. Diwakar, R., & Kumar, P. (2015). *Instant notes on veterinary microbiology and bacteriology*. Biotech.

16. Diwakar, R. P., & Yadav, V. (2018). *A handbook of veterinary microbiology & bacteriology*. Satish Serial.
17. Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., & Fitzpatrick, E. S. (2016). *Concise review of veterinary microbiology*. Wiley-Blackwell. Retrieved from <https://www.twirpx.com/file/2608903/>
18. Qureshi, F., & other. (2019). *Veterinary microbiology: Concise notes*. The Islamia University of Bahawalpur. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/338935855\\_VETERINARY\\_MICROBIOLOGY\\_CONCISED\\_SHORT\\_NOTES\\_2020#read](https://www.researchgate.net/publication/338935855_VETERINARY_MICROBIOLOGY_CONCISED_SHORT_NOTES_2020#read)

Навчальне видання

## **ВЕТЕРИНАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ**

Методичні рекомендації

Укладачі :

**Кот Стах Петрович**

**Ювенко Артем Володимирович**

Формат 60x84/16 Ум. друк. арк. 9

Тираж 30 прим. Зам. № \_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського національного аграрного університету  
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9