

**МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА
УКРАЇНИ**

**Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів
Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики і
ветеринарно-санітарної експертизи**

**Лабораторна діагностика сибірки тварин,
індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу,
сировини тваринного походження
та об'єктів навколишнього середовища**
(Науково-методичні рекомендації для забезпечення практичної та самостійної
роботи фахівців лабораторій та науково-дослідних установ ветеринарної медицини,
викладачів та студентів факультетів ветеринарної медицини ВНЗ)

м. Київ

2014

Укладачі: докт. вет. наук Скрипник В.Г., канд. вет. наук, доцент Рубленко І.О., канд. вет. наук Т.О. Гаркавенко, докт. вет. наук, академік НААН Головка А.М., канд. вет. наук, Загребельний В.О., докт. вет. наук, член-кореспондент НААН Ушкалов В.О., зав. лабораторії Дерябін О.М., канд. вет. наук Мачуський О.В., канд. вет. наук Скрипник А.В., канд. вет. наук Пінчук Н.Г.

Скрипник В.Г. Лабораторна діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сировини тваринного походження та об'єктів навколишнього середовища (Науково-методичні рекомендації для забезпечення практичної та самостійної роботи фахівців лабораторій та науково-дослідних установ ветеринарної медицини, викладачів та студентів факультетів ветеринарної медицини ВНЗ) / В.Г. Скрипник, І.О. Рубленко, Т.О. Гаркавенко та ін. – м. Київ, 2014. – 76 с.

Методичні рекомендації складені відповідно до вимог чинних нормативних документів, нових даних світової та вітчизняної науки щодо морфології, фізіології, екології збудника та лабораторної діагностики сибірки тварин. Дотримання викладених положень дасть змогу впевнено ідентифікувати та диференціювати *Bacillus anthracis* в умовах лабораторій, а також формувати у майбутніх фахівців ветеринарної медицини теоретичних і практичних навиків із питань ідентифікації мікроорганізмів тощо.

Рецензенти: **Б.М. Ярчук**, канд. вет. наук, професор Білоцерківського НАУ;

Н.А. Пархоменко, канд. біол. наук ДНКІБШМ;

В.В. Кацимон, старший науковий співробітник ДНКІБШМ.

Зміст

Список скорочень.....	4
Вступ.....	6
1. Загальні положення.....	7
2. Відбір патологічного та біологічного матеріалу вимоги до його транспортування.....	10
2.1 Відбір патологічного та біологічного матеріалу від тварин.....	10
2.2 Відбір проб сировини тваринного походження.....	12
2.3 Відбір проб із об'єктів навколишнього середовища.....	13
3. Приймання та поводження із діагностичними зразками.....	17
4. Підготовка проб.....	20
4.1 Підготовка проб для бактеріологічного дослідження.....	20
4.2 Підготовка проб для дослідження методом ПЛР.....	22
5. Порядок проведення дослідження.....	23
5.1 Проведення дослідження методом ПЛР.....	23
5.2 Мікроскопічні дослідження (морфологія клітин, спороутворення, капсулоутворення).....	33
5.3 Реакція преципітації за Асколі.....	41
5.4 Бактеріологічний метод дослідження.....	43
5.5 Характер росту на поживних середовищах (культуральні властивості).....	48
5.6 Тест на рухливість.....	49
5.7 Наявність капсулоутворення.....	50
5.8 Чутливість до сибіркових бактеріофагів (фаготипування).....	51
5.9 Тест на гемоліз.....	52
5.10 Тест на чутливість до пеніциліну («перлинне намисто»).....	52
5.11 Тест на лецитиназу.....	53
5.12 Реакція імунофлуоресценції.....	53
5.13 Біологічні дослідження (біопроба).....	59
6. Визначення чутливості до антибіотиків.....	60
7. Визначення протеолітичних властивостей.....	62
8. Визначення вірулентності культури <i>Bac. anthracis</i>	63
9. Ідентифікація збудника сибірки.....	63
10. Встановлення діагнозу.....	64
10. Список використаної літератури.....	67
Додатки.....	69

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

- БВЕП –1 – бактерійно-вірусний електропреципітатор
- БСА – бичачий сироватковий альбумін
- ДНДІЛДВСЕ – Державна науково-дослідний інститут із лабораторної діагностики та ветеринарно- санітарної експертизи
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- ДНКІБШМ – Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
- ЕДТА – етілендіамінтетраоцтова кислота
- ЄС – Європейський Союз
- ЗІЗ – засоби індивідуального захисту
- ІФА – імуно-ферментний аналіз (ELISA – ферментний імуносорбентний аналіз
- МЕБ – міжнародне епізоотичне бюро
- МПА – м'ясо-пептонний агар
- МПБ – м'ясо-пептонний бульйон
- МФА – метод флюорисціюючих антитіл
- НААН – Національна академія аграрних наук
- НКЗ – негативний контрольний зразок
- НКВ – негативний контроль виділення
- ОД – одиниці дії
- ОНІ – особливо небезпечні інфекції
- ПАБ –1 – пробовідбірник аерозольний бактеріологічний
- П.І.П. – прізвище ім'я по батькові
- ПОВ –1 – прилад для відбору проб повітря
- ПКЗ – позитивний контрольний зразок
- ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція
- п.н. –пар нуклеотидів
- пРІФ –пряма реакція імунофлюоресценції
- РНГА – реакція непрямой гемаглютинації
- РПГА – реакція пасивной гемаглютинації

CO₂ – вуглекислий газ

СОП – стандартна операційна процедура

СБГ – 2,5 % серцевий бульйон із 20 % гліцерину

СБГ+ІСК – 2,5 % серцевий бульйон із 20 % гліцерину з додаванням 50% інактивованої сироватки крові коня

ТАЕ – Трис-ацетат-ЕДТА буфер

ТБЕ буфер – Трис-борат- ЕДТА буфер

ТЕ-буфер – буфер на основі Трис-НСІ і ЕДТА

ТТХ –тетрафеніл тетразол хлорид

УФ – ультрафіолет

ФСБ – фосфатно-сольовий буфер

ШББ – шафа біологічної безпеки

DCL – абсолютно летальна доза

FITC – флюоресцеїн ізотіаціанат

H₂O – вода

LD₅₀ – летальна доза, що викликає загибель 50 % піддослідних тварин

NaCl –натрію хлорид

PBST – фосфатно-буферний розчин з 0,3% Tween–20

pH – окисно-відновний потенціал

Вступ

Інфекційні хвороби за всіх часів були головними ворогами людини. Одне з перших місць серед зоонозних захворювань в історії мікробіології займає сибірка. У процесі боротьби з даним захворюванням людство завжди прагнуло удосконалення протиепідемічних заходів.

За даними багатьох відомих дослідників у світі щорічно реєструються випадки сибірки як серед сільськогосподарських тварин так і серед людей.

Статистичні дані щодо захворювання тварин та людей на сибірку, за останні роки, свідчать про поступове зниження спалахів хвороби на території України. Водночас ризик виникнення нових спалахів сибірки зберігається десятиліттями. За даними ВООЗ найбільша захворюваність на сибірку припадає на територію Європи. Основною причиною виникнення нових спалахів сибірки вважають недостатню захищеність захоронень тварин уражених сибіркою. Перш за все це старі захоронення тварин, які не відповідають вимогам біологічної безпеки. Саме вони створюють потенційну загрозу появи захворювання не лише серед тварин а й серед людей.

Епізоотичну ситуацію в Україні можна оцінити як стабільну, зі спорадичними спалахами. Висока патогенність збудника сибірки та здатність його спорової форми зберігатися в умовах зовнішнього середовища багато десятиліть відносить його до особливо небезпечних біологічних агентів.

Одним із особливих аспектів довготривалого зберігання збудника в ґрунті є склад ґрунту та кліматичні умови України. Ґрунтовий покрив території України представлений переважно чорноземними типами ґрунтів, які за своїми фізико-хімічними властивостями є сприятливими для виживання, перебування, розмноження збудника антраксу.

Своєчасна діагностика дасть змогу попередити виникнення нових спалахів, локалізувати вогнище інфекції, своєчасно застосувати комплекс протиепізоотичних заходів.

1 ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

1.1 Сибірка (*Anthrax*) – зоонозна хвороба з переважно гострим перебігом (у свиней – хронічним), збудник (*Bacillus anthracis*) відноситься до мікроорганізмів третьої групи патогенності (ризик) особливо небезпечних інфекцій (за класифікацією ВООЗ), характеризується гарячкою, септицемією, інтоксикацією організму, серозно-геморагічним запаленням підшкірної сполучної тканини і внутрішніх органів, утворенням набряків та карбункулів. Хвороба перебігає у надгострій, гострій і підгострій формах. У тварин може бути шкірна (у вигляді карбункулів), кишкова (гострий геморагічний коліт), легенева (геморагічна пневмонія), септична (ускладнення внаслідок генералізації процесу) форми. У чутливих до сибірки тварин (травоїдних) захворювання переважно перебігає в септичній формі. У свиней – найчастіше в локальній ангінозній формі у вигляді серозно-геморагічного або некротичного запалення лімфатичних залоз, зівя і глотки [1–3].

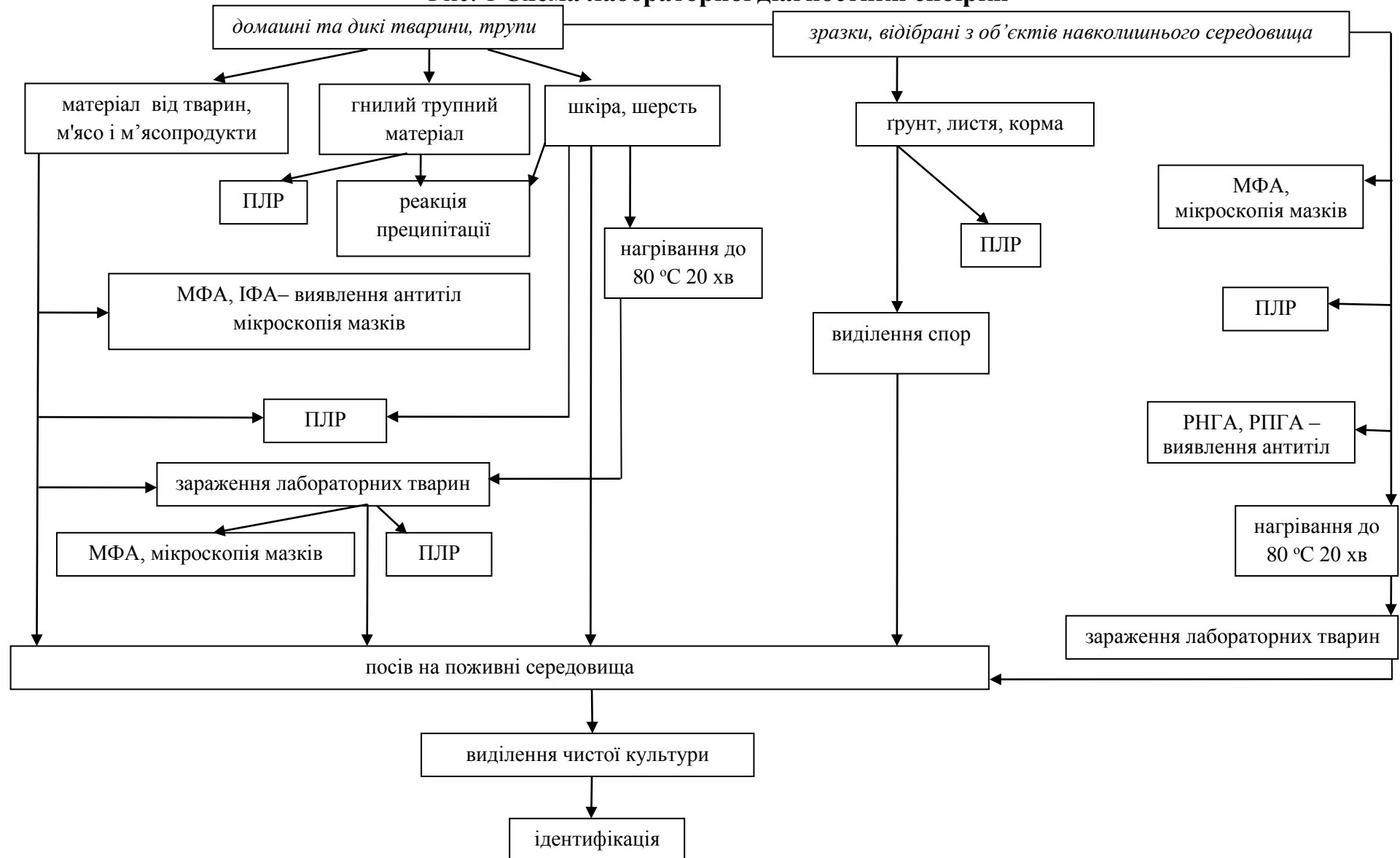
1.2 Збудник сибірки – *Bac. anthracis* відноситься до сімейства *Bacillaceae* роду *Bacillus*, в якому нараховують більше 100 видів. *Bacillus anthracis* є представником так званої групи бацил *Bac. cereus sensu lato*. Найбільш близькими до збудника сибірки є наступні антракоїди: *Bac. cereus*, *Bac. cereus var. pseudoanthracis*, *Bac. cereus var. mycoides*, *Bac. cereus var. anthracoides*, *Bac. megaterium*, *Bac. thuringiensis*, *Bac. subtilis var. mesentericus* та новий вид *Bac. weihenstephanensis*.

1.3 *Bacillus anthracis* – нерухома, грампозитивна паличка. Зустрічається у вигляді вегетативної безкапсульної, вегететивної капсульної та спорової форм. Капсула збудника утворюється лише в живому організмі, або ж на спеціальних поживних середовищах із високим вмістом білку. Спороутворення відбувається в навколишньому середовищі, за росту на поживних середовищах (1 – 30 год за температури 15–42 °С [4–6]), у препаратах-мазках (за неякісної фіксації препаратів), в умовах вільного доступу кисню протягом 2–3 діб, при змінах рН та вологості середовища. У пофарбованих препаратах-мазках, виготовлених із культур, палички розташовуються довгими ланцюжками, з обрубаними зовнішніми краями і мають вигляд бамбукової палиці. У мазках із патологічного матеріалу палички

розташовуються поодинокі, попарно або короткими ланцюжками (по 3–5 клітин), оточені вираженою капсулою (у деяких штамів, може бути відсутня). Спори мають форму овалу, розташовуються по центру не виходячи за межі клітини. У природі зустрічаються аспорогенні штами. Розміри вегетативних клітин збудника сибірки 1–1,5 x 6–10 мкм, спор – 0,8–1,0 x 1,2–1,5 мкм [4–9].

1.4 Дослідження на сибірку проводять мікроскопією препаратів-відбитків та препаратів-мазків із патологічного матеріалу, шляхом посівів на поживні середовища, постановки біопроби (зараження лабораторних тварин), проведення ПЛР та ін. досліджень (рис. 1).

Рис. 1 Схе́ма лабораторної діагностики сибірки



2 ВІДБІР ПАТОЛОГІЧНОГО ТА БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ, ВИМОГИ ДО ТРАНСПОРТУВАННЯ

Відбір і пакування проб здійснюють із дотриманням заходів особистої профілактики, не допускаючи поширення збудника при відборі, транспортуванні та контамінації самих проб.

2.1 Відбір патологічного та біологічного матеріалу від тварин

При відборі зразків біологічного та патологічного матеріалу тощо, необхідно дотримуватись заходів, що запобігають забрудненню об'єктів навколишнього середовища та перехресному забрудненню зразків, керуючись при цьому діючими правилами та інструкціями з даного питання: Директива ЄС 2006/437/ЄС від 4 серпня 2006 р., Офіційний журнал ЄС; Керівництво з діагностики МЄБ, розділ 1.1.1. Відбір та транспортування діагностичних зразків, 2008 р.; Правила відбору зразків патологічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для лабораторного дослідження. Затверджено Головою управління ветеринарної медицини України П. П. Достоевським, 15.04.1997, № 15–14/111.

Проводити розтин трупу суворо заборонено!

Для бактеріологічного дослідження. Матеріал для дослідження від хворих та підозрюваних у захворюванні тварин відбирають до початку їх лікування антибіотиками чи сироваткою (глобулінами).

Від живих тварин для дослідження відбирають кров із яремної вени, або вени вуха, у свиней – найкраще з очного синуса чи вени хвоста (не менше 1 см³).

Кров відбирають із дотриманням правил асептики і антисептики не допускаючи потрапляння у навколишнє середовище, пам'ятаючи, що у крові збудник зберігає життєздатність до 18 год.

Для постановки посмертного діагнозу в лабораторію надсилають кров із вуха чи іншої периферійної судини.

Якщо необхідну кількість крові відібрати не можна, надсилають вухо, перев'язане біля основи голови. Вухо відрізають з того боку, на якому лежить труп. Під вухо – підстилають вологонепроникний матеріал, щоб попередити потрапляння

крові у навколишнє середовище. Попередньо, вухо туго перев'язують у основи в двох місцях і відрізають між лігатурами. Місце відрізу припалюють.

Від свиней (додатково) відбирають ділянки набрякової тканини та заглоткові, підщелепові та інші лімфатичні вузли. Роблять три-чотири товсті препарати-мазки на предметних скельцях, висушують на повітрі, (не під прямими сонячними променями, не допускаючи контакту з комахами), не фіксують.

На упаковці роблять надпис: «Мазок не фіксовано!». Висушені препарати складають відбитками чи мазками в середину, поклавши між ними прокладки, наприклад, сірники (або ж у бактеріологічні чашки).

Скельця пакують у пергаментний папір (поліетиленову плівку), потім у щільний папір і маркують. Бактеріологічні чашки пакують у пергаментний папір.

Трупи хутрових звірів направляють цілими.

Якщо підозра на сибірку виникла під час розтину трупа (крім трупів свиней), розтин припиняють і на дослідження направляють кров, частину селезінки, печінки, лімфатичні вузли із патологоанатомічними змінами.

Матеріал від трупа необхідно відбирати та досліджувати якомога раніше після смерті тварин, оскільки через розвиток сторонньої мікрофлори виділити чисту культуру збудника сибірки важко.

Патологічний та біологічний матеріал для дослідження вміщують у стерильний лабораторний посуд (одноразові контейнери з герметично закритою кришкою, пробірки).

Посуд із патологічним, біологічним матеріалом вміщують у вологонепроникну тару, пломбують або опечатують, роблять напис «Верх, обережно!».

Упакований патологічний, біологічний матеріали з оформленими супровідними документами направляють до лабораторії з посильним (нарочним) згідно чинного законодавства.

У супровідних документах вказують П.І.П., адресу власника тварини, номер телефону (факсу), П.І.П. та телефон особи, яка відбирала проби, назву захворювання, на яке слід провести дослідження, вид, порода, стать, вік, ідентифікаційний номер тварини, від якої відібрали проби, перелік проб, які

направляються для дослідження, повна історія хвороби (клінічні ознаки, тривалість хвороби, поширеність захворювання у стаді, кількість тварин на фермі, кількість тварин, що загинули, кількість – із клінічними ознаками, їх вік, стать і порода, перерахунок ветеринарних препаратів, які використовувалися, перерахунок щеплень, які проводилися, дані про упаковку і транспортування.

Для молекулярно-біологічного дослідження. Макробіоптат (макроаутоптат) (кусочки тканин: селезінки, лімфатичних вузлів та ін., масою 0,1–1 г) поміщають у контейнери з 0,85 % розчину натрію хлориду або транспортного середовища № 2.

Зберігання та транспортування біологічного матеріалу для дослідження методом ПЛР повинно здійснюватися з дотриманням холодового режиму: зразки крові – за температури 2–8° С впродовж 1 доби; зразки плазми та сироватки крові – за температури 2–8° С впродовж 5 діб, за температури мінус 70° С – без обмежень.

Зразки іншого біологічного матеріалу – за температури 2–8° С впродовж 1 доби, за температури мінус 20° С – впродовж 7 діб, за температури мінус 70° С – без обмежень. Допускається лише одноразове заморожування – розморожування матеріалу.

2.2 Відбір проб сировини тваринного походження

Дослідження проб сировини тваринного походження проводять у випадках, коли необхідно визначити джерело або фактор передачі збудника сибірки; виключити обсіменінні спорами сировини тваринного походження.

2.2.1. *Відбір проб вовни* відбирають із дотриманням правил асептики і антисептики, санітарно-гігієнічних правил щодо захисту органів дихання оператора. Для дослідження відбирають не менше 5 зразків вовни, об'єднаних у одну пробу, з різних місць упаковки масою 2 г кожний (краще відбирати пучки забрудненої вовни). Якщо шерсть упакована в кіпи, відбирають не менше 10 зразків із різних місць кожної кіпи, а також, додатково, зразки пилу, що накопичився всередині упаковки. Зразки з однієї кіпи об'єднують і пакують разом.

2.2.2 *Відбір проб шкіри.* Відбирають 5 шматочків розміром 3 x 3 см² із периферичних не гнилих і без плісняви ділянок шкіри. Якщо шкіра зберігається в

тюках, кіпах (велика партія), для дослідження відбирають від кожного тюка не менше 3-х проб із різних місць та об'єднують в одну пробу.

При виявленні з внутрішньої сторони шкірки крововиливів чи інфільтратів, проби відбирають саме з таких ділянок.

2.3 Відбір проб із об'єктів навколишнього середовища

Дослідження проб із навколишнього середовища проводять у випадках, коли необхідно визначити джерело або фактор передачі збудника сибірки; для виявлення обсіменіння спорами збудника окремих об'єктів чи територій; із метою індикації збудника в місцях старих захоронень тварин за їх моніторингу, а також за проведення будівельних, меліоративних, гідротехнічних чи інших видів робіт, пов'язаних із добуванням і переміщенням ґрунту.

Місце відбору проб дезінфікують 10%-м розчином гіпохлориду калію або іншими придатними для цього дезінфектантами, інструмент обпалюють паяльною лампою, або поміщають у ємкість із дезінфектантом на 30–40 хв (відповідно до інструкції виробника дезінфектанту).

2.3.1 Відбір проб кормів. Концентровані корми (комбікорми, зерно, висівки) відбирають у залежності від умов зберігання. Від ненавантажених кормів відбирають одну пробу масою 100 г із розрахунку на 4 м² поверхні, але не менше 5 проб від партії. Проби відбирають як із поверхні, так і з глибоких шарів корму, рівномірно з усієї поверхні.

Від завантажених кормів проби відбирають у наступному порядку: до 10 упакованих одиниць – від кожної упакованої одиниці; від 11 до 100 – 10 проб; від 101 і більше – 10 і додатково по 3 із кожних 100 одиниць.

Проби відбирають сухим стерильним щупом. Після відбору проб від кожної партії корму щуп очищують і обпалюють над вогнем паяльної лампи.

Проби грубих кормів (сіно, солома) відбирають із різних місць скирти за допомогою пінцета та ножиців, із розрахунку одна проба масою не менше 40 г на 4 м² поверхні скирти.

Зелену масу відбирають, як грубі корми, але наважку проби збільшують до 100 г. Проби силосу, який зберігається в ямах (траншеях), відбираються як проби ґрунту (п. 1.3.2.7), знаходиться поза ямою – як проби зеленої маси.

Коренеплоди, в залежності від їх величини, беруть із розрахунку 1–3 шт з 4 м² площі бурту (відсіку, тощо). З коренеплодів скальпелем зрізують поверхневий шар, який має залишки ґрунту, який використовують для дослідження.

У лабораторію направляють середню пробу різних кормів, яку формують із добре змішаних первинних проб, відібраних від даної партії, ємкості, тощо. Маса середньої проби повинна бути не меншою ніж 500 г.

2.3.2 Відбір проб води. Проби води з природних і штучних водойм беруть на глибині 10–15 см від поверхні та від дна за допомогою батометра, або спеціально пристосованої пляшки. Об'єм кожної проби повинен бути не менше 500 см³, а загальний об'єм – не менше 1 дм³. Окремо відбирають проби придонного осаду біля берегової кромки, який досліджують як проби ґрунту.

2.3.3 Відбір проб листя. Під час спалахів сибірки некрофільні мухи можуть забруднювати великі площі навколо трупів тварин, оскільки вони живляться кров'ю та тканинами інфікованих тварин, внаслідок чого інфікуються бактеріями і переносять їх на прилеглу рослинність внаслідок регургитації і дефекації під час процесу травлення.

На відстані 2–3 м по діаметру від трупа тварини руками у чистих рукавичках за допомогою пінцету збирають листя з виділеннями мух (вологі або сухі фекалії, або відригування мух) з гілок кущів, дерев чи трави. При цьому розташовують пальці або кінці пінцету на жилці листа, що дозволить уникнути контакту з виділеннями. Зібране листя розміщують у стерильний скляний посуд, або поліетиленові пакети та маркують пробу.

2.3.4 Відбір проб наземної частини трав'яного покриву. Для отримання об'єднаної проби рослин вагою 0,5 кг натуральної вологості, відбирають не менше 8–10 точкових проб, із площі 4 м². Точкову пробу відбирають шляхом зрізання трав'яного покриву гострим ножом або ножицями, вкладаючи у поліетиленовий пакет із наступним маркуванням зразка.

2.3.5 *Відбір проб з ґрунту.* В багатьох випадках спалахів часто відбираються зразки ґрунту, з місць де знаходилися труп тварин, або ж із захоронень трупів тварин, що загинули від сибірки. У зв'язку з тим, що збудника сибірки виділяти з ґрунту досить складно, тому з місць захоронень необхідно відбирати велику кількість зразків ґрунту з різної глибини. Обстеженню підлягають ділянки, підозрювані в обсіменінні збудником сибірки. Великі площі, що обстежують, розбивають на квадратні ділянки площею не більше 4 м². У кожному квадраті намічають 5 точок: 4 точки по краях квадрату і одна по середині (за типом "конверту"), з яких відбирають проби ґрунту за допомогою бура Некрасова (рис. 2) чи іншого засобу.

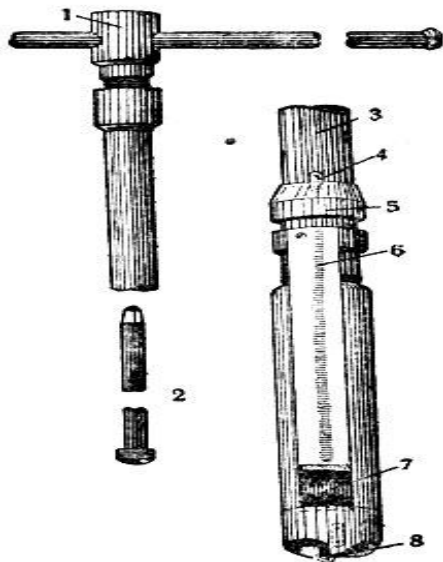


Рис. 2. Бур Некрасова:
 1 – головка з рукояткою;
 2 – додаткова штанга;
 3 – основна штанга;
 4 – шпонка;
 5 – муфта;
 6 – кришка;
 7 – коробка;
 8 – ніж

Із 5 проб масою 200–300 г, відібраних з одного квадрату (або з однієї ділянки), готують середній зразок, який кладуть у стерильну колбу та закривають корком. Обробку проби бажано проводити в день дослідження, зберігання допускається за температури 4–5 °С протягом 24 год. Проби ґрунту з території, підозрюваної в поверхневому обсіменінні збудником сибірки, беруть на глибині до 15 см за допомогою ножа з широким лезом, який щоразу фламбують над полум'ям.

Перед взяттям ґрунту на скотомогильниках (місцях захоронень трупів) верхній шар ґрунту знімають на 3–4 см. Зразки відбирають на глибині до 2 м через кожні

25 см, загальною масою 200–300 г. Особливу увагу звертають на кістки та інші тваринні залишки. Їх також окремо відбирають для дослідження.

Кожну пробу розміщують у лабораторний посуд для зразків матеріалу, забезпечуючи доступ повітря до зразків.

Не використаний для зразків ґрунт обробляють дезінфектантом (хлорним вапном із 25% активного хлору, зволожуючи ґрунт водою, експозиція від 1 год до 3 год, 10%-м розчином гіпохлориду калію або іншими придатними для цього дезінфектантами) і скидають у шурф.

2.3.6 Змиви з об'єктів навколишнього середовища. Змиви проводять із місць найбільш ймовірного обсіменіння спорами збудника за допомогою стерильних тампонів, змочених у стерильній воді, фізіологічному розчині. Площа змиву одним тампоном не повинна перевищувати 100 см². Потім тампони поміщають у пробірки з 4–5 см³ стерильної води або 0,85 % розчину натрію хлориду і щільно укупорюють. Можна використати одноразові аплікатори комерційного виробництва.

2.3.7 Повітря. Проби повітря відбирають за допомогою спеціальних пристроїв (апарат Кротова, аспіратор ПУ–1Б, бактеріовловлювач Речменського, прилад ПОВ–1, ПАБ–2, прилади Кіктенка, Андерсена Дьяконова, БВЕП–1), що містять адсорбуючу рідину або фільтри. Використовують також седиментаційний метод дослідження повітря (метод Коха) – під дією сили тяжіння мікроорганізми осідають на поверхню поживного середовища (м'ясо-пептонного агару (МПА), агар Хоттінгера, кров'яний МПА). Відкривають три-п'ять бактеріологічні чашки з середовищем на 5–10 хв. Прийнято, що на площу 100 см² за 5 хв осідає стільки бактерій, спор, скільки їх міститься в 10 дм³ повітря. Об'єм проби досліджуваного повітря повинен складати не менше 5 м³.

2.3.8 Кожну відібрану пробу розміщують у чисту суху ємкість і щільно закривають. Ємкості пакують у вологонепроникну тару, яку пломбують (опечатують), роблять напис: «верх, обережно!». Необхідно слідкувати, щоб відібрані проби до відправки в лабораторію, знаходилися в прохолодному місці та максимально швидко були доставлені до лабораторії нарочним спеціалізованим транспортом.

Супровідні документи оформлюють згідно чинного законодавства (додаток 1).

3 ПРИЙМАННЯ ТА ПОВОДЖЕННЯ ІЗ ДІАГНОСТИЧНИМИ ЗРАЗКАМИ

Діагностичні зразки повинні досліджуватися в лабораторії, яка має 2-й рівень біологічної безпеки. Працівники лабораторії повинні мати допуск до роботи із збудниками 3-го рівня.

3.1 Засоби індивідуального захисту. Необхідно дотримуватись наступних рекомендацій щодо ЗІЗ.

Дослідники повинні бути одягнуті в захисні окуляри, лабораторний халат із застібкою позаду (при виході з лабораторії потрібно зняти халат і повісити його або покласти в пакет для прання), рукавички (латексні), спеціальні засоби захисту очей й органів дихання для приміщень (де утримуються тварини), взуття з закритим носком. Необхідно мати додаткові ЗІЗ: бахіли, лабораторний халат, що не пропускає рідини.

3.1.1 *Захист очей працівника.* Захисні окуляри із твердими бічними щитками служать мінімальним засобом захисту очей, необхідними для входу в ізольовані лабораторії. Якщо при маніпуляції можуть виникнути аерозолі, захист очей повинен бути доповнений лицьовим щитком для захисту носа й рота. Не можна носити контактні лінзи в лабораторіях й у зонах використання хімічних реактивів. Для мінімізації можливої контамінації варто зберігати в лабораторії необхідну кількість захисних окулярів.

Засоби захисту очей повинні зберігатися в чистому стані недалеко від вхідних дверей (перед ними). Засоби захисту очей необхідно після кожного використання перш, ніж помістити на зберігання у середині лабораторії, очищати (дезінфікувати) за допомогою серветок для чищення оптики або іншим еквівалентним методом .

3.1.2 *Захисний одяг.* Працівники, що входять до лабораторії, повинні одягти лабораторний халат. У аварійних ситуаціях відповідно до оцінки ризику може знадобитися застосування додаткового захисного одягу, такого як костюми для

збирання, комбінезони і фартухи. Як альтернатива можна використовувати одноразовий одяг.

3.1.3 Захисне взуття. Всі співробітники лабораторії й обслуговуючий персонал повинні носити взуття із закритим носком, що забезпечує належний захист від біологічних, хімічних і фізичних небезпечних факторів, дезінфікується та легко миється.

При використанні захисного взуття потрібно виконувати наступне: захисне взуття варто надягати перед входом у лабораторію; захисне взуття для аварійних ситуацій варто надягати перед входом у відповідні зони.

3.1.4 Захист рук. При роботі з біологічними небезпечними збудниками варто використати захисні рукавички, враховуючи їх призначення і в умовах, рекомендованих виробником. Необхідно перевіряти рукавички на відсутність розривів і дрібних проколів. Рукавички повинні закривати низ рукава й манжети захисного одягу. Рекомендується використовувати подвійні рукавички. Рукавички необхідно надягати після входу в лабораторію BSL-2 і перед входом у відповідну зону лабораторії. Одноразові рукавички необхідно зняти й утилізувати при видимому забрудненні (їх не можна мити або повторно використовувати). Контаміновані багаторазові рукавички перед повторним використанням повинні бути знезаражені.

3.2 Поводження із зразками. Пакет відкривається, а його вміст перевіряється у ШББ. Якщо контейнери порушені або зламані, дотримуйтеся інструкцій стандартної методики роботи для обробки біологічних виливів.

У ШББ знімають усі пакувальні матеріали, які можна автоклавувати (наприклад, картонні коробки та адсорбуючі матеріали) і поміщають їх у бікси для автоклавування. Дотримуються інструкцій щодо автоклавування. Такі матеріали як пінопласт, пластикова повітряно-пухирчата плівка тощо, які не можна автоклавувати, тому що вони можуть створити токсичні пари, знезаражують шляхом занурення у 10 % розчин натрію гіпохлориду, щонайменш на 30 хвилин або інший дезінфікуючий розчин (концентрація та експозиція визначається відповідно до настанов виробника).

Забруднені пробірки необхідно обробити дезінфектантом та витерти паперовим рушником із подальшою його утилізацією. Впевнитися, що усі пробірки відповідним чином позначені, щоб уникнути помилок при ідентифікації зразків. Позначити стан зразків та будь-які особливі умови, наприклад: забруднення зразків рідинами або біоматеріалами.

Зразки реєструють у журналі реєстрації діагностичних зразків, кодують. Ідентифікаційний номер (код) використовується для відстеження.

Усі ізоляти реєструються в інвентаризаційному переліку вибраних збудників, що визначає джерело культури, ідентифікаційний і унікальний номер культури, місце розташування (морозильна камера), полицю, ящик та положення у ящику. Ізолят повинен бути знищений, або переданий згідно наказу Державного департаменту ветеринарної медицини №70 «Про порядок зберігання, підтримання, відпуску, завезення в Україну і вивезення штамів мікроорганізмів, токсинів і отрут тваринного та рослинного походження, які використовуються для потреб ветеринарної медицини та науки». Матеріал зразків, з якого походить ізолят, необхідно також знищити. Старші відповідальні особи, також як і відповідальна посадова особа або її заступник, перевірятимуть інвентаризаційний перелік і проводитимуть його вибірккову ревізію.

Діагностичні зразки розміщують у захисному контейнері та зберігають у закритому на замок холодильнику або у закритій на замок морозильній камері.

Після закінчення досліджень посіви (у пробірках, чашках тощо), шматочки органів або суспензії органів, взяті для зараження лабораторних тварин, пастерівські піпетки, трупи лабораторних тварин підлягають знезараженню. При виділенні з патологічного матеріалу збудників сибірки або спорових анаеробних мікроорганізмів їх знезаражують автоклавуванням протягом 1 години під тиском в 0,2 МПа (2,0 атм) або протягом 2 годин під тиском в 0,15 МПа (1,5 атм) з наступним контрольним висівом на відповідні поживні середовища. Такій самій обробці підлягає інструментарій, скло та інші предмети, які були в контакті з інфікованим матеріалом.

При виділенні неспорівих збудників або при негативних результатах бактеріологічних досліджень знезараження проводять автоклавуванням протягом 1 години під тиском в 0,15 МПа (1,5 атм.). При цьому інструментарій, скло та інші предмети, які були в контакті з інфікованим матеріалом, знезаражують кип'ятінням протягом 30 хвилин у 2% розчині гідрокарбонату натрію або обробляють 6%-им пероксидом водню впродовж 30 хв при нормі витрати 1 л на 1 м² площі, з інтервалом в 1 годину.

3.3 *Вимоги до документації.* Про всі отримані проби, їх дані зробити записи у робочому журналі, відправити інформацію до Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи та до Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України за формою, наведеною в додатку 7.

4 ПІДГОТОВКА ПРОБ

4.1 Підготовка проб для бактеріологічного дослідження

Для підготовки проб та у процесі бактеріологічного дослідження використовують лише стерильні розчини, посуд, інструменти, фільтри тощо. Всі види робіт проводять над кюветою з виконанням всіх умов, наведених в розділі 3.

4.1.1 Шматочки проб **м'язів, органів, тканин** від трупів вносять у ступку, подрібнюють ножицями або пестиком, додають 0,85% розчин натрію хлориду у співвідношенні 1:10 (на одну частину матеріалу 10 частин розчину) і ретельно перетирають.

Можна використати гомонізатор. Гомонізують окремо кожен пробу із додаванням фізіологічного розчину (1:10). Суспензію набирають через фільтр, шприцем або піпеткою та переносять у пробірку для подальших маніпуляцій.

4.1.2 **Воду з домішками мулу** фільтрують через марлевий фільтр (3–4 шари марлі). Для концентрування мікроорганізмів проби *чистої води* фільтрують через мембранні фільтри (№ 3) або центрифугують за 6000 об/хв впродовж 15 хв. Осад із кожного фільтру зішкрібають скальпелем (або подрібнюють фільтр ножицями) і

додають до нього 1–2 см³ 0,85% натрію хлориду. Осад після центрифугування ресуспендують в 1–2 см³ 0,85% натрію хлориду. Отриману завись використовують для дослідження. Відфільтровану воду знезаражують.

4.1.3 Тампони, які використовували для відбору **змивів** із об'єктів навколишнього середовища, віджимають об стінки пробірки та видаляють. Рідину, що залишилася, досліджують.

4.1.4 Від кожної проби **вовни** відбирають найбільш забруднені ділянки, подрібнюють їх ножицями та разом із пилом розміщують у колбі, в яку додають 10 частин 0,85 % (1:10) розчину натрію хлориду. Колбу закупорюють, ретельно струшують 10–15 хв, після чого відстоюють 15–20 хв. Для звільнення від грубих залишків суміш фільтрують через фільтр (3 шари марлі). Профільтровану рідину досліджують.

4.1.5 При дослідженні **шкіри** відбирають шматочки з різних місць проби масою 1 г, поміщають їх у фарфорову ступку і заливають 0,85 % розчином хлориду натрію з розрахунку 1:10. Залишають за кімнатної температури протягом 30–60 хвилин для розм'якшення шкіри. Після цього шматочки шкіри подрібнюють ножицями і залишають ще на 2–3 години за кімнатної температури. Потім проби ретельно розтирають пестиком у тому ж розчині до отримання волокнистої мезги. Мезгу віджимають пестиком об край ступки і видаляють.

4.1.6 Із проб **грунту** видаляють корінці рослин, камінці тощо і ретельно перемішують. Від кожної проби відбирають 2,5 г ґрунту, розміщують у скляну колбу і заливають 12 см³ розчину для екстракції (100 см³ дистильованої води, 1,22 г/см³ сахарози-тритону X–80. Потім струшують зразок протягом 1 хв, після чого збовтують на шейкері протягом 15 хв за 75 об/хв для осадження піни з поверхні суспензії. Відбирають 3 см³ рідини з поверхні надосадової рідини у стерильну пробірку, додають 6 см³ БСА/ФСБ (фільтрованого 1% бичачого сироваткового альбуміну у 0,01 моль/см³ фосфатно-сольовому буфері, рН 7,2) – для забезпечення осадження спор шляхом центрифугуванням. Зразки відцентрифугують за 5100 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину зливають та знищують, а до осаду додають 1 см³ БСА/ФСБ. Інкують на водяній бані за температури 63 °С протягом

20 хв. Можливе очищення спор в осаді шляхом використання 100 % етилового спирту (5 см³) протягом 1 год за кімнатної температури, але при цьому слід враховувати дію спирту на спори сибірки: під впливом етилового спирту спори *Bacillus anthracis* не гинуть, а проростають у нетипові колонії на МПА, що ускладнює ідентифікацію збудників. Потім проводять посів на середовища.

4.1.7 Порошкоподібні речовини, в т.ч. концентровані корми, готують аналогічно пробам ґрунту, використовуючи в подальшому надосадову рідину або розчин, якщо речовина розчинилася.

4.2 Підготовка проб для дослідження методом ПЛР

4.2.1 Мікроаутоплати не потребують попередньої обробки. Макроаутоплати масою 0,1–1 г розміщують у фарфорову ступку, додають 0,85% розчину натрію хлориду у співвідношенні 1:10, подрібнюють ножицями і розтирають пестиком до гомогенної консистенції. Отриману суспензію відбирають наконечником із фільтром (аерозольним бар'єром) в об'ємі 0,5 см³ у мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5–2 см³ із кришками, що закриваються і центрифугують 1хв при 5 000 об/хв на мікроцентрифузі. Надосад, що утворився, використовують для виділення ДНК.

4.2.2 Воду, змиви з об'єктів навколишнього середовища, проби ґрунту, кормів, шкірсировини, вовни попередньо оброблюють так само, як і для бактеріологічного дослідження, відбираючи для дослідження методом ПЛР 0,1–0,2 см³ водної фази зразку в мікроцентробіжні пробірки.

4.2.3 Підготовка матеріалу з підозрою на контамінацію *Bacillus anthracis*. Маніпуляції, що супроводжуються ризиком утворення аерозолів (струшування, центрифугування тощо) при обробці матеріалу виконують у боксах біобезпеки II класу захисту оператора. Всі маніпуляції, пов'язані з підготовкою проб, проводяться дозаторами зі змінним об'ємом із використанням одноразових поліпропіленових пробірок об'ємом 1,5 см³ та наконечників з аерозольним бар'єром.

Досліджуваний матеріал в об'ємі 0,1 см³ засівають в пробірки з 0,9 см³ бульйону Хоттінгера, рН 7,2±0,1, та інкубують за температури 37 °С протягом 2,5

год. Додають пеніцилін із розрахунку 1000 Од/ см³ та інкубують за температури 37° С протягом 15 хв. Після закінчення інкубації матеріал прогрівають на водяній бані 10 хв за температури 100° С, після чого 0,1 см³ оброблених зразків переносять в пробірки об'ємом 1,5 см³ та проводять виділення ДНК.

5 ПОРЯДОК ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

У лабораторії проводять ПЛР, мікроскопічне дослідження патологічного матеріалу, вивчають морфологію бактеріальних клітин, проводять посіви на поживні середовища, вивчають культуральні та гемолітичні властивості виділених культур, визначають їх патогенність та вірулентність, спороутворення та капсулоутворення, вивчають рухливість, ставлять реакцію преципітації (реакція Асколі), ІФА з сироватками крові тварин, РІФ, чутливість до антибіотиків, визначають протеолітичні властивості, токсиноутворення ін.

Зараження лабораторних тварин (біопроба) біологічним матеріалом, доставленим на дослідження, є обов'язковим і здійснюється в день доставки матеріалу одночасно з бактеріоскопією та висівами на поживні середовища.

Якщо вухо тварини доставлене знекровленим, його досліджують методом ПЛР та проводять реакцію преципітації. У разі доставляння несвіжого матеріалу – досліджують лише методом ПЛР та/або постановкою реакції преципітації.

5.1 Проведення дослідження методом ПЛР

Принцип *методу полімеразно-ланцюгової реакції* (ПЛР) був розроблений у 1983 році Кері Мюллісом. Можливість цілеспрямованого синтезу обраної ділянки ДНК, високі показники чутливості та специфічності, зробили новий метод одним з найбільш ефективних в лабораторній діагностиці.

ПЛР має ряд суттєвих переваг, а саме: 1) визначення наявності збудника. Традиційні методи діагностики (імуно-ферментний метод (ІФА) виявляють білки-маркери (антитіла або антигени), які являються продуктами інфекційного процесу

або структурними білками збудника, що дозволяє опосередковане уявлення про наявність інфекції. Виявлення специфічної ділянки ДНК збудника методом ПЛР вказує на наявність збудника інфекції; 2) висока специфічність методу ПЛР (в досліджуваному матеріалі виявляється специфічний (характерний саме для даного збудника) фрагмент молекули ДНК. Проведення ПЛР, на відміну від ІФА, виключає можливість отримання хибних результатів (перехресно-реагуючих антитіл); 3) висока чутливість методу ПЛР дозволяє виявляти навіть поодинокі клітини *B. anthracis*. ПЛР-аналіз виявляє наявність збудників в тих випадках, коли іншими методами (імунологічними, мікробіологічними та ін.) це зробити неможливо. Чутливість ПЛР-аналізу складає 10–100 клітин у пробі (чутливість імунологічних методів 1000 – 100000 клітин); 4) швидкість отримання результатів.

В основі ПЛР лежить виділення з досліджуваного зразка ДНК та проведення реакції ампліфікації заданої (вибраної) ділянки ДНК при використанні специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтеза комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою термостабільного фермента Таq-полімерази. Багаторазове циклічне повторення трьох стадій ПЛР – денатурація молекули ДНК, гібридизація (відпал) олігонуклеотидних праймерів з певним фрагментом ДНК-мішені та елонгація (добудова) компліментарних ланцюгів ДНК, супроводжується експоненціальним збільшенням числа копій специфічного фрагмента, що дозволяє провести наступну детекцію продуктів ПЛР методом електрофореза в агарозному гелі в присутності інтеркалятора – бромистого етидію. Цей флуоресцентний барвник здатний вбудовуватися між основами дволанцюгової ДНК, що призводить до різкого зростання його флуоресценції при збудженні ультрафіолетовим світлом (оптимальна довжина хвилі для візуалізації продуктів ПЛР – 300 нм).

Молекулярно-діагностичні дослідження по виявленню ДНК *Bacillus anthracis* в основному спрямовані на виявлення та ідентифікацію одних з головних факторів вірулентності сибірки – плазмід *pXO1* та *pXO2*. Геном *Bacillus anthracis* складається з хромосоми та двох великих плазмід (кільцеві молекули ДНК, які є позахромосомними факторами спадковості) – *pXO1*, яка несе ген протективного антигену (РА) сибіркового токсину та *pXO2*, яка несе ген капсули. Повністю

вірулентні ізоляти і штами *Bacillus anthracis* мають обидві плазмиди, а відсутність будь-якої плазмиди призводить до атенуації. Можливі 4 різні варіанти плазмідного складу у ізолятів та штамів збудника сибірки: наявність обох плазмід (*pXO1* та *pXO2*), відсутність обох плазмід або відсутність однієї з двох (табл. 1).

Таблиця 1 – Варіанти плазмідного складу у ізолятів та штамів збудника сибірки

Тип	Штам	Наявність						
		капсула	токсин	плазміда		патогеність		колонії
				<i>pXO1</i>	<i>pXO2</i>	людина	тварина	форма
1	Вірулентний	+	+	+	+	+	+	M
2	Вакцинний	-	+	+	-	-	-	R
3	Авірулентний	+	-	-	+	-	+	M
4	Непатогенний	-	-	-	-	-	-	S

Для виявлення плазмід *pXO1* та *pXO2* використовують мультиплексний варіант ПЛР з двома парами олігонуклеотидних праймерів (табл. 2).

Таблиця 2 – Мультиплексний варіант ПЛР

Назва праймеру	Послідовність праймеру* (5'→3')	Розмір фрагменту	Плазміда
OPA1F	TCCAGACCGTGACAATGATG	607 п.н.	<i>pXO1</i> (PA)
OPA5R4	CACGTTGTAGATTGGAGCCG		
CPS3FM	CACCAACCATCGTCATCG	377 п.н.	<i>pXO2</i> (капсула)
CPS9R	TTATCCTGTTATGCCATTTGAG		

*Патент України на корисну модель № 55775 від 27.12.2010, Бюл. №24

5.1.1.Обладнання для ПЛР

Діагностичні дослідження з використанням полімеразної ланцюгової реакції проводять в три етапи в окремих приміщеннях (зонах), які повинні бути оснащені необхідними матеріалами та обладнанням.

ЗОНА 1 (етап 1) - Для виділення ДНК із матеріалу, що досліджується:

- ламінарний бокс 2 класу захисту або настільний бокс із бактерицидною лампою;

- сухоповітряний термостат типу “dry-block” для мікропробірок з регулятором температури від 25° С до 100° С;

- мікроцентрифуга до $(10-12) \times 10^3$ об/хв;

- центрифуга/вортекс;

- вакуумний відсмоктувач;

- окремий набір автоматичних піпеток змінного об'єму;

- одноразові наконечники з аерозольним бар'єром;

- одноразові поліпропіленові пробірки об'ємом 1,5 см³ типу “еппендорф”;

- холодильник на 2-8° С з морозильною камерою на мінус 20° С.

ЗОНА 2 (етап 2) - Для проведення реакції ампліфікації (ПЛР):

- ампліфікатор (термоциклер);

- ПЛР-бокс чи окремий стіл з УФ-лампою;

- окремий халат і одноразові рукавички;

- окремий набір автоматичних піпеток змінного об'єму;

- одноразові наконечники в штативах;

- одноразові мікропробірки для ПЛР на 0,5 см³ або 0,25 см³;

- штативи для мікропробірок на 0,5 см³ або 0,25 см³;

- холодильник на 2-8° С, морозильник на мінус 20° С;

- термостат для мікропробірок з воском на 95° С.

ЗОНА 3 (етап 3) - Для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР:

- камера для горизонтального електрофорезу;

- джерело постійного струму з напругою 100-200 В;

- ультрафіолетовий транслюмінатор для перегляду гелів;

- цифровий фотоапарат для фотографування гелів;

- аквадистилятор;

- окремий халат і одноразові гумові рукавички;

- окрема автоматична піпетка 0,005-0,04 см³, наконечники та штатив для пробірок;

- мірний циліндр на 1,0 дм³;
- колба конічна з термостійкого скла для плавлення агарози;
- електроплитка або мікрохвильова піч для плавлення агарози;
- пластикова ємність для дезактивації буфера і гелів, що містять бромід етидію.

5.1.2 Постановка полімеразної ланцюгової реакції

ЕТАП 1. Виділення ДНК *Bacillus anthracis*. Для виділення ДНК можна використати комерційний набір "ДНК-сорб-В" (АмплиСенс, Росія). При проведенні аналізу використовують мікропробірки ємністю 1,5 см³.

Встановити в штатив необхідну кількість одноразових пробірок з розрахунку одна пробірка на кожен досліджуваний зразок та підписати їх. Продовжуючи ряд встановити пробірку для негативного контролю виділення (НКВ). В усі пробірки додати окремими наконечниками з аерозольним бар'єром по 0,3 см³ лізуючого розчину. Пробірки із лізуючим розчином можна зберігати тривалий час за температури 4–8 °С.

Увага! Лізуючий розчин прогріти перед використанням до повного розчинення кристалів осаду, оскільки за температури 4–8 °С в лізуючому розчині випадає осад.

У кожену пробірку вносять окремими наконечниками з аерозольним бар'єром по 0,1 см³ досліджуваних зразків. У пробірку НКВ додають 0,1 см³ стерильної деіонізованої води, щільно закривають кришки, перемішують на вортексі і центрифугують 5 с при 5 000 об/хв на мікроцентрифузі для видалення крапель із поверхні кришки пробірки. Ретельно перемішують на вортексі та прогрівають у термостаті за температури 65±0,5° С протягом 10 хв. Знову перемішують на вортексі та осаджують краплини центрифугуванням за 5000 об/хв протягом 5 с на мікроцентрифузі. Якщо зразок розчинився не повністю, пробірку центрифугують за 5 000 об/хв на протязі 1 хв і надосад переносять до нової мікропробірки.

Ретельно ресуспендують суспензію сорбенту на вортексі. В кожену пробірку окремим наконечником з аерозольним бар'єром вносять по 0,025 см³ ресуспендованого сорбенту. Перемішують на вортексі, залишають у штативі на 2 хв, ще раз перемішують і залишають на 10 хв. при кімнатній температурі.

Центрифугують пробірки для осадження сорбенту за 5 тис.об/хв протягом 30 с на мікроцентрифузі. Видаляють надосадову рідину, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремі наконечники для кожної проби.

Вносять у пробірки по 0,3 см³ розчину для відмивки №1. Перемішують на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугують 30 с за 5 000 об/хв на мікроцентрифузі. Видаляють надосадову рідину, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремі наконечники для кожної проби.

Вносять у пробірки по 0,5 см³ розчину для відмивки №2. Ретельно ресуспендують сорбент на вортексі. Центрифугують пробірки 30 с за 5 000 об/хв на мікроцентрифузі. Видаляють надосадову рідину, використовуючи вакуумний відсмоктувач і окремі наконечники для кожної проби.

Повторяють відмивку розчином для відмивки №2.

Поміщують пробірки в термостат за температури 65° С на 5–6 хв для підсушування сорбенту. При цьому кришки пробірок мають бути відкритими.

У пробірки вносять по 0,05 см³ ТЕ-буферу, використовуючи наконечники з аерозольним бар'єром. Перемішують на вортексі і прогрівають пробірки в термостаті за температури 65 °С протягом 5 хв, періодично струшуючи на вортексі. Пробірки центрифугують на максимальних обертах мікроцентрифуги (12 000–14 000 об/хв) протягом 1 хв. Надосадову рідину, що вміщує очищену ДНК, використовують для проведення ПЛР або переносять у нові мікропробірки об'ємом 0,5 см³ для зберігання.

Очищену ДНК можна зберігати до тижня за температури 2–4 °С, або заморозити за мінус 20 °С на тривалий термін зберігання.

ЕТАП 2. Приготування реакційної суміші та умови проведення ПЛР. Усі стокові розчини для ПЛР зберігати за температури мінус 20 °С. Ензим (Тақ-полімераза) дістають із морозильної камери (мінус 20 °С) безпосередньо перед використанням. Розморожують пробірки для приготування ПЛР-суміші та ретельно перемішують на вортексі. Осаджують краплини центрифугуванням за 5000 об/хв впродовж 5 с на мікроцентрифузі.

Готують реакційну суміш для зразків за протоколом приготування реакційної суміші для проведення ПЛР, наведеним у таблиці 3.

В залежності від типу ДНК ампліфікатора, використовують спеціальні пробірки, об'ємом 0,2 см³ або 0,5 см³.

Відбирають необхідну кількість пробірок об'ємом на 0,2 см³ або 0,5 см³. Продовжуючи ряд встановлюють пробірки для позитивного контрольного зразка (ПКЗ), негативного контрольного зразка (НКЗ) та негативного контролю виділення (НКВ).

Дістають пробірки з ПЛР-сумішню 1 та ретельно перемішують на вортексі. Осаджують краплини центрифугуванням за 5000 об/хв протягом 5 с на мікроцентрифузі.

Таблиця 3 – Реакційна суміш для проведення мультиплексного варіанту ПЛР

п/п	Реактив	на 1 реакцію (мкл)
ПЛР-суміш 1 (нижня фаза)		
1	dNTP, суміш нуклеотидтрифосфатів, 1,76 мМ	1,0
2	праймер ОРА1F (100 пкмоль/мкл)	0,15
3	праймер ОРА5R4 (100 пкмоль/мкл)	0,15
4	праймер СPS3FM (100 пкмоль/мкл)	0,10
5	праймер СPS9R (100 пкмоль/мкл)	0,10
6	стерильна Н ₂ О, вільна від нуклеаз, для ПЛР	3,5
7	віск	15,0
ПЛР-суміш 2 (верхня фаза)		
1	5-кратний ПЛР-буфер з 15мМ Mg ²⁺	5,0
2	Taq-полімераза, 5 од/мкл	0,5
3	стерильна Н ₂ О, вільна від нуклеаз, для ПЛР	9,5
ДНК		5,0
загальний кінцевий об'єм для реакції		25

Розкапають готову ПЛР-суміш 1 („нижня фаза”) по 0,005 см³ у чисті пробірки.

Пробірку з воском прогрівають у термостаті за температури 95 °С. На поверхню ПЛР-суміші 1 нашаровують по 0,015 см³ розплавленого воску. Закривають кришки пробірок і дають воску захолонути (20-30 хв). Якщо віск вкрив

рідину нерівно або утворилися пухирці, прогрівають пробірки 30 с за температури 95° С і охолоджують.

Пробірки з розкапаною ПЛР-сумішшю 1 можна зберігати за температури 4–8 °С.

На поверхню затверділого воску наносять по 0,015 см³ ПЛР-суміші 2 („верхня фаза”).

Використовуючи наконечники з аерозольним бар’єром до пробірок із реакційною сумішшю обережно вносять під мінеральну олію по 0,005 см³ зразка ДНК. Загальний об’єм реакційної суміші становить 0,025 см³.

У пробірку негативного контрольного зразку (НКЗ) вносять 0,005 см³ стерильної деіонізованої води, у пробірку позитивного контрольного зразку (ПКЗ) вносять 0,005 см³ відповідного позитивного контрольного зразку, а в пробірку негативного контролю виділення (НКВ) – 0,005 см³ зразку негативного контролю виділення.

Запрограмовують ампліфікатор згідно температурного режиму вказаного в таблиці 4.

Таблиця 4 – Програма температурного режиму проведення мультиплексного варіанту ПЛР

Праймери OPA1F / OPA5R4 та CPS3FM / CPS9R		
Етап	Режим	Кількість циклів
1	95 °С – 4 хв	1
2	94 °С – 30 с 60 °С – 20 с 72 °С – 30 с	35
4	72 °С – 4 хв	1
5	10 °С	зберігання

Після закінчення реакції збирають пробірки в поліетиленовий пакет і передають у кімнату для аналізу продуктів ПЛР, де проводять електрофоретичний поділ фрагментів ДНК в агарозному гелі.

ЕТАП 3. Електрофоретичний аналіз продуктів методом ПЛР

Робота з ампліфікованою ДНК повинна проводитися в окремій кімнаті. Аналіз продуктів ампліфікації можна провести шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5% гелі агарози.

У мірний циліндр вносять вміст пакету з сухою сумішшю ТБЕ буферу або концентрат (50x) ТАЕ буферу та доводять дистильованою водою до 1,0 дм³, закривають циліндр парафінованою плівкою ("PARAFILM") і перемішують.

Вміст пакету з агарозою переносять у термостійку колбу об'ємом 250 см³ та доводять об'єм буфером для електрофорезу до 100 см³. Після чого суміш обережно перемішують, доводять до кипіння та охолоджують до температури 62±2° С. Вносять до агарози 0,01 см³ розчину броміду етидію і ще раз перемішують.

Увага! Бромід етидію – сильний мутаген та канцероген. Працювати лише у гумових рукавичках.

Заливають агарозний гель у форму (товщина гелю 5–6 мм) і розміщують гребінки. Після повного загустіння гелю (30 хв за кімнатної температури) обережно виймають гребінку, не зашкодивши лунки.

Поміщають готовий гель в електрофоретичну камеру так, щоб лунки були звернені убік негативного електрода (ДНК із лунок буде рухатися до позитивного електрода). Наливають у камеру електрофорезний буфер так, щоб він покрив гель на 4–5 мм зверху.

Виставляють пробірки з продуктами ампліфікації у штатив послідовно. Відбирають 0,01 см³ ПЛР продукту і вносять на дно лунки. Можна скористатися одним наконечником, промиваючи його буфером з камери після внесення кожної проби.

У крайні лунки гелю вносять по 0,005 см³ відповідного маркеру, наприклад – «100 bp DNA Ladder» (Fermentas).

Підключають камеру до джерела струму, дотримуючись полярності. Електрофорез проводять у градієнті напруги 10 В/см до того моменту, як блакитний барвник (ксиленціанол) пройде приблизно 1,0-1,5 см від лунок гелю.

Виключають джерело струму і переносять гель на скляний фільтр транслюмінатора, розташували смуги горизонтально лунками нагору. Переглядають розташування смуг ДНК під ультрафіолетовим випромінюванням.

Увага! Очі й обличчя повинні бути захищені спеціальною маскою чи скляною пластиною!

Електрофореграму можна фотографувати за допомогою цифрових фото- або відеосистем.

Після використання буфер і гелі, що містять бромід етидію необхідно дезактивувати. Для цього до однієї частини буферу і гелів додати рівні частини 0,5 М перманганату калію (KMnO_4) і 2,5 М соляної кислоти (HCl), витримати 4–6 годин, додати одну частину 2,5 М гіроксиду натрію (NaOH), обережно перемішати і скинути нейтралізовані реактиви в каналізацію.

5.1.3 Облік результатів ПЛР аналізу на виявлення ДНК *Bacillus anthracis*

Оцінюють наявність смуг на всіх доріжках ампліфікованих ДНК зразків.

Проведення ПЛР-аналізу вважають коректним, якщо на доріжці ПКЗ присутні дві смуги в 607 п.н. та 377 п.н., а на доріжці з НКЗ та НКВ ніяких смуг немає (рис.3).

Результати аналізу вважаються негативними, якщо на доріжках зі зразками відсутні смуги в 607 п.н. та 377 п.н..

Результати аналізу не враховуються, якщо на доріжці негативного контролю виділення (НКВ) виявляються неспецифічні смуги – результат не можна вважати достовірним.

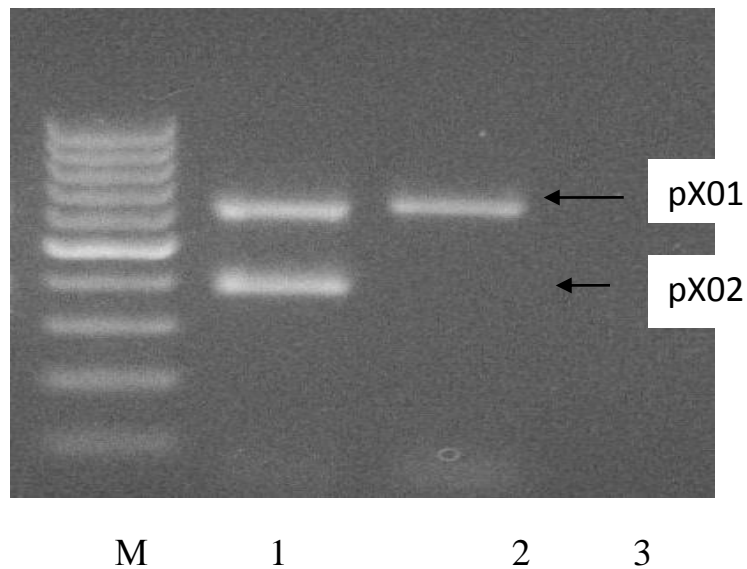


Рис. 3. Результат електрофоретичного аналізу продуктів мультиплексного варіанта ПЛР з праймерами OPA1F/OPA5R4 та CPS3FM/CPS9R по виявленню плазмід рХ01/рХ02 *Bacillus anthracis*. Варіанти: М – маркер “100 bp DNA Ladder” (Fermentas), 1 – штам Ценковського-2 (рХ01⁺, рХ02⁺), 2 – штам 55 (рХ01⁺, рХ02⁻), 3 – негативний контрольний зразок (К-).

5.2 Мікроскопічні дослідження

Виготовлення препаратів відбитків та препаратів-мазків, результати мікроскопії. Наступна процедура повинна проводитися у шафі біологічної безпеки.

5.2.1 Із надісланого патологічного матеріалу готують декілька (3–4) препарати, які висушують на повітрі та фіксують етиловим спиртом із вмістом 3 % перекису водню (див. п.5.2.2) (фіксовані мазки дозволяється зберігати в холодильнику в закритій бактеріологічній чашці до встановлення діагнозу) (див. п. 5.2.1.1), потім фарбують за методом Грама (див. п. 5.2.6), методом на наявність капсули за Ребігером або Міхіним, Ольтом, Романовським-Гімза, Мак-Фейдієном [10,11], Бурі (див. п. 5.2.1.3) та виявляють спори у зразках із зовнішнього середовища, фарбуючи за методом Пешкова, чи методами Меллера, Златогорова, Ожешко, Ракетте та малахітовим зеленим (див. п. 5.2.5).

У мазках із свіжого патологічного матеріалу спостерігають обрубані або злегка увігнуті палички *Bac. anthracis*, довгі ланцюжки із паличок («потяг з товарними вагонами», «бамбукова тростина»), оточені капсулою.

У препаратах-мазках із крові чи спинномозкової рідини палички з капсулою збільшені, із заокругленими краями. В організмі тварин бацили з капсулою виявляються через 2–3 год після зараження, але в цей період їх виявляють лише в регіональних лімфатичних вузлах та в місцях проникнення збудника. Оскільки в даних місцях часто затримуються бактерії і інфікування відбувається раніше, ніж генералізація сибіркового процесу.

При фарбуванні мазків із несвіжого патологічного матеріалу бацили можуть бути дещо збільшеними, із округлими кінцями, морфологічна форма бацил порушена (вони ніби «погризені»), інколи лишаються «тіні», а замість капсул залишаються лише слабо-профарбовані фрагменти.

У мазках із 18–24 годинних бульйонних та агарових культур вегетативні клітини мають форму паличок, розташованих у вигляді довгих ланцюжків (рис. 4). Кінці бацил у пофарбованих препаратах «обрубані» і злегка увігнуті в середину. Спори мають овальну форму і розташовуються центрально (в середині) бактеріальної клітини. У клітини утворюється лише одна спора, яка має діаметр не більший діаметру самої мікробної клітини (див. також п. 6.1).

За результатами мікроскопії негайно дають попередню відповідь.



Рис. 4. Ланцюжки з клітин *Bac. anthracis* зі спорами

5.2.2 *Метод фіксації мазків в етиловому спирті з додаванням 3 % перекису водню.* За даного методу фіксації у препаратах-мазках спорові і вегетативні форми *Bac. anthracis* знезаражуються через 30 хв, проте не порушується морфологія бацил і специфічність світіння за фарбування люмінісцентними сироватками.

Для приготування фіксуючої рідини у флакон наливають 180 см³ етилового спирту 96° і 20 см³ 30 %-ного пергідролю. Вміст перекису водню в пергідролі, за необхідності, визначають за методикою, викладеною в Державній фармакопеї.

Фіксууючу рідину можна використовувати протягом місяця, флакон закривають притертим корком і зберігають в темному місці за кімнатної температури.

Мазки готують на чистих знежирених скельцях загальноприйнятим методом, висушують на повітрі і занурюють в посуд з фіксуючою рідиною. Через 30 хв препарати-мазки витягують і висушують на повітрі. Витримувати мазки більш 30 хв в фіксуючій рідині небажано. Подальші маніпуляції з препаратами проводять як із знезараженим матеріалом.

5.2.3 *Техніка фарбування за Грамом.* Фіксований мазок накривають смужкою фільтрувального паперу, на який наливають на 2–3 хв розчин карболового генціанвіолету. Потім папір знімають, залишки барвника зливають і наливають на мазок розчин Люголя на 1–2 хв, після чого його зливають,

наносять на 30–40 с 96° етиловий спирт. Препарат ретельно промивають водою і додатково фарбують 0,1% водним розчином карболового фуксину чи сафраніну (1–2 хв). Потім препарат промивають водою, висушують і мікроскопують під імерсійною системою. За результатами фарбування бактерії поділяють на грампозитивні, що сприймають фіолетове забарвлення і не знебарвлюються під дією спирту та грамнегативні, що після фарбування 0,1% водним розчином карболового фуксину чи сафраніну набувають рожево-червоного забарвлення.

У мазках, пофарбованих за методом Грама (рис. 5), *Bac. anthracis* має вигляд грампозитивних прямих паличок, які розміщуються короткими ланцюжками або попарно.

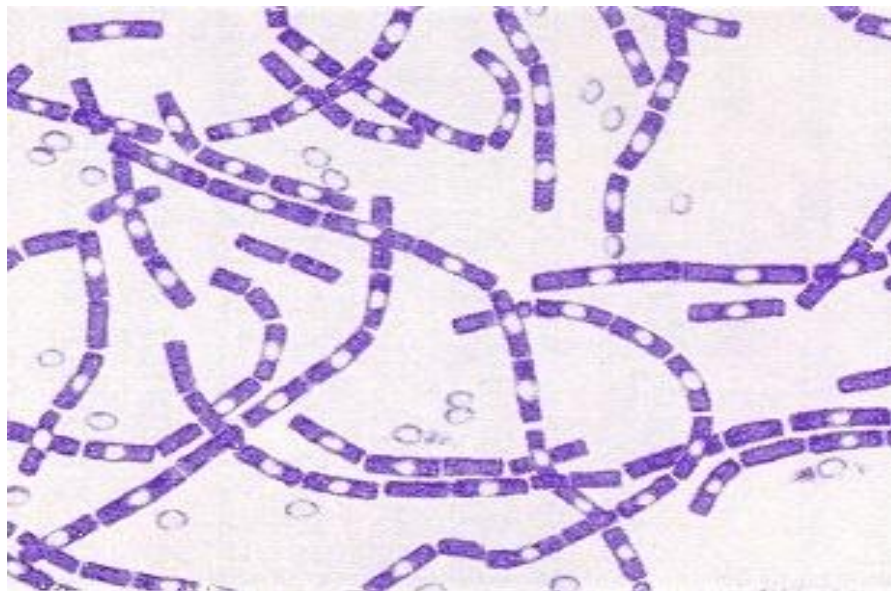


Рис. 5. *Bac. anthracis* (фарбування за Грамом), 1000х

Внутрішні краї паличок різко обрубані, зовнішні, вільні кінці, як правило, округлі. В окремих випадках (частіше у мазках із крові людини або свиней) форма збудника сибірки може бути нехарактерною – короткі товсті, або вигнуті палички, інколи зернисті з потовщенням по середині чи на кінці, можливі «тіні» мікроорганізмів (пусті капсули), які утворюються у трупах тварин, оскільки бацила менш стійка до гниття ніж капсула.

5.2.4 Методи фарбування капсул. Метод Ребігера. На нефіксований мазок наносять на 0,5 – 2 хв розчин генціанвіолету у формаліні (15–20 г фарби у 100 см³ 40%-ного розчину формаліну). Потім препарат промивають дистильованою водою, до тих пір, поки з препарату не буде стікати чиста прозора вода. Тіла мікробних клітин фарбуються у фіолетовий колір, а капсули – у рожевий.

Метод Міхіна. Фіксований мазок фарбують метиленовим синім за Леффлером 2–3 хв при підігріві над полум'ям до появи пару. Потім мазок швидко промивають водою, висушують. Тіла мікробних клітин фарбуються у темно-синій колір, капсули – у світло-рожевий.

Метод Романовського-Гімзи. На фіксований мазок наносять розчин фарби Романовського-Гімзи в розведенні 1:10 і витримують 40–50 хв, потім промивають водою, висушують. Тіла мікробних клітин фарбуються у темно-синій колір, капсули – у світло-рожевий.

Фарбування за Мак-Фейдісном. Зробіть препарат-мазок із крові, чи препарат-відбиток із тканин загиблої тварини. Дайте предметному склу висохнути на повітрі, близько, п'яти хвилин.

Помістіть предметне скло у конічну пробірку з кришкою об'ємом 50 см³ пластикову, що загвинчується, у якій міститься абсолютний метанол (або етанол) на 1 хв, щоб зафіксувати мікроскопічний препарат. Предметне скло висушіть на повітрі, щонайменш, п'ять хвилин.

Нанесіть на препарат розчин для фарбування – метиленовий синій (0,3 г метиленового синього розчинити в 30 см³ 95 % етанолу, додати 100 см³ 0,01 % гідроокису калію (КОН). Необхідно, щоб фарба вистояла протягом 1 року для окислення і дозрівання). Все предметне скло не треба заливати розчином для фарбування. Час фарбування складає 20–30 с.

Промивайте предметне скло дистильованою водою протягом 5–10 с. Використану на цьому етапі воду необхідно зібрати у контейнер, який містить 0,5 % натрію гіпохлориду, виготовленого у день використання. Дайте висохнути виготовленому препарату на повітрі, щонайменш, п'ять хвилин. Коли мазок висохне, накрийте його покривним склом. Закрийте краї покривного скла за

допомогою лаку для нігтів. Дайте лаку для нігтів висохнути. Змочуйте препарати свіжим 10 % розчином натрію гіпохлориту протягом 20 хв (1–2 см³), потім – 70 % спиртом (1–2 см³).

Помістіть препарат у стерильну пластикову чашку Петрі. Закрийте та склейте низ та верх чашки у двох місцях, щоб кришка не сповзала. Перемістіть чашки до світлового мікроскопу.

Використайте об'єктив X100 із імерсійною олією. Капсула рожева/червона навколо синіх/чорних бактерій.

Метод Бурі. На середину предметного скельця наносять крапельку туші і змішують її з краплею культури. Виготовляють мазок ребром покривного скельця, дають висохнути. На чорному фоні видно, під час мікроскопії, не зафарбовані бактерії, капсули (рис. 6, 7).



Рис. 6. Вірулентний, капсульний штам *Bac. anthracis* (за методом Бурі), 1000x

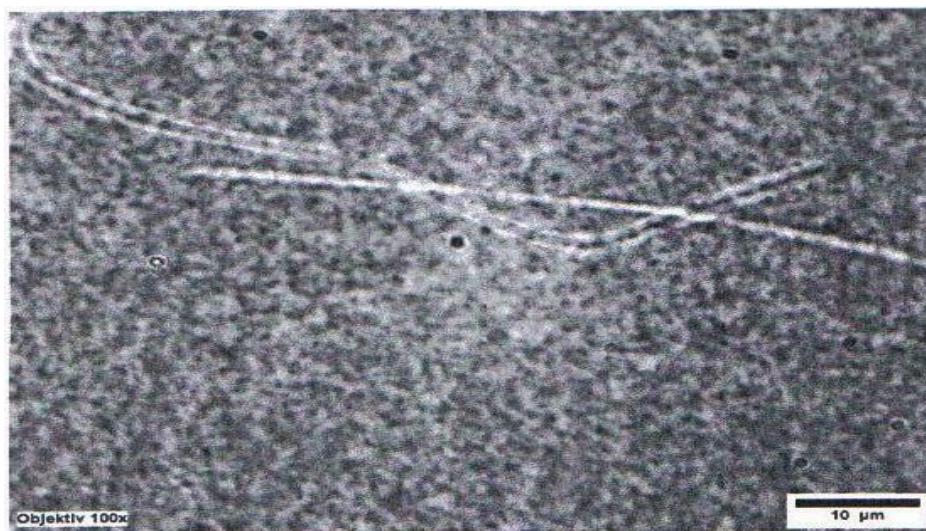


Рис. 7. Авірулентний, безкапсульний штам *Bac. anthracis* (за методом Бурі), 1000х

Метод Ольта. На фіксований мазок наносять 2%-ний розчин сафраніну на 5–7 хв, підігрівають, потім обережно промивають і висушують. Бактеріальні клітини фарбуються у червоно-коричневий колір, а капсули – у жовто-помаранчевий.

5.2.5 Методи фарбування спор. *Метод Пешкова.* Цей метод найбільш простий і демонстраційний. На фіксований мазок наносять розчин метилової синьки за Леффлером і підігрівають до кипіння, після чого промивають водою і додатково фарбують 0,5%-ним водним розчином нейтрального червоного протягом 30 с, потім промивають водою, висушують і мікроскопують. Спори фарбуються в синій колір, молоді спори – у чорно-синій, а вегетативні форми – у рожевий.

Метод Меллера. Фіксований мазок абсолютним метанолом (або етанолом) обробляють 2–3 хв 5%-ним розчином хромової кислоти, промивають водою, висушують, накривають смужкою фільтрувального паперу і наносять фуксин Ціля на 5–7 хв, підігріваючи до утворення пару. Папір знімають, мазок знебарвлюють 5–7с 5%-ним водним розчином сірчаної кислоти, промивають водою і дофарбовують 2–3 хв метиленовим синім Леффлером. Ретельно промивають водою, висушують і мікроскопують. Спори фарбуються у червоний колір, а вегетативні клітини – в синій.

Метод Златогорова. Відрізняється від попереднього тим, що препарат не обробляють розчином хромової кислоти. Спори фарбуються у червоний колір, а вегетативні клітини – в синій.

Метод Ожешко. На мазок нанесіть 1–2 краплі 0,5 % розчину хлористоводневої кислоти, підігрійте скельце з мазком на полум'ї до появи пари протягом 1–2 хв, дають скельцю охолонути, зливають кислоту і промивають водою. Висушують та фіксують мазок хімічним способом. Виконайте фарбування препарату методом за Ціля-Нільсеном. Спори – забарвлюються в червоний колір, вегетативна клітина – у синій.

Фарбування малахітовим зеленим. Щоб приготувати 5 % розчин малахітового зеленого, розчиніть 5 г малахітового зеленого у 100 см³ деіонізованої води (малахітовий зелений є світлочутливим барвником; тому необхідно зберігати у темному місці. Див. інструкції виробника щодо стабільності та умов зберігання малахітового зеленого).

УВАГА! Барвник малахітовий зелений є токсичним, вдихання його парів або контакт із шкірою може бути небезпечним. Приготування розчину малахітового зеленого необхідно проводити у хімічній витяжці. Або ж можна використати ШББ II (тип В2), яка також забезпечить захист від хімічних випаровувань.

Перед фарбуванням перевірте барвник на відсутність забруднення, формування кристалів або осаду. Якщо необхідно, профільтруйте його, щоб видалити осад/кристали. Розташуйте фіксовані препарати на піддоні для фарбування. Залейте препарати малахітовим зеленим. Встановіть таймер на 45 хв та фарбуйте за кімнатної температури (18–25 °С). Час фарбування можна зменшити, якщо застосувати нагрівання (на нагрівальному блоці за температури 70 °С, доки барвник не почне випаровуватися, потім залиште препарат за кімнатної температури (18–25 °С) на 3 хв. Обережно промивайте препарати деіонізованою водою (можна водопровідною) протягом кількох секунд. Обережно залийте препарати 2% розчином сафраніну на 1 хв. Обережно промийте водою протягом декількох секунд. Промокніть препарат фільтрувальним папером; утилізуйте використаний фільтрувальний папір у контейнер для біологічних відходів.

Діагностуйте виготовлені препарати під мікроскопом за допомогою об'єктиву 100X з імерсійною олією. Ідентифікаційні критерії: позитивний результат: світлі зелено-сині спори.

Уламки або сторонні речовини на мікроскопічному препараті можуть утримувати барвник малахітовий зелений. Ендоспори мають невеликі розміри та, зазвичай, овальної форми. Великі або неправильної форми глобули зеленого кольору, які з'являються на препараті, можуть бути сторонніми речовинами (рис. 8).

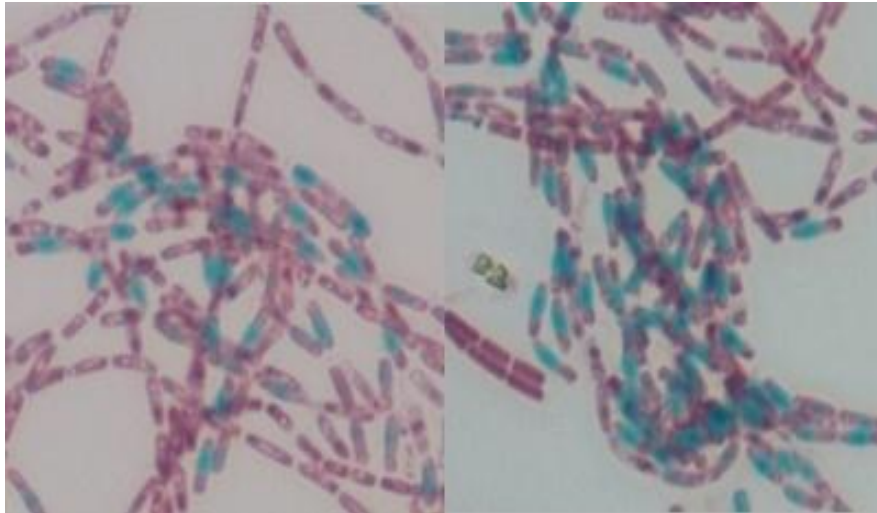


Рис. 8. *Bac. anthracis* фарбована малахітовим зеленим. Вегетативні клітини забарвлені у червоний колір, а спори – зеленого кольору

Неправильна фіксація мікроскопічного препарату може вплинути на якість фарбування. Колір може через кілька днів зникнути.

5.3 Реакція преципітації за Асколі

5.3.1 Реакція дозволяє в короткі терміни виявити сибірковий антиген в екстрактах із шкіри та органів загиблих тварин, а також у несвіжому біологічному матеріалі. Необхідно також враховувати, що в даний час для вичинки шкір використовуються різні види кислот і лугів, які можуть впливати на результати реакції преципітації. Значення рН для екстрактів повинно знаходитися в межах 6,0–8,0. За необхідності підлуження розчину рН доводять 10% розчином їдкого натрію, 10 % розчином карбонату натрію, за необхідності підкислення – 20% розчином хлористоводневої кислоти (можливо інша).

Для постановки реакції необхідно мати преципітуючу сибіркову сироватку, екстракт матеріалу, що досліджується, нормальну сироватку (сироватку без антитіл

до збудника сибірки), стандартний сибірковий антиген (позитивний контроль) та негативний контроль (в якості негативного контролю можливе використання екстракту шкіри клінічно здорової тварини або стандартизованого антигену, виготовленого із бактерій групи антракоїдів).

5.3.2 Перед постановкою реакції свіжий біоматеріал попередньо витримують протягом 18–20 год у термостаті за температури 37 °С, несвіжий – екстрагують відразу. Екстрагування здійснюють гарячим або холодним способом. При цьому слід враховувати, що екстракти, отримані гарячим методом, містять менше преципітинів.

5.3.3 Для екстрагування гарячим способом біологічний матеріал подрібнюють, поміщають у пробірку або колбу, заливають 0,85% розчином натрію хлориду у співвідношенні 1:10 і кип'ятять 30–40 хв на водяній бані. При холодному способі екстрагування – не кип'ятять, а залишають протягом 16–18 год за температури 20±2 °С.

Отримані екстракти фільтрують до повної прозорості через азбестову вату, фільтрувальний папір чи вату, попередньо змочені 0,85% розчином натрію хлориду. При цьому перші краплі фільтрату видаляють.

5.3.4 Реакцію виконують шляхом нашаровування або підшаровування. За нашаровування у пробірки Уленгута вносять 0,2–0,3 см³ прозорої преципітуючої сироватки, а потім піпеткою з тонким капіляром обережно, не допускаючи змішування, нашаровують таку ж кількість екстракту. Між рідинами повинна бути видна чітка тонка лінія преципітації (Елек-тест) (рис. 9).

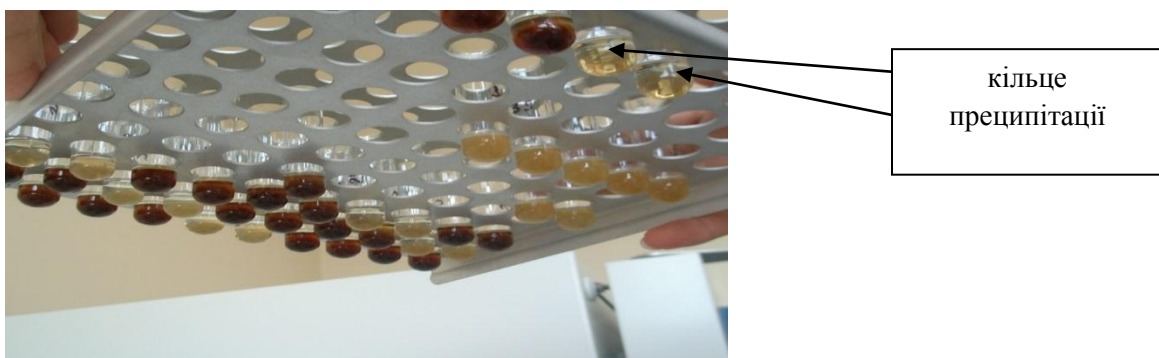


Рис. 9. Позитивна реакція преципітації.

При підшаровуванні – у пробірки вносять 0,2–0,3 см³ екстракту, потім, під нього, піпеткою обережно підшаровують рівну кількість преципітуючої сироватки.

Якщо між рідинами відсутня чітка тонка лінія преципітації (негативний результат реакції преципітації з екстрактом) реакцію ставлять повторно.

5.3.5 Одночасно ставлять 3 контрольні проби: 1) преципітуюча сибіркова сироватка з стандартним сибірковим антигеном; 2) преципітуюча сибіркова сироватка з екстрактом шкіри клінічно здорової тварини або стандартний антиген із антракоїдів; 3) нормальна сироватка з стандартним сибірковим антигеном.

За *позитивної реакції* через 1–2 хвилини після з'єднання досліджуваних компонентів повинне з'явитися характерне кільце преципітації. У пробірці із преципітуючою сибірковою сироваткою та стандартним сибірковим антигеном має бути чітке кільце преципітації. У пробірці із нормальною сироваткою та сибірковим антигеном кільце преципітації має бути відсутнє. Проводяться пробірки на темному фоні при достатньому боковому освітленні.

5.3.6 Реакцію вважають позитивною, коли на границі двох рідин не пізніше, ніж за 15 хв, утворюється тонке каламутно-біле кільце преципітації. За сумнівної реакції утворення кільця спостерігають пізніше, ніж за 15 хв. Якщо кільце відсутнє – реакція вважається негативною.

5.3.7 Реакцію преципітації за Асколі можна використовувати як експрес-метод для виявлення специфічних сибіркових антигенів у досліджуваних культур. Для цього в 0,25–0,5 см³ 0,85% розчину натрію хлориду ресуспендують бактеріологічну петлю добової агарової культури. Екстрагування проводять гарячим методом, а постановку реакції – як описано вище. Облік результатів реакції враховують протягом 3 хв.

5.4 Бактеріологічний метод дослідження

5.4.1 Висіви патологічного та біологічного матеріалу проводять у м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), у бактеріологічні чашки з МПА або бульйон і агар Хоттінгера з рН 7,4±0,2, на кров'яний агар. Для посіву однієї проби слід використовувати не менше 5 чашок чи пробірок. Поверхня агару перед посівом

повинна бути підсушена! Висіви здійснюють за допомогою стерильного шпателя методом Дригальського, наносячи попередньо на поверхню агару 1–2 краплі (приблизно 0,1 см³) суспензії патологічного або біологічного матеріалу. Посіви культивують у термостаті за температури 36±1 °С протягом 18–20 год, за відсутності росту – витримують ще 48 год за тієї ж температури.

5.4.2 Через добу культивування збудник сибірки у середовищі МПБ на дні пробірки утворюється пухкий осад у вигляді «шматочка вати», бульйон залишається прозорим (рис. 10).

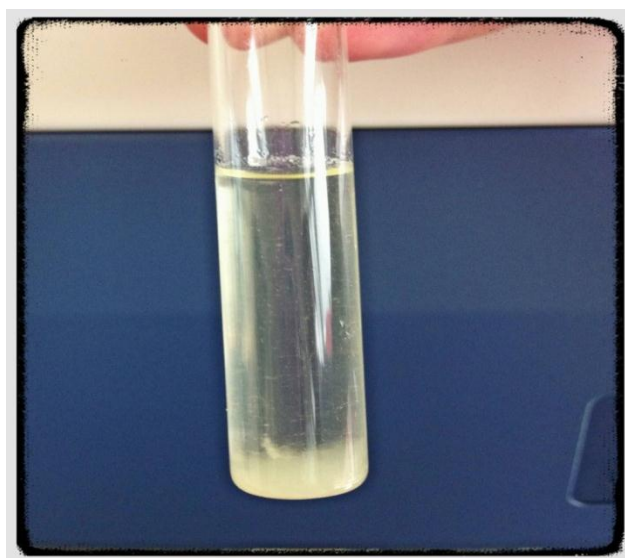


Рис. 10. Ріст *Bac. anthracis* у середовищі МПБ у вигляді «шматочка вати»

При струшуванні пробірки бульйон не мутніє, а осад розбивається на дрібні пластівці. В окремих випадках (на перших етапах культивування) у МПБ утворюється дифузний ріст культури (легке помутніння), при струшуванні утворюються муарові хвилі, а при більш тривалому культивуванні на поверхні бульйону може спостерігатися ріст у вигляді пристінного кільця.

Із бульйонної культури (6 – 24 год) готують препарати-мазки, які фарбують за методом Грама, досліджують під мікроскопом [7–9]. У мазках із типової бульйонної культури спостерігаються довгі ланцюжки, утворені грампозитивними сибірковими

паличками, у мазках із бульйонної культури з дифузним ростом – окремі або розташовані попарно палички.

Із метою отримання чистої культури, з бульйону проводять пересіви на щільні поживні середовища петлею по секторах для отримання окремих колоній (методом Дригальського).

5.4.3 Через 18–20 год ріст на щільних середовищах продивляються візуально та під малим збільшенням мікроскопу. Колонії *Bac. anthracis* на середовищах слід відрізнити від колоній інших спороутворюючих мікроорганізмів, морфологічно подібних *Bac. anthracis*.

Збудник сибірки утворює великі, матово-сірі, сіро-білі шорсткі колонії (R-форми). Типовим для молодих колоній сибірки є наявність тонких відростків-"вусиків". Центр їх іноді темніший, периферія у вигляді бахроми з кучероподібними відростками.

Під об'єктивом мікроскопа x10–40 колонії мають вигляд локонів, які утворені з сплетінь довгих клітин у вигляді ниток, що нагадують «голову медузи» чи «гриву лева». Зустрічаються колонії з менш вираженою шорсткістю та без кучероподібних відростків, гладенькі, з рівними краями S-форми (слабовірулентні, авірулентні) [7–9]. Типові та нетипові колонії піддають подальшій ідентифікації.

Для виділення чистої культури з агару знімають не менше 10 колоній. Якщо їх кількість менша – знімають усі колонії. При морфологічній оцінці колоній необхідно враховувати існування рідкісних варіантів *Bac. anthracis*. Ці варіанти відносять до 2-го типу, який формує слизисті колонії M-форми на МПА та агарі Хоттінгера (рис. 11, 12). Виявляють також і G-форми (карликові, росинчасті).



Рис. 11. *Bac. anthracis* на МПА

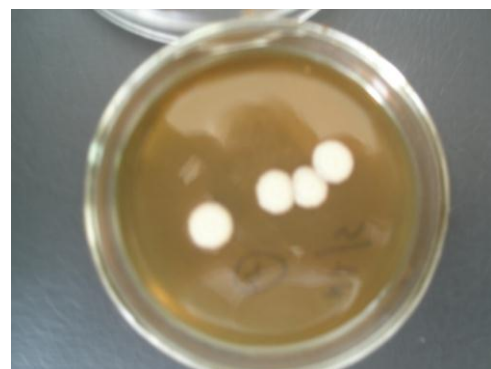


Рис. 12. *Bac. anthracis* на Хоттінгера

5.4.4 Для індикації *Bac. anthracis* із старих несвіжих, гнилих зразків, тваринницької сировини та проб навколишнього середовища, коли є підозра про їх контамінацію сторонньою мікрофлорою, проводять паралельний висів на диференційно-діагностичне середовище з 0,01% фенолфталеїнофосфату натрію (додаток 2) або на агар PLET (polymyxin, lysozyme, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), tallous acetate) [12].

Досліджувану суспензію в пробірці поміщають у водяну баню за температури 80 ± 1 °C на 15–20 хв для інактивації вегетативних форм і температурного шоку спор. Потім готують ряд десятикратних розведень до 10^{-3} . Із кожного розведення проводять посіви по 0,1–0,2 см³ на кров'яний агар, диференційно-діагностичне середовище з 0,01% фенолфталеїнофосфату натрію або по 0,2–0,3 см³ на агар PLET. Посіви розміщують у термостаті за температури 36 ± 1 °C на 18–20 год. Ріст на бактеріологічних чашках із PLET-агаром враховують через 48 год (рис. 13).



Рис. 13. Ріст *Bac. anthracis* на PLET-агарі

Культури, які вирости на диференційно-діагностичному середовищі з 0,01% фенолфталеїнофосфату натрію перед переглядом обробляють парами аміаку (**тест на лужну фосфатазу**). Для цього в окрему кришку чашки Петрі розміщують фільтрувальний папір і наливають 1–2 см³ розчину 25% аміаку. Потім чашку з посівом (дном догори) на декілька секунд розміщують у кришку з аміаком. У такий спосіб обробляють усі посіви.

Колонії збудника сибірки колір не змінюють. Колонії спороутворюючих сапрофітів (у т.ч. і *Bac. cereus*) набувають рожевого або червоного кольору (рис. 14,

15, 16). Для виділення чистої культури відбирають колонії, що не змінили свого кольору після обробки парами аміаку або мають злегка рожевий колір.

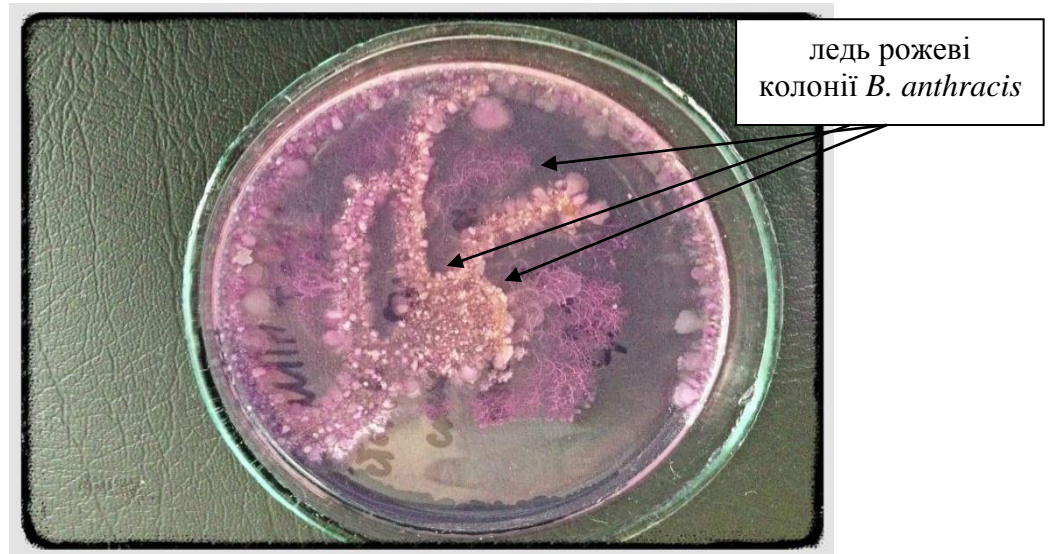


Рис. 14. *Bac. anthracis* на диференційно-діагностичному середовищі з 0,01% фенолфталеїнуфосфатом натрію, обробленому парами аміаку



Рис. 15. *Bac. anthracis* на диференційно-діагностичному середовищі з 0,01% фенолфталеїнуфосфатом натрію, не обробленого парами аміаку

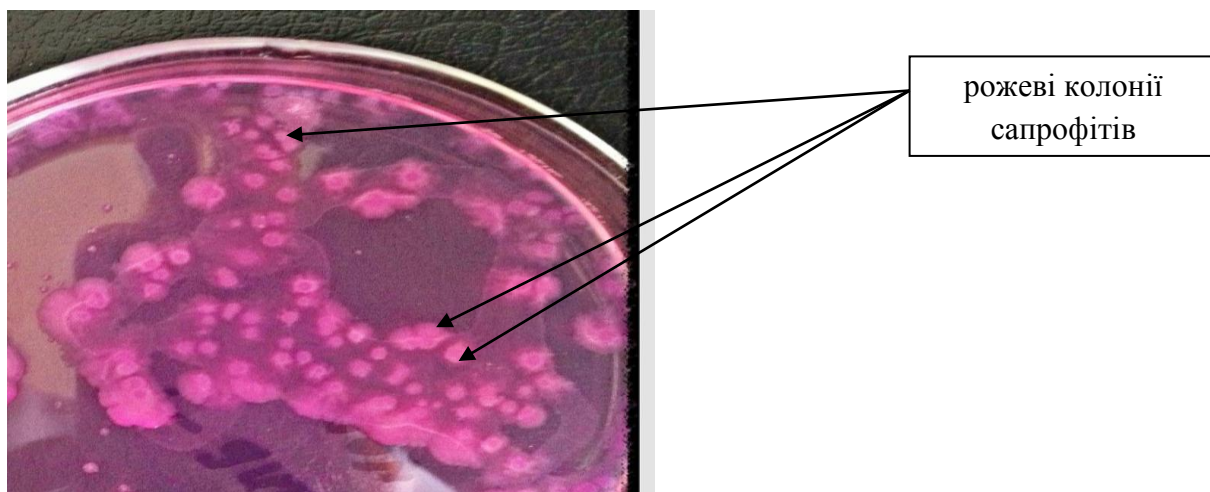


Рис. 16. Близькоспоріднені, за культурально-морфологічними особливостями мікроорганізми на диференційно-діагностичному середовищі з 0,01% фенолфталеїнуфосфатом натрію, обробленому парами аміаку

5.5 Характер росту на поживних середовищах (культуральні властивості)

Характер росту на агарових середовищах визначають візуально неозброєним оком, або через лупу та під мікроскопом. Для цього чашку розміщують на столику мікроскопа до гори дном і продивляються колонії в прохідному світлі при малому збільшенні та звуженій діафрагмі. Ріст колоній оцінюють за наступними показниками: величина, форма, колір, характер поверхні і краї, прозорість, структура, консистенція [13] (див. далі).

При використанні диференційно-діагностичного середовища з фенолфталеїнуфосфатом натрію враховують одночасно дві ознаки – характер росту колоній (колонії R-форми) і тест на лужну фосфатазу (колонії після обробки парами аміаку мають злегка рожевий колір). У МПБ збудник сибірки росте, як описано в п 5.4.

5.6 Тест на рухливість

Однією з найбільш стабільних ознак *Bac. anthracis* є відсутність рухливості, що є типовим для бацил. Її можна визначати мікроскопією 18–20 годинної бульйонної

культури методом “висячої” чи ”роздавленої“ краплі, методом Шукевича чи у камері Горяєва.

Але краще проводити цей тест шляхом висіву культури методом уколу у стовпчик спеціального середовища для аналізу рухливості, у пробірці з ТТХ (тетразолієвий червоний-2,3,5 тетрафеніл тетразол хлоридом), або у напіврідкий (0,2–0,3%) агар. Посіви інкубують за температури 36 ± 1 °С протягом 18–20 годин. У середовищі ріст збудника сибірки спостерігається лише по сліду уколу, а середовище залишається прозорим без ознак росту культури. Рухливі бацили дають дифузний ріст у товщу живильного середовища (рис. 17).

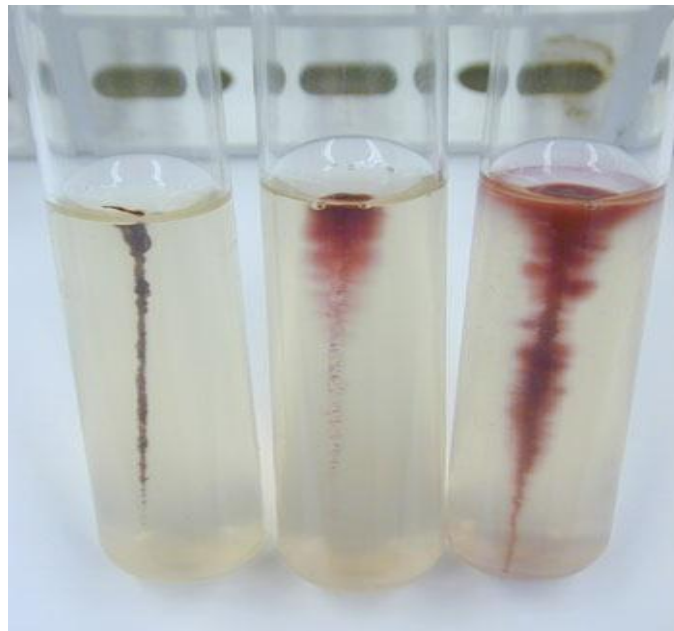


Рис. 17. Ріст мікроорганізмів на середовищі, яке містить ТТХ. Культура зліва є нерухливою, а культури посередині та справа – рухливі

Рекомендуємо використовувати позитивний контроль (рухливі мікроорганізми): *Escherichia coli* (ATCC 25922 або еквівалент); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 або еквівалент). Негативний контроль: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 або еквівалент); *Acinetobacter spp.* (ATCC 49139 або еквівалент). Якщо контрольні мікроорганізми не поведуться, як очікувалося, тест необхідно повторити.

5.7 Наявність капсулоутворення

Капсули виявляють шляхом висіву у 1% бікарбонатний-сироватковий агар або білкове середовище ГКІ (додаток 3).

На 1% бікарбонатно-сироватковому агарі культуру інкубують у CO₂-інкубаторі чи іншому пристрої, щоб створити атмосферу із вмістом 5–10% CO₂ за температури 36±1 °С протягом 18–20 год. Культури, що утворюють капсулу, ростуть на агарі у вигляді великих, гладких, блискучих, слизистих колоній. У препаратах-мазках, пофарбованих по Ребігеру (або іншими методами) виявляють ланцюжки паличок, оточені добре вираженою капсулою.

Пробірки із середовищем ГКІ з посівами закривають стерильними гумовими пробками та інкубують за температури 36±1 °С протягом 18–20 годин. У препаратах-мазках, пофарбованих по Ребігеру (або іншими методами), знаходять довгі ланцюжки з паличок, оточених капсулою.

Наявність капсули in vivo. Після розтину заражених лабораторних тварин, яким вводили досліджувану культуру (додаток 3), виготовляють препарати-мазки з перитонеального ексудату і крові серця, препарати-відбитки з паренхіматозних органів (див. п 5.2).

Здатність до капсулоутворення *in vivo* із усіх представників роду *Bacillus* є лише у збудника сибірки *Bac. anthracis*. Атипові штами, які не утворюють капсулу, але за іншими ознаками відповідають *Bac. anthracis*, потребують додаткового дослідження у ДНКІБШМ.

5.8 Чутливість до сибіркових бактеріофагів

(фаготипування)

Збудник сибірки лізується (рис. 18) сибірковими фагами («Гамма», «К», Фаh-ВНИИВВиМ та іншими). Фаготипування проводять згідно настанови по застосуванню фагів.

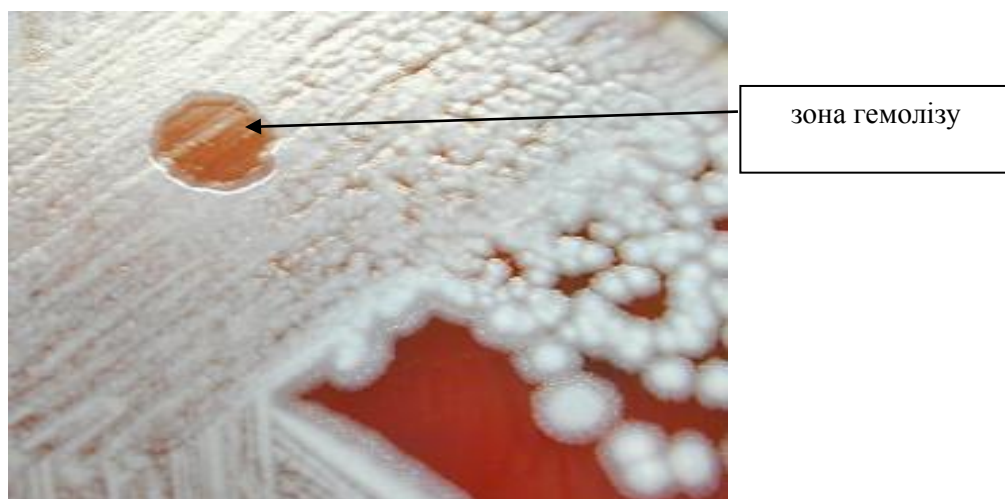


Рис. 18. Позитивна реакція з Гама-фагом

5.9 Тест на гемоліз

Тест проводять на кров'яному агарі (додаток 4). Посів досліджуваної культури здійснюють бактеріологічною петлею по секторах та культивують за температури 36 ± 1 °С протягом 18–20 год.

У ці терміни збудник сибірки не викликає лізису еритроцитів барана (рис. 19) на відміну від більшості сапрофітних бацил, які дають широку зону гемолізу навколо колоній.



Рис. 19. Ріст *Bac. anthracis* на кров'яному агарі, зони гемолізу відсутні

Примітка: за даними деяких вчених (Арасланова В. А., 2009) зустрічаються штами, що продукують гемолізину та на кров'яних середовищах ростуть із утворенням зони гемолізу.

5.10 Тест на чутливість до пеніциліну («перлинне намисто»)

Поживний агар (МПА, Хоттінгера) розливають у 3 пробірки по 10–15 см³ і охолоджують до 45 °С (додаток 5). В одну пробірку додають пеніцилін із розрахунку 0,5 Од/см³, у другу – 0,05 Од/см³, третя залишається без антибіотика (для контролю). Вміст кожної пробірки виливають у бактеріологічні чашки. Після застигання середовища дно чашок розділяють на сектори, на яких пишуть номер дослідження. У кожен сектор вносять по одній краплі досліджуваних 3–6 годинних бульйонних культур. Посіви інкубують за температури 36±1 °С. Не пізніше ніж через 3 год ріст культур продивляються під мікроскопом з імерсійним об'єктивом, попередньо накривши кожну ділянку росту покривним скельцем.

На середовищі з вмістом пеніциліну відмічають кулясті форми бактеріальних клітин збудника сибірки, розташовані у вигляді ланцюжків, які нагадують намисто із перлин. Спороутворювальні сапрофіти, як правило, стійкі до пеніциліну і мають звичайну паличкоподібну форму. На контрольному середовищі без пеніциліну клітини *Bac. anthracis* формують довгі ланцюжки з типових паличок для збудника.

5.11 Тест на лецитиназу

Наявність, або відсутність лецитиназної активності визначають у рідкому жовтковому середовищі, або на агарі Хоттінгера з курячим жовтком (додаток 6). У пробірки з рідким жовтковим середовищем засівають вміст однієї бактеріологічної петлі добової агарової культури та культивують за температури 36±1 °С протягом 24–48 год. Збудник сибірки, як правило, впродовж декількох діб інкубування не згортає жовток. У той же час спороутворювальні сапрофіти згортають жовток у першу добу. На щільному поживному середовищі навколо колоній збудника сибірки не формується зона ферментації жовтка, а навколо колоній більшості сапрофітів утворюється широка білувата непрозора зона.

5.12 Реакція імуофлуоренценції

5.12.1 Підтверджувальний тест пРІФ для *Bac. anthracis* базується на виявленні двох антигенів, які виробляються вегетативними клітинами або протягом розвитку та росту спор: полісахаридний антиген стінки клітини та антиген полі-D-глюматінової кислоти капсули (усі вірулентні штами *Bac. anthracis* формують цю капсулу).

Існують декілька штамів *Bac. cereus*, які формують полісахарид, але не утворюють капсули. Та, навпаки, є інші види *Bacillus*, які формують капсули, але не виробляють полісахарид. Обидва антигени вважаються підтверджувальною ідентифікацією для *Bac. anthracis*.

Позитивний контроль: еталонний *Bac. anthracis*, який формує капсулу, наприклад, штам *B. anthracis* M-71, або інактивовані препарати *Bac. anthracis* з капсулами.

Примітка: якщо позитивний контроль погано зафарбовується, повторіть процедуру та збільшіть час інкубації до 30 хв.

Негативний контроль: Еталонний штам *Bac. anthracis*, який не формує капсулу, наприклад, штам STI *Bac. anthracis*.

Необхідно використовувати чисті культури.

Приготуйте розведення (1:5) бактеріальної маси фізіологічним розчином чи буферним розчином із рН 7,4. Використовуйте 18-годинну досліджувану культуру, вирощену на кров'яному агарі в бактеріальній чашці. Позначте по одній пробірці для мікроцентрифуги для кожного зразку та контролю: позитивний контроль, негативний контроль, зразок(-и).

Помістіть невелику кількість досліджуваної суспензії (бактеріологічною петлею приблизно 1 мм у діаметрі) у пробірку для мікроцентрифуги. Інкубуйте у термостаті протягом 3 год за температури $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Використайте 45 мкл цієї досліджуваної суспензії для фарбування антитіла, яке кон'юговане з флуоресцеїн ізотіаціанатом.

Перемістіть 45 мкл із кожної суспензії (збагаченої СБГ або СБГ+ІСК – для ідентифікації капсул збудника) позитивного, негативного контролю та кожного зразку у окрему 1,5 см³ пробірку для мікроцентрифуги.

Додайте 5 мкл антитіла, яке кон'юговане з флуоресцеїн ізотіаціанатом (суха флуоресціююча сироватка розведена дистильованою водою до об'єму, зазначеного на етикетці ампули), до кожної пробірки та обережно змішайте. Інкубуйте за температури 35 ± 2 °С протягом 5 – 30 хв (за 30 хв результат оптимальний). Додайте 1 см³ деіонізованої води до реакційної пробірки. Закрийте кришкою та обережно переверніть для змішування. Помістіть пробірку до мікроцентрифуги та осадіть зразки шляхом центрифугування протягом 3 хв за 14000 Хг (не об/хв).

Обережно видаліть надосадовий шар за допомогою піпетки, щоб не пошкодити осад, залиште, близько, 100 мкл. Додайте 900 мкл деіонізованої води, обережно змішайте у вортексі та повторіть це ще один раз (останній пункт).

Обережно змішайте у вортексі та розведіть осад рідиною, що залишилася.

Перемістіть 2 мкл суспензії до однієї з камер восьмикамерного предметного скла та висушіть на повітрі.

Мазки необхідно робити з невеликої концентрації бактеріальних клітин, щоб можна було чітко побачити окремі клітини. Товсті мазки, що містять надто багато бактерій, можуть дати хибно негативні результати.

Додайте одну краплю закріплюючого середовища (9 частин гліцерину і 1 частина 1/5 М фосфатного буферу рН 8,0). Фіксація мазків є дуже крихкою. Мазки можуть від'єднатися від поверхні предметного скла, якщо його дуже енергійно промивають.

Накрийте покривним скельцем та подивіться щодо наявності флуоресцентного забарвлення за допомогою об'єктиву 40X УФ мікроскопу. FITC може швидко знебарвитися, якщо його проглядають під УФ світлом флуоресцентного мікроскопу. Застосуйте закріплюючий розчин або його еквівалент, щоб попередити знебарвлення.

Позитивна реакція: діамантова яблучно-зелена імунофлуоресценція (світіння яблучно-зеленого кольору).

Негативна реакція: немає флуоресценції (відсутність світіння яблучно-зеленого кольору) або тьмяна зелена імуофлуоресценція.

Bac. anthracis формує один антигенний тип поліпептидної капсули з полі-D-глютамінової кислоти. Синтез капсули починається за росту *Bac. anthracis* у атмосфері з 5 % CO₂ або у присутності 0,8 % натрію бікарбонату та інактивованої сироватки коней. Моноклональні антитіла, які кон'юговані з флуоресцеїн ізотіаціанатом, використовуються для відстеження наявності капсули.

Якщо результати негативні, рекомендується провести дослідження ще раз.

На рис. 20 (1–3В) зображено забарвлення клітин *Bacillus anthracis* за допомогою тесту пРІФ.

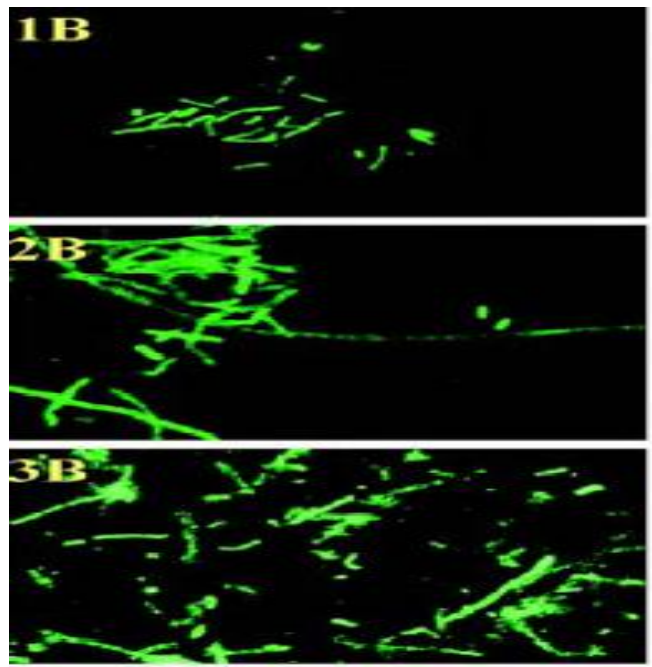


Рис. 20. Забарвлення клітин *Bacillus anthracis* за допомогою тесту пРІФ, збільшення X 400.

Малюнки відповідають: (1В) Позитивний контроль (*Bac. anthracis*, штам *Pasteur*), (2В) Тестовий ізолят № 2002013601 (зразок з навколишнього середовища, спалах сибірки у 2001 році у США), та (3В) Клінічний зразок № 2002007079 (тканина легенів пацієнта № 1, спалах сибірки у 2001 році у США), збільшення X 400.

5.12.2 Пряма реакція імуофлуоресценції (РІФ). Визначає присутність полісахариду стінки клітини, який виробляється штамми *Bac. anthracis*, за

допомогою моноклональних антитіл. Якщо цей метод використовується разом з тестом ПРІФ, який виявляє антиген полі-D-глутамінової кислоти капсули, він служить у якості підтверджувального тесту для *Bac. anthracis*.

Відстеження полісахаридного антигену та капсули антигену з полі-D-глутамінової кислоти підтверджує присутність *Bac. anthracis*. Жоден з антигенів не виявляється у стадії спор.

Підготовка зразку/контролю для вегетативних клітин:

Протокол вимагає використання чистих культур. Якщо є підозра на змішання культур, ізолят необхідно висіяти для ізоляції.

Позначте 1,5 см³ пробірки для мікроцентрифуги для кожного зразку: позитивний контроль, негативний контроль, тестовий зразок(-и).

За допомогою піпетки помістіть 0,1 см³ стерильного фосфатно-буферного розчину, який містить 0,3 % Tween-20 (ФБР-Т), у кожен позначений пробірку. Візьміть невелику кількість клітин бактеріологічною петлею (приблизно, 1 мм у діаметрі, або 10 см³) та розведіть у 0,1 см³ ФБР-Т.

ПРИМІТКА. 45 см³ кожної суспензії (позитивний, негативний контроль та кожний зразок) використовується для ПРІФ антитіла, яке кон'юговане з флуоресцеїн ізотіаціанатом (суха флуоресціююча сироватка розведена дистильованою водою до об'єму, зазначеного на етикетці ампули).

Підготовка штаму зразку/контролю, що містить спори (розвиток):

Сухий матеріал, який підозрюється у вмісті спор, розчиніть у достатній кількості стерильної води, яка повинна покривати зразок. Обережно змішайте пробу у вортексі. Розчиніть 50 см³ суспензії спор у 450 см³ збагачений СБГ або СБГ+ІСК. Розчиніть 50 см³ суспензії спор негативного контролю у 450 см³ збагаченого СБГ. Інкубуйте обидві культури за температури 35±2°C на водяній бані, щонайменш, 1 год перед тим, як проводити фарбування антитіла флуоресцеїн ізотіаціанатом (ФІТЦ).

Процедура фарбування антитіла ФІТЦ. Перенесіть 45 см³ з кожної суспензії (позитивний, негативний контроль та кожен зразок) у окремі позначені 1,5 см³ пробірки для мікроцентрифуги.

Додайте 5 см³ антитіла ФІТЦ на полісахаридну стінку клітини у кожній пробірці. Обережно перемішайте та інкубуйте на водяній бані за температури 35 °С протягом 5–30 хв (30 хв дасть оптимальний результат).

Додайте 1 см³ деіонізованої води до реакційної пробірки. Закрийте пробірку та обережно перемішайте у ШББ.

Помістіть пробірку у мікроцентрифугу та центрифугуйте протягом 3 хв за 14 000 X г (не об/хв). Обережно змініть надосадову рідину піпеткою, щоб не ушкодити осад, залишіть, приблизно, 100 см³.

Додайте 900 см³ деіонізованої води, обережно змішайте та дану процедуру ще раз. Розчиніть осад рідиною, що залишилася, шляхом обережного змішування у вортексі, згідно з вищезазначеним.

Процедура візуалізації за допомогою флуоресцентного фарбування антитіла

Перемістіть 2 см³ суспензії на тefлонове предметне скло та висушіть на повітрі. Додайте краплю закріплюючого середовища.

Закрийте покривним склом та вивчіть щодо предмету флуоресценції за допомогою 40X об'єктиву епіфлуоресцентного мікроскопу.

Позитивна реакція: Діамантово-зелена імунофлуоресценція (рис. 21, 22).

Негативна реакція: немає флуоресценції або тьмяна зелена імунофлуоресценція.

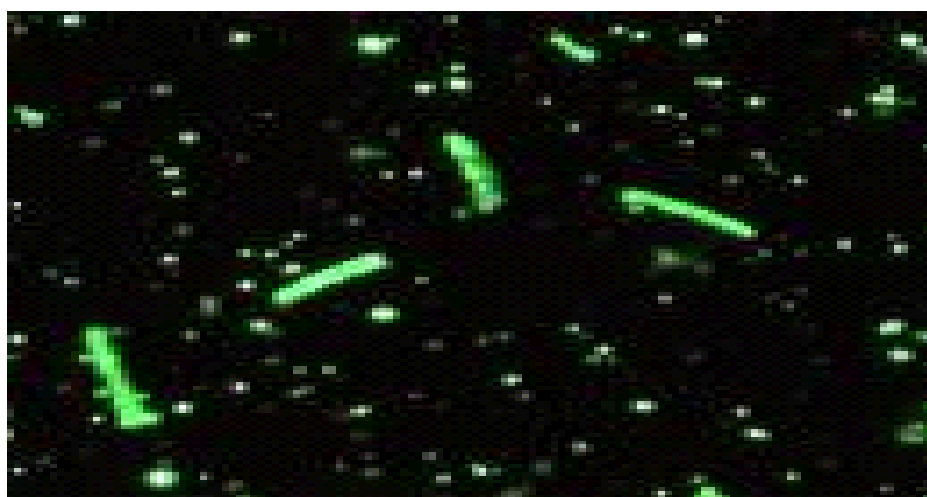


Рис.21. Позитивна пРІФ стінки клітини *Bac. anthracis*

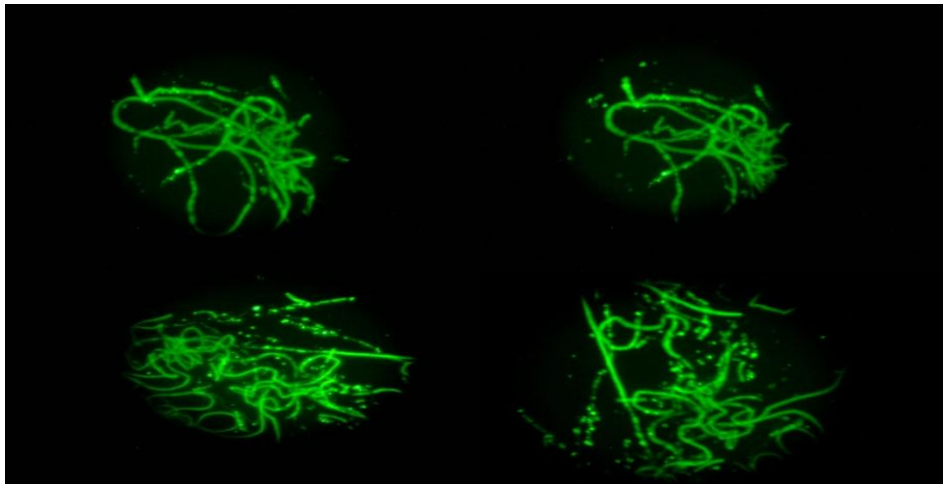


Рис. 22. Зображення позитивної пРІФ стінки клітини *Bac. anthracis*

Результати необхідно трактувати у поєднанні з процедурою підтверджувального тесту пРІФ для капсули *Bac. anthracis* з полі-D-глутамінової кислоти. Якщо обидва дослідження РІФ позитивні, це призводить до підтвердження наявності *Bac. anthracis*. Негативна РІФ стінки клітини вказує на те, що ізолят не є *Bac. anthracis*.

Негативний результат фарбування при пРІФ може бути отриманий у разі, якщо у зразку, який перевірявся, не було спор, або якщо клітини зі спор вирости, але не зафарбувалися. Щоб впевнитися у наявності розвитку або росту спор перед оцінкою результатів РІФ, спори можна побачити за допомогою фазового мікроскопу під видимим світлом перед включенням епіфлуоресценції.

Не завжди можна відстежити *Bac. anthracis*, якщо зразки містять мало спор або вегетативних клітин. Не треба покладатися лише на результати одного методу, усі зразки необхідно культивувати, щоб підтвердити наявність або відсутність *Bac. anthracis*.

5.13 Біологічні дослідження (біопроба)

Для постановки біологічної проби використовують лабораторних білих мишей або морських свинок.

5.13.1 Досліджуваний біологічний матеріал суспендують у невеликій кількості 0,85% розчину натрію хлориду та вводять двом білим мишам у дозі 0,2–0,5 см³ під шкіру в ділянці спини ближче до кореня хвоста, або 0,5–1,0 см³ двом морським свинкам підшкірно у ділянці живота. Як правило, загибель заражених тварин настає через 1–3 доби, інколи пізніше. За тваринами спостерігають впродовж 10 діб.

5.13.2 Проводять патологоанатомічний розтин трупів лабораторних тварин, виготовляють препарати-відбитки з тканин та органів, проводять висіви на поживні середовища – МПА, агар Хотінгера, кров'яний чи PLET-агар. Препарати-мазки фіксують етиловим спиртом із вмістом 3% перекису водню впродовж 30 хв, а потім фарбують за Міхіним чи Ребігером (або іншими методами для виявлення капсул). У препаратах за мікроскопії під імерсією сибіркові бацили розташовуються короткими ланцюжками, внутрішні краї обрубані, а зовнішні – округлі, розташовуються попарно або поодинокі, оточені рожевою капсулою, яка часто об'єднує декілька бацил. У посівах на поживних середовищах виростають крупні шорсткі колонії з бахромою по периферії (додаток 7).

У випадку, коли чиста культура збудника з посівів досліджуваного матеріалу буде отримана раніше, ніж настане загибель тварин, заражених цим же матеріалом, добовою бульйонною культурою заражають додатково двох білих мишей чи морських свинок у дозах і спосіб, як вказано в п. 5.13.1.

5.13.3 При постановці біопроби необхідно враховувати, що лабораторні тварини заражені суспензією біологічного матеріалу від свиней, можуть загинути від супутньої патогенної мікрофлори. У цих випадках бактеріологічні дослідження на сибірку продовжують і здійснюють повторне зараження тварин виділеними культурами, які мають культурально-морфологічні властивості, характерні для збудника сибірки *Bac. anthracis*.

5.13.4 Для прискорення біологічного дослідження кількість заражених білих мишей збільшують до 6–10 голів і по одній миші від кожної проби забивають (проводять евтаназію) через кожні 24 год після введення вихідного матеріалу. В цих

випадках, при розтині дослідних тварин, особливу увагу приділяють місцю введення матеріалу. Якщо у досліджуваному матеріалі є достатня кількість збудника сибірки, на місці введення можна побачити набряк підшкірної клітковини, зумовлений дією набрякового токсину. У препаратах-мазках, препаратах-відбитках з місця введення виявляють капсульні форми мікроорганізму, а у посівах – ріст типових колоній.

6 ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ

6.1 Приготування поживних середовищ. Для оцінки чутливості використовують середовище Хоттінгера (агар), або ж міжнародно визнаними поживними середовищами для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків (Мюллер-Хінтона). Обране поживне середовище для визначення чутливості готують із сухого середовища промислового виробництва, відповідно до інструкції виробника. Після автоклавування його розливають у стерильні пробірки, або бактеріологічні чашки. Товщина агару у чашках повинна бути не менше 4 мм, а тому на чашку діаметром 100 мм потрібно 25 см³ середовища, на чашку діаметром 90 мм – 20 см³. Чашки залишають у боксі за кімнатної температури для застигання. Перед інокуляцією чашки підсушують у термостаті за 35 °С з привідкритою кришкою протягом 10–20 хв. Конденсату рідини на внутрішній поверхні кришок не повинно бути.

6.2. Приготування мікробної суспензії (інокулюма). Приготування мікробної суспензії досліджуваного мікроорганізму певної густини є загальною і принципово важливою вимогою для усіх методів тестування. Її концентрація повинна становити 1 млрд. мікробних клітин *Bac. anthracis* у 1 см³.

6.3 Метод дифузії в агар. Метод оснований на здатності антибіотиків дифундувати із просочених паперових дисків у поживне середовище і пригнічувати ріст мікроорганізмів посіяних на поверхні агару.

Інокулюм слід використовувати протягом 15 хв із моменту приготування. Стандартний інокулюм наносять піпеткою на поверхню бактеріологічної чашки з

поживним середовищем в об'ємі 1–2 см³, рівномірно розподіляють по поверхні, надлишок інокулюма видаляють піпеткою.

На поверхню поживного середовища наносять диски. Аплікацію дисків проводять за допомогою стерильного пінцета або автоматичного диспенсора. 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. Диски повинні рівномірно контактувати з поверхнею агару, для чого їх слід акуратно притиснути пінцетом. Перекладати диски з одного місця на інше заборонено.

Відразу після аплікації дисків чашки поміщають у термостат догори дном і інкубують за температури 37°C протягом 18–24 год. (для кращої дифузії антибіотиків в агар бактеріологічні чашки з дисками дозволяється витримувати при кімнатній температурі протягом 1–2 год). Збільшення інтервалу часу між нанесенням дисків на поверхню середовища і початком інкубації, а отже і початком росту досліджуваної культури, приводить до "переддифузії" в агар і до збільшення діаметра зони пригнічення росту – це є помилкою.

Облік результатів. Після інкубації чашки поміщають догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45 ° (облік у відбитому світлі). Діаметр зон затримки росту вимірюють із точністю до 1 мм (бажано користуватися штангенциркулем або кронциркулем).

При вимірюванні зон затримки росту орієнтуються на зону повного пригнічення видимого росту.

Для ідентифікації і тестування чутливості мікроорганізмів до антибіотиків можна використовувати мікробіологічні аналізатори, зареєстровані і дозволені до використання в Україні.

При діаметрі зон затримки росту у 15 мм мікроорганізмів *Bac. anthracis* вважається слабо чутливим до антибіотика, при зонах у 15–24 мм – чутливим і більше 24 мм – високочутливим. Відсутність зон затримки росту вказує на нечутливість *Bac. anthracis* до даного антибіотика.

7 ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Для дослідження здатності бактерій розщеплювати білки (протеолітичні властивості) – молоко/середовище з желатином. Протеоліз у молоці виражається розчиненням згустку казеїну – згортає молоко.

На МПЖ (середовище з желатином готують на м'ясній воді, додаючи 1 % пептону, 0,5 % хлориду натрію та 10-20 % желатину) проводять посів досліджуваної культури методом уколу. Культивують посіви за температури 37 °С протягом 24 год. *Bac. anthracis* росте на 2–5 добу у вигляді ялинки «неправильної» форми з кратероподібним розрідженням желатини від поверхні середовища до низу, з часом розрідження – «мішкоподібне» [14–15].

Молоко згортає протягом 2–4 діб, із послідуною пептонізацією. Протеоліз проявляється розрідженням стовпчика середовища МПЖ.

8 ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУЛЕНТНОСТІ

КУЛЬТУРИ *BAC. ANTHRACIS*

Готують спорову культуру досліджуваного штаму *Bac. anthracis*: однодобову бульйонну культуру *Bac. anthracis* висівають на МПА, чи агар Хоттінгера, витримують за температури 37 °С протягом 3–4 діб. Спороутворення контролюють шляхом підрахунку спор мікроскопією препаратів-мазків та препаратів «роздавлена крапля»).

При наявності у бактеріях спор 90–100% культуру змивають стерильним фізіологічним розчином. Концентрацію спор визначають за відповідним стандартом мутності, чи шляхом посіву серійних розведень на МПА. Готують три робочих розведень із вмістом спор 100, 1000 і 10000 у 1 см³.

Для визначення вірулентності використовують по 2 кролі масою 2–2,5 кг, яким підшкірно в області черева по 1 см³ вводять досліджувану спорову суспензію. Спостереження ведуть протягом 10 діб.

Ступінь вірулентності визначають за введеною дозою, що викликає загибель тварин.

Високовірулентні штами викликають загибель при введенні 100 чи 1000 спор.

Помірновірулентні штами – при введенні більше як 1000 спор у 1 см³.

Слабковірулентні та авірулентні штами – не викликають загибель кролів протягом 10 діб.

9 ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКА СИБІРКИ

Всі виділені культури, що запідозрені в належності до *Bac. anthracis*, в обов'язковому порядку досліджують далі з використанням тестів, які слугують критерієм видової ідентифікації, а за необхідності й інших додаткових тестів (схема 2).

Прискорена ідентифікація дозволяє диференціювати штами за плазмідним складом, оснований на використанні мультиплексної ПЛР із сертифікованими тест-системами з праймерами до плазмідних генів капсуло- та токсинотворення та специфічних хромосомних локусів збудника сибірки.

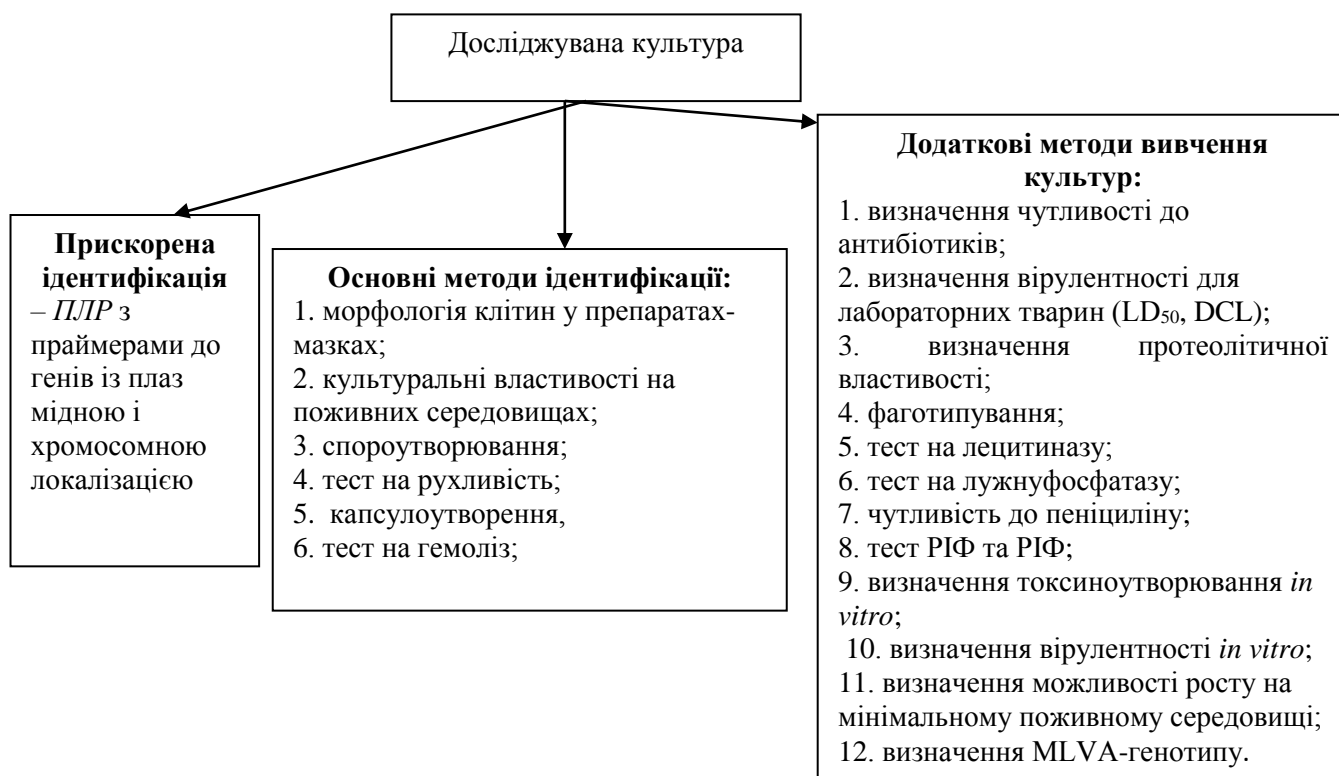


Схема 2. Ідентифікація культур *Bac. anthracis*

10 ВСТАНОВЛЕННЯ ДІАГНОЗУ

Після проведення відповідних етапів лабораторного дослідження на сибірку в певні терміни можна надавати наступні заключення щодо його результатів (див. розділ 9).

10.1 Попередні результати специфічної індикації.

При дослідженні патологічного та біологічного матеріалу від тварин, шкірсировини, вовни, м'яса та м'ясопродуктів:

- через 2–6 годин за результатами мікроскопії;
- через 2–6 годин за результатами реакції преципітації по Асколі (гарячим методом);
- через 8–12 годин за результатами ПЛР.

При дослідженні матеріалу з навколишнього середовища:

- через 8–12 годин за результатами ПЛР.

10.2 Кінцеві результати специфічної індикації.

При дослідженні будь-якого матеріалу, підозрілого у зараженні збудником сибірки, через 48 годин на підставі:

- результатів ПЛР з матеріалом із типових колоній.

10.3 Кінцеві результати повного лабораторного дослідження.

При дослідженні будь-якого матеріалу, підозрілого у зараженні збудником сибірки, через 2 до 10 діб на підставі:

- морфології колоній на поживних середовищах (в т.ч. на диференційно-діагностичному) та характеру росту на МПБ;
- морфології бактерій у мазках із підозрілих колоній, МПБ;

– патологоанатомічної картини у загинувших або евтаназованих білих мишей, виявлення капсули у препаратах-відбитках із органів лабораторних тварин і морфології колоній за висіву органів на поживних середовищах.

За необхідності враховують характер росту колоній на 1% бікарбонатно-сироваткому агарі та морфології клітин в мазках із колоній або зависі мікробів, що вирости у рідкому середовищі ГКІ; результати тесту з сибірковим бактеріофагом; результати тесту на лужну фосфатазу; результати тесту на гемоліз; результати тесту на лецитиназу; результати тесту на рухливість; результати тесту «перлинного намиста».

Діагноз на сибірку у тварин вважають встановленим при:

виділенні із патологічного або біологічного матеріалу культури з властивостями, характерними для збудника *Bac. anthracis* та загибелі хоча б однієї лабораторної тварини, заражених вихідним матеріалом або одержаною культурою, з послідуочим виділенням її з органів загинувших тварин;

– відсутності в посівах із патологічного або біологічного матеріалу культури з властивостями, характерними для збудника *Bac. anthracis*, але загибелі хоча б однієї лабораторної тварини із двох, заражених вихідним матеріалом, з послідуочим виділенням із органів загинувших тварин культури з властивостями, характерними для збудника *Bac. anthracis*;

– отримання позитивної реакції преципітації Асколі або ПЛР при дослідженні загнившого матеріалу;

– отримання позитивної реакції преципітації Асколі або ПЛР за наявності характерної клінічної картини та патологоанатомічних змін у свиней, навіть, за відсутності культури збудника у висівах із вихідного матеріалу та негативного результату біопроби;

– одержанні позитивних результатів методом РІФ та виявленні капсульних бацил в мазках із патологічного матеріалу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Інструкція про заходи з профілактики та боротьби з сибіркою тварин. Наказ Державного департаменту ветеринарної медицини Мінагропрому України №4 від 25 січня 2000 р. – Романюк П.А.
2. Про заходи з профілактики захворювань на сибірку. – Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 314 від 09.07.2003. – Л.М. Мухарська.
3. Three probable cases of cutaneous anthrax in autonomous province Vojvodina, Serbia / [P. Duric, G. Cosic, S. Rajcevic, V. Petrovic, M. Tomkovic [et al.] // J. Weekly issue. – 2012. – № 17. – P. 2–6.
4. Інструкції з лабораторної діагностики сибірки у людей, в сировині тваринного походження та об'єктах довкілля: Наказ МОЗ України від 21.08.2002, №321.
5. Инструкция 4.2.10–19–60–2005. Лабораторная диагностика сибирской язвы у людей и выделение возбудителя сибирской язвы из объектов внешней среды: Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 21 ноября 2005, № 181.
6. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания. МУК 4.2.2413–08: Утверждено Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко от 29 июля 2008.
7. Колесов С.Г. – Сибирская язва. – С.Г. Колесова. – 1976. – 288с.
8. Ипатенко Н.Г. Сибирская язва сельскохозяйственных животных. Н.Г. Ипатенко, В.А. Седов, В.С. Зелепукин, В.Н.Гущин. – 1987. – 256с.
9. Коротович А.С. Сибирская язва А.С. Коротович, Л.И. Погребняк. – 1976. – 160 с.
10. *Manual for Laboratory Diagnosis of Anthrax / World Health Organization.* – New Delhi: Regional Office for South-East Asia. – 2003. – 58 p.

11. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)* / World organization for animal health OIE fifth edition volume 1, Paris. – 2004. – P. 133–144.

12. Dragon D.C. Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores / D.C. Dragon, R.P. Rennie // *The Society for Applied Microbiology*. – 2001. – № 33. – p. 100–105.

13. Schuch R. The secret life of the Anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage mediated ecological adaptations / Raymond Schuch, Vincent A. Fischetti // *Plos one. A Peer-Reviewed, one. Access journal*. – 2009. – № 4(8). – e. 6532.

14. Цыганкова О.И. Фенотипические и генетические особенности культурально-морфологических вариантов *Bacillus anthracis* / О. И. Цыганкова, Е. И. Еременко, Е. А. Цыганкова, Н. П. Буравцева, А. Г. Рязанова // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. – 2008. – № 4. – С. 6–11.

15. Муруева Г.Б. Характеристика сибирезвенного микроба, выделенного из органов павших животных / Г.Б. Муруева, А.П. Конвисарев, В.Ц. Цыдыпов, Д.В. Колбасов, Л.Я. Цыбанова, Ю.О. Селянинов // *Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: Междунар. науч.-практ. конф. 15-16 авг. 2000 г. – Покров : ВНИИВВиМ, 2000. – С. 246–248.*

Додатки

ДОДАТОК 1

Анкета на сибірку

1. Номер по порядку. _____
2. Дата і час повідомлення. _____
3. Область. _____
4. Район. _____
5. Населений пункт. _____
6. Власник тварини. _____
7. Вид та кількість хворих тварин. _____
8. Місце захворювання тварин (пасовища, літній табір, зимові приміщення). _____
9. Дата захворювання. _____
10. Ким і коли оглянута хвора тварина. _____
11. Температура тіла. _____
12. Ким і яка надана допомога. _____
13. Вказівки. _____
14. Дата і місце загибелі (вимушеного забою) тварини. _____
15. Ким, коли і де проведений розтин трупа (експертиза туші). _____
16. Наслідки патологоанатомічного розтину трупа (ветсанекспертизи туші). _____
17. Ким, коли і який відібрано патологоанатомічний матеріал. _____
18. Лабораторія, що проводила дослідження, підтвердження. _____
19. Результати дослідження: мікроскопія, РП, біопроба. _____
20. Куди реалізовано м'ясо. _____
21. Проведені заходи. _____
22. Кількість осіб, що мали контакт. _____
23. Повідомлено санепідемслужбі. _____
24. Дата щеплення загиблої тварини. _____

25. Назва біопрепарату, ким виготовлено, серія, термін придатності. _____
26. Кількість поголів'я на фермі (господарстві). _____
27. Дата щеплення стада, гурту. _____
28. Попередні випадки сибірки в даному населеному пункті. _____
29. Введено карантин. _____
30. Хто виїжджав для з'ясування обставин. _____
31. Примітка. _____
32. Хто передав документ (П.І.П., підпис). _____

Диференційно-діагностичне середовище для виділення *Bac. anthracis*

Для диференціації колоній збудника сибірки від колоній спороутворювальних сапрофітів використовують тест виявлення лужної фосфатази.

Первинні посіви або пересіви підозрілих культур на диференційно-діагностичному середовищі інкубують в термостаті за 37 °С протягом 18–24 годин. За наявності росту мікроорганізмів в кришку бактеріологічної чашки вносять 1–2 см³ 25 %-ного водного розчину аміаку. Чашку (кришкою вниз) витримують за кімнатної температури протягом 1 хв, після чого візуально або під малим збільшенням мікроскопа проводять облік тесту.

Під дією парів аміаку колонії мікроорганізмів, яким властива фосфатазна активність, стають рожевими. *Bac. anthracis* фосфатазна активність не властива і його колонії залишаються безбарвними.

Фенолфталеїнфосфат натрію (комерційний 10%-ний розчин) для стерилізації прогрівають на водяній бані за 56 °С протягом 30 хв. Поживний агар у колбах по 100 см³ розплавляють в киплячій водяній бані і охолоджують до температури 45–50 °С. В агар додають фенолфталеїнфосфату натрію – 0,1 см³.

Після перемішування середовище розливають у бактеріологічні чашки і підсушують протягом 1,5–2 год. із відкритими кришками. Диференційно-діагностичне середовище після розливу зберігають в холодильнику до 2 діб.

Метод виявлення капсулоутворення in vitro

Досліджувану культуру висівають в середовище ГКІ. Середовище ГКІ: до розчину Хенкса з бікарбонатом натрію (5 %-ий розчин, рН 7,2–7,4) або бульйону Хоттінгера додають 40 % стерильної сироватки крові ВРХ, або будь-яких інших тварин, інактивованої за 56 °С протягом 30–40 хв.

Пробірки з посівами закривають стерильними гумовими корками і поміщують у термостат за температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Через 30–120 хв культивування в окремих сибіркових клітинах починається капсулоутворення, а через 16–18 годин всі або більшість сибіркових клітин утворюють капсулу. Для виявлення капсулоутворення з посівів виготовляють препарати-мазки.

Препарати-мазки фіксують, фарбують на капсулу і вивчають під мікроскопом. При позитивному результаті в мазках виявляють палички та ланцюжки паличок, оточених капсулою.

Методи виявлення капсулоутворення in vivo (прискорена біологічна проба).

Досліджувану культуру в дозі 0,1–0,2 см³ вводять внутрішньочеревно чотирьом білим мишам. Через 1–2 год після зараження забивають по одній миші, розтинають, із перитонального ексудату і з органів роблять препарати-відбитки, препарати-мазки для дослідження на наявність капсульних паличок збудника сибірки. Двох білих мишей лишають під наглядом до природної смерті, або на 10 днів, як за класичної біологічної проби.

Кров'яний МПА

Стерильну дефібриновану кров барана, коня, ВРХ чи кроля додають у кількості 5–10 % до розплавленого та охолодженого до 40–45 °С в колбах. Перемішують і відразу розливають у бактеріологічні чашки. Після затвердіння агару чашки ставлять у термостат догори дном для підсихання.

Чутливість до пеніциліну (тест "перлинового намиста")

Модифікація тесту "перлинового намиста". Агар, що містить 0,5 і 0,05 одиниць (Од) пеніциліну (табл.2) в 1 см³ середовища і без нього, розливають у чашки Петрі; після застигання пробіркою з рівними краями надсікають агар або вирізають пластинки (1,5x1,5 см), які переносять на предметні скельця і вміщують у бактеріологічні шашки. На кожену пластинку бактеріологічною петлею наносять 3-годинну бульйонну культуру. Чашки закривають кришками і поміщають у термостат. Через 1–3 год посіви переглядають під мікроскопом із сухою (об'єктив Х40) та імерсійною системами. Перед переглядом зону росту накривають покривним склом. Мікроби сибірки на МПА з пеніциліном приймають кулькоподібні форми, а ланцюжки мають вигляд "перлинового намиста". Спороутворюючі сапрофітні аеробні мікроби в аналогічних умовах виростають у вигляді звичайних форм. На агарі без пеніциліну збудник сибірки утворює довгі ланцюжки, що складаються з типових паличок. При негативному результаті мікроскопії інкубацію посівів продовжують до 6 год., після чого досліджують повторно і роблять заключний облік тесту.

Модифікація тесту "перлинового намиста" з використанням 0,3 % агару Хотінгера (Н. П. Буравцева, В. О. Ярошук). До розплавленого і охолодженого до 43 °С 0,3 % агару Хотінгера рН 7,3–7,6 додають 20–40 % інактивованої за 56 °С кінської сироватки. Виготовлене середовище стерильно розливають по 4,5 см³ у пробірки і засівають по 0,1 см³ суспензії спорової або вегетативної форми культури сибірки, що містить від 100 тис. мікробних клітин за стандартом мутності.

Пробірки з посівами інкубують протягом 4 годин за 37 °С, потім додають пеніцилін із розрахунку 0,5–0,05 Од на 1 см³ середовища (табл.2).

Пробірки ставлять в термостат за 37 °С на підрощування на 1,5–2 години, після чого виготовляють мазки, висушують на повітрі і фіксують в етиловому 96° спирті з доданням 3 % перекису водню протягом 30 хвилин. Після фіксації мазки висушують на повітрі, фарбують метиленою синькою або люмінесцентними сироватками і мікроскопують.

Модифікація тесту "перлинового намиста" з використанням МПБ.

Використовується МПБ з додаванням 20 % інактивованої кінської сироватки. На 100 см³ МПБ вноситься 0,5 см³ розчину (табл.2), що вміщує 100 Од пеніциліну в 1 см³ (отримуємо в 1 см³ МПБ 0,5 Од пеніциліну). Для отримання в 1 см³ МПБ 0,05 Од пеніциліну в 100 см³ МПБ вносять 0,5 см³ пеніциліну, що містить 10 Од/ см³.

У 3 см³ МПБ з інактивованою кінською сироваткою та розчинами пеніциліну (0,5 та 0,05 Од/ см³) додається по 2–3 краплі 3-годинної або добової бульйонної культури і інкубується протягом 3 годин за температури 37 °С.

Готують мазки, матеріал беруть із дна пробірки, мазки фіксують рідиною Карнуа (6 частин етилового спирту, 3 частини хлороформу, 1 частина крижаної оцтової кислоти) до її випарювання, фарбують метиленою синькою 20–30 с і мікроскопують.

Bacillus anthracis знаходиться в мазках у вигляді кулькоподібних форм. *Vac. cereus* та інші сапрофітні бацили на середовищі з пеніциліном ростуть звичайно. У випадку негативного результату інкубацію посівів слід продовжити до 6 годин.

Таблиця 2. Приготування розведення пеніциліну

NN розведення	Кількість розчиненого пеніциліну	Кількість МПА, що додається (см ³)	Отримана концентрація	Кількість середовища			
				100 см ³		10 см ³	
				Вносять розчину пеніциліну (мл)	Концентрація пеніциліну (Од/мл)	Вносять розчину пеніциліну (мл)	Концентрація пеніциліну (Од/мл)
1	100000 Од	10	10000				
2	1 см ³ розв. N 1	9	1000				
3	1 см ³ розв. N 2	9	100	0,5	0,5		
4	1 см ³ розв. N 3	9	10	0,5	0,5	0,5	0,5
5	1 см ³ розв. N 4	9	1			0,5	0,5

Визначення лецитиназної активності

Відсутність лецитиназної активності визначається шляхом посіву досліджуваної культури на рідке яєчне середовище.

Середовище готують шляхом змішування однієї частини курячого жовтка, що стерильно відбирається, з двома частинами стерильного 0,85% розчину натрію хлориду. Середовище розливають у пробірки, досліджувану культуру сіють бактеріологічною петлею та культивують за температури 37 °С. Збудник сибірки, як правило, жовток не згортає на протязі декількох діб інкубації.

Біологічні властивості штамів збудника сибірки різних типів

(за Г.Г. Онищенко, 2009)

Ознаки	Типи по Torne (1960)		
	I	II	III
Морфологія колоній			
На агарі Хотінгера з доступом повітря	R-форма	SM-форма	R-форма
На 1% агарі з бікарбонатом натрію в атмосфері 10–50% CO ₂	SM-форма	SM-форма	R-форма
Капсулоутворення			
На агарі Хотінгера з доступом повітря	відсутнє	відбувається	відсутнє
На 1% агарі з бікарбонатом натрію в атмосфері 10–50% CO ₂	відбувається	відбувається	відсутнє
В організмі тварин	відбувається	відбувається	відсутнє
Ріст в бульйоні Хотінгера	бульйон прозорий, придонний ріст у вигляді «шматочка вати»	дифузне помутніння бульйону, придонний ріст у вигляді «шматочка вати»	бульйон прозорий, придонний ріст у вигляді «шматочка вати»
Вірулентність			
Для білих мишей	при зараженні в дозі 10–1x10 ⁴ викликає загибель на 1–5 добу	при зараженні в дозі 10–1x10 ⁴ викликає загибель на 1–5 добу	викликає загибель на 1–10 добу в дозах ≥ 10 ⁴ спор, в менших дозах – набряк підшкірної клітковини в

			місті введення на 2–3 добу
Для морських свинок	при зараженні в дозі $10-1 \times 10^4$ викликає загибель на 1–5 добу	при зараженні в дозі $10-1 \times 10^4$ викликає загибель на 1–5 добу	викликає загибель одиночних особин на 1–10 добу в дозах $\geq 10^4$ спор, в менших дозах – набряк підшкірної клітковини в місті введення на 2–3 добу
Для кролів	при зараженні в дозі $10-1 \times 10^4$ викликає загибель на 1–5 добу	не викликає загибелі при зараженні в дозах до 10^6 спор	не викликає загибелі при зараженні в дозах до 10^6 спор