

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ**  
**УНІВЕРСИТЕТ**

Методи виявлення бактерій роду *Salmonella*

(науково-практичні рекомендації)

**Дніпро – 2025**

Рекомендовано вченою радою факультету ветеринарної медицини  
Дніпровського державного аграрно-економічного університету  
(протокол № 6 від 27 травня 2025 р.)

**Рецензенти:**

Олександр СОСНИЦЬКИЙ, професор кафедри інфекційних хвороб тварин,  
д.вет.н.;

Іван БІБЕН, доцент кафедри паразитології та ветеринарно-санітарної  
експертизи, к.вет.н.

УСЕЄВА Н.Г., БІЛАН М.В., ЗАЖАРСЬКИЙ В.В. Методи виявлення  
бактерій роду *Salmonella*: науково-практичні рекомендації. Дніпро, 2025. 48 с  
(1.8 д.ар).

У науково-практичних рекомендаціях висвітлено методики виділення та  
типізації бактерій роду *Salmonella* з різних об'єктів: патологічний матеріал  
(паренхіматозні ограні, фекалії, кров, тощо), корма для тварин (продукти  
рослинного походження та продукти їх перероблення; корми, дріжджі,  
премікси, біовітамінні добавки, тощо), змиви з об'єктів (об'єкти виробництва та  
реалізації, які підлягають ветеринарному нагляду), вода (питна, водоймищ,  
стічна, інша).

Для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності  
211 «Ветеринарна медицина» ОПП «Ветеринарна медицина» та 212  
«Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» ОПП «Ветеринарна гігієна,  
санітарія і експертиза», лікарів ветеринарної медицини діагностичного  
напряму, лабораторій та науково-дослідних установ.

© Н. Г. Усеєва, 2025

© М. В. Білан, 2025

© В. В. Зажарський, 2025

© Дніпровський державний аграрно-економічний університет, 2025

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ....	4
ВСТУП.....	5
1. Характеристика збудника.....	7
2. Методи виявлення <i>Salmonella</i> spp. у патологічному матеріалі від тварин.....	10
2.1. Відбір і транспортування патологічного матеріалу .....	10
2.2. Виділення сальмонел.....	13
3. Методи виявлення <i>Salmonella</i> spp. в кормах для тварин.....	18
3.1. Відбір зразків та готування проб до досліджень.....	18
3.2. Виділення сальмонел.....	22
3.3. Автоматизований метод виявлення мікроорганізмів роду <i>Salmonella</i> за допомогою приладу mini-VIDAS.....	23
4. Дослідження змивів з об'єктів виробництва та реалізації, які підлягають ветеринарному нагляду на наявність <i>Salmonella</i> spp.	24
4.1. Підготовка матеріалу, відбір змивів та відбитків.....	24
4.2. Виділення сальмонел.....	27
5. Виявлення наявності видів <i>Salmonella</i> у воді (питній, водоймищ, стічній, іншій).....	27
5.1. Відбір, зберігання і транспортування проб води.....	28
5.2. Виділення сальмонел.....	32
6. Ідентифікація сальмонел.....	36
6.1. Ріст на диференційно-діагностичних середовищах.....	36
6.2. Біохімічна ідентифікація.....	38
6.3. Серологічне типування виділених культур сальмонел.....	42
6.4. Додаткові методи ідентифікації збудника.....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	48

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ**

RV бульйон – бульйон Раппапорта-Вассіліадіса

TSI – triple sugar iron agar (агар трицукровий залізовмісний)

XLD – ксилозо-лизиновий дезоксихолатний агар

BCA – вісмут-сульфіт агар

ДАС – диференційний агар для сальмонел

ДЗА – діамантовий зелений агар

ККРА – кровокрапельна реакція аглютинації

ККРНГА – кровокрапельна реакція непрямой гемаглютинації

МПА – м'ясо-пептонний агар

РА – реакція аглютинації

ТСА – крипто-соевий агар

## ВСТУП

Сальмонельоз належить до найбільш небезпечних широко розповсюджених кишкових інфекцій людини та сільськогосподарських тварин. Хвороба має велике епізоотичне та епідеміологічне значення.

У людини сальмонельоз проявляється у вигляді харчових токсикоінфекцій, які характеризуються значним поліморфізмом клінічного перебігу з переважним ураженням шлунково-кишкового тракту і різним ступенем вираженості симптомів загальної інтоксикації та зневоднення.

Сальмонельоз – найпоширеніша кишкова інфекція. Епідемічні спалахи спостерігаються практично в усіх частинах світу. Актуальною ця хвороба є перш за все для України, особливо зараз, в умовах зниження рівня економічно-соціального рівня життя. За даними повідомлень EFSA, у Європейському союзі щороку реєструють більш як 100 000 випадків захворювання людей. Загальний економічний збиток сальмонельозу може досягати 3 млрд євро на рік. В Україні випадки сальмонельозу реєструють майже на всіх адміністративних територіях. Серед гострих кишкових інфекцій сальмонельоз займає друге місце після ротавірусної інфекції в Україні.

З усіх випадків захворювання людей на сальмонельоз: 60 % пов'язані з вживанням м'яса птиці і яєць, 30 % – свинини, 10 % – яловичини.

Сальмонельоз птиці розглядається як одне з найбільш небезпечних захворювань у птахівництві всіх країн світу. Економічні збитки, яких завдає сальмонельоз птиці, визначаються високою летальністю (60-70 %), зниженням яєчної продуктивності несучок та кількості запліднених яєць, втрати приростів, високої летальності ембріонів і молодняку, а також великих витрат на ветеринарно-санітарні, діагностичні та лікувально-профілактичні заходи.

Для того, щоб контролювати епізоотичну ситуацію щодо сальмонельозу необхідно здійснювати комплексний підхід до проблеми. Однією з ланок такого підходу є виявлення збудника інфекції мікробіологічним методом.

Наразі в Україні діють державні моніторингові програми щодо сальмонельозу птиці. Метою Програми сальмонельозу є забезпечення виконання належних і ефективних заходів для виявлення та контролю сальмонел на всіх етапах розведення, вирощування ,утримання та/або обігу птиці, продуктів птахівництва та кормів з метою зменшення поширення сальмонельозів та зменшення ризиків ,що становлять загрозу для людей.

Для виявлення збудників сальмонельозу в зразках, відібраних при первинному виробництві, використовується бактеріологічний метод дослідження.

Бактеріологічне дослідження на сальмонельоз проводять згідно з:

-ДСТУ4769:200 7 "Бактеріологічне дослідження патологічного матеріалу від тварин. Методи виявлення сальмонел";

-OIE Terrestrial Manual Глава 2.9.9. – Salmonellosis.

-ISO 6579:2002/Amd.1:2007(E) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.

Дослідження на сальмонельоз продукції птахівництва та кормів проводять згідно з:

-ДСТ УГК12824:2004 "Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella*;

-ДСТУ18 06579:2006 "Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Методика виявлення *Salmonella* spp.;

-ISO 6579: 2006 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for of *Salmonella* spp."

## 1. Характеристика збудника

Сальмонельоз – гостре зоонозне інфекційне захворювання, яке спричиняється бактеріями роду *Salmonella*, зустрічається в популяціях диких, синантропних, свійських птахів та становить загрозу для здоров'я людини.

У птахів хвороба характеризується ураженням шлунково-кишкового тракту і септицемією, а при підгострому та хронічному перебігу – пневмонією та артритами, ураженням яєчників у дорослої птиці.

Збудник хвороби належить до родини ентеробактерій (*Enterobacteriaceae*) роду сальмонел (*Salmonella*), який об'єднує більш ніж 2500 сероварів, що розділені за набором соматичних ("O") антигенів на 67 серогруп.

Сальмонели – дрібні палички із закругленими кінцями, зрідка овальної форми, іноді у вигляді стрепто- і кокобактерій, рухливі (за винятком *S. gallinarum*, *S. pullorum*), мають перитрихіально розташовані джгутики, спор і капсул не утворюють. Фарбуються аніліновими барвниками, грамнегативні, ростуть на звичайних поживних середовищах за температури 35–42°C (в межах 22–42°C), рН – 7,2-7,6.

Біохімічні та серологічні ознаки сальмонел широко варіюються як у представників різних підвидів, так і в межах одного серовару. Бактерії роду *Salmonella* не ферментують лактозу, сахарозу, саліцин, адоніт, але ферментують більшість вуглеводів (арабінозу, глюкозу, дульцит, інозит, ксилозу, мальтозу, маніт, рамнозу, сорбіт, трегалозу). Для *S. typhimurium* характерна ферментація рамнози та інозиту, *S. enteritidis* ферментують рабінозу, рамнозу, дульцит.

Сальмонели, як правило, виділяють сірководень і не утворюють індол, дають позитивну реакцію з метиловим червоним і негативну - Фогеса-Проскауера (не утворюють ацетоїну), утилізують цитрат і ацетат. Не спроможні декарбоксілювати глютамінову кислоту, але розщеплюють L- та DL-амінокислоти (лізин, орнітин, аргінін). Не ферментують сечовину, розріджують

желатин, здатні відновлювати солі азотної кислоти (нітрати) до солей азотистої кислоти (нітриту).

Сальмонели мають три основні антигенні комплекси: O-антиген (соматичний), H-антиген (джгутиковий), Vi-антиген.

Бактерії роду сальмонел здатні утворювати термостійкі токсичні речовини – ендотоксини, які являють собою гліюцидо-ліпоїдно-поліпептидний комплекс. За певних умов токсини можуть накопичуватися у харчових продуктах.

Сальмонели стійкі до впливу фізичних та хімічних факторів. У пташниках сальмонели виживають до 3–4 місяців, у посліді – до 120 днів, в кормах та підстилці за температури 25°C вони залишаються життєздатними протягом 16–18 місяців, у відкритих водоймищах – від трьох до 90 днів, у морській воді – від 5 до 27 днів, у водопровідній воді – від 1–2 місяців до року, в стічних водах – до одного місяця. У яйцях сальмонели залишаються життєздатними 13 місяців, у яєчному порошку – від 3 до 9 місяців, у замороженому м'ясі – від 6 до 13 місяців, у ґрунті – від 1 до 9 місяців. При кип'ятінні сальмонели гинуть миттєво, за температури 80°C деякі штами сальмонел зберігають життєздатність близько 15 хвилин. При біотермічному знезараженні посліду сальмонели інактивуються через 3 тижні, 1 % розчин фенолу вбиває сальмонел за 3 хвилини.

Діагноз «сальмонельоз» встановлюють з урахуванням епізоотичних даних, клінічних ознак, патолого-анатомічних змін та результатів серологічних, бактеріологічних досліджень. Вирішальне значення в постановці діагнозу «сальмонельоз» має виділення сальмонели бактеріологічними методами в державних лабораторіях ветеринарної медицини або уповноважених лабораторіях, визначених компетентним органом.

Для індикації сальмонел можна застосовувати ПЛР (полімеразну ланцюгову реакцію) або інші альтернативні методи дослідження, але при

позитивному результаті дослідження слід проводити підтвердження класичними (еталонними) бактеріологічними методами.

Прижиттєву діагностику зараження птиці *Salmonella pullorum – gallinarum* (молоді кури, індики, фазани, качки), *Salmonella gallinarum* проводять методом ККРНГА (кровокрапельної реакції непрямої гемаглютинації) з еритроцитарним антигеном або методом ККРА (кровокрапельної реакції аглютинації) з кольоровим пулморним антигеном.

## 2. МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ *SALMONELLA SPP.* У ПАТОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ ВІД ТВАРИН

### 2.1. Відбір і транспортування патологічного матеріалу

Дослідження на сальмонельоз здійснюють для встановлення етіологічного агенту захворювань тварин, виявлення сальмонелозноносійства, контамінації об'єктів навколишнього середовища, причин спалахів захворювань і джерел збудника, а також під час аналізування епідемічної і епізоотичної ситуації.

Для *посмертного* бактеріологічного дослідження в лабораторію направляють:

- абортвані плоди з плодовими оболонками і навколородковими водами, свіжі трупи дрібних тварин;
- з трупів великих тварин забирають паренхіматозні органи або їх частини: печінку з жовчним міхуром, селезінку, нирку, мезентеріальні лімфатичні вузли, трубчасту кістку; серце, перев'язане лігатурою у основі аорти; окремо – ділянки тонкого і товстого відділів кишечника, з накладеними з обох кінців лігатурами;
- завмерлі (в 12–18-денному віці) ембріони птиці (до 30 шт.), трупи птиці (до 5 голів з кожного виробничого приміщення);
- у разі підгострої або хронічної форми захворювання додатково забирають з трупів телят змінені ділянки легень, від курей – фолікули яєчника, ділянки тонких кишок | сліпі відростки кишок;
- для виявлення сальмонелозноносійства досліджують печінку, селезінку, а у птиці - додатково фолікули яєчників.
- жовч забирають у стерильні пробірки.
- фекалії (послід) збирають одразу після дефекації з останньої порції за допомогою стерильної скляної палички або шпателя з неіржавіючої сталі. Слиз, кров, гній, якщо вони є, приєднують до проби.

Матеріал для дослідження необхідно забрати не пізніше 12 год після загибелі тварини і доставити на дослідження не пізніше 12 год після забору. Якщо неможливо дотриматись цього терміну, патологічний матеріал направляють у замороженому стані в термосі з льодом або консервувальним розчином.

Зразки патологічного матеріалу забирають із забезпеченням вимог асептики та перед початком проведення курсу антибіотикотерапії. Якщо для лікування тварини застосовували антибактеріальні препарати, необхідно обов'язково зазначити це в супровідному документі.

Для *прижиттєвої* діагностики сальмонельозів бактеріологічному дослідженню піддають:

- фекалії хворих тварин і послід птиці;
- переферійну кров, забрану від хворих або підозрілих на зараження тварин;
- ексудат з матки (у разі викиднів).

Матеріал можна забрати безпосередньо з прямої кишки за допомогою ректального тампона, вводячи його в кишку на 8–10 см (птиці – на 2–3 см). Але в цьому разі імовірність виявлення сальмонел зменшується.

Якщо неможливо провести посіви протягом 3–4 год, фекалії (послід) вміщують у пробірок; з консервувальним розчином, Об'ємне співвідношення фекалій і консервувального розчину становить 1:3. Матеріал витримують до проведення дослідження за температури 4–6 °С не більше доби.

Кров для прижиттєвої діагностики забирають протягом перших чотирьох днів після захворювання стерильним шприцом з вени у кількості 5–10 см<sup>3</sup>; посів крові проводять безпосередньо після забору.

Для виявлення *джерела або факторів передачі* збудника досліджують:

- корми тваринного і рослинного походження;
- добові проби кормосумішей;

- змиви з устаткування й інших предметів навколишнього середовища;
- трупи гризунів і диких птахів, знайдених у тваринницьких приміщеннях, а також на прилеглий території.

Під час *транспортування* в лабораторію дотримуються вимог техніки безпеки під час роботи з патологічним матеріалом.

Матеріал, відібраний для дослідження, транспортують у стерильному скляному посуді (пробірках, флаконах, чашках Петрі). Стерилізацію посуду можна замінити кип'ятінням протягом 15 хв. Застосовування дезінфікуючих засобів не дозволено.

Кожну пробу нумерують, герметично упаковують, додаючи супровідний документ, що містить назву матеріалу та джерело його походження (господарство, ферма, відділення тощо), дату відбирання проб.

## **2.2. Виділення сальмонел**

Із патологічного матеріалу, призначеного для дослідження, роблять посіви:

- у неселективні середовища попереднього збагачення – м'ясо-пептонний бульйон або забуферену пептонну воду;
- у селективні збагачувальні середовища (селенітове, Мюллера, Кауфмана, Кіліана);
- на диференційно-діагностичні щільні середовища (вісмут-сульфітний агар, середовище Ендо, Плоскірева, Левіна);
- на м'ясо-пептонний агар.

*Неселективне попереднє збагачення* використовують для стимуляції росту незначної кількості сальмонел або для відновлення уражених клітин (наприклад, під час посівів з внутрішніх органів щодо встановлення сальмонелозносії, під час дослідження вмісту яєць, під час дослідження змивів з устаткування та інкубаторів для перевіряння якості дезінфекції). Як неселективні збагачувальні середовища, використовують забуферену пептонну

воду і м'ясо-пептонний бульйон. Засіяні середовища інкубують протягом (16-24) год за температури  $37 \pm 0,5$  °C.

Під час дослідження на сальмонелозносієвості посіви з внутрішніх органів паралельно інкубують за температури  $43 \pm 0,5$  °C протягом 24 год. Посіви з вмісту яєць інкубують протягом 48 год за температури  $37 \pm 0,5$  °C.

**Селективні збагачувальні середовища** застосовують під час дослідження фекалій (посліду), зіскрібків зі слизової оболонки кишечника, змивів з об'єктів зовнішнього середовища, зразків підстилки, пуху, кормів. Посіви інкубують протягом доби за температури  $37 \pm 0,5$  °C. Паралельно проводять інкубування за температури  $43 \pm 0,5$  °C посівів з кишечника і фекалій (посліду). Зразки кормів тваринного походження інкубують протягом 5-6 год. Після інкубування проводять висіви з селективних збагачувальних середовищ на щільні диференційно-діагностичні середовища. Під час вибирання селективного збагачувального середовища беруть до уваги, що діамантовий зелений стримує ріст окремих сероварів сальмонел, наприклад, *S. pullorum*, *S. dublin*, *S. enteritidis*.

Під час дослідження на сальмонелозносієвості додатково роблять по два посіви з внутрішніх органів (селезінки, печінки, фолікулів яєчників птиці) та жовчі, в яких локалізується збудник у бактеріоносіїв, у м'ясо-пептонний бульйон або 0,1 % у пептонну воду та інкубують їх паралельно за температури  $37 \pm 0,5$  °C і  $43 \pm 0,5$  °C, Через 5–6 год і 18–20 год після початку інкубування проводять висіви на диференційно-діагностичні середовища.

З абортіваних плодів овець необхідно зробити посіви і на сироватко-глюкозні середовища, оскільки *S. abortus* незадовільно росте на звичайних середовищах.

Висіви з паренхіматозних органів (за винятком печінки), крові, жовчі, кісткового мозку, вмісту фолікулів яєчників птиці, навколоплідної рідини абортованого плоду, хоріонлантоїсної рідини і вмісту жовчного міхура завмерлих ембріонів птиці роблять пастерівською піпеткою безпосередньо на

поверхню диференційно-діагностичних середовищ, у м'ясо-пептонному бульйоні і, за необхідності, у збагачувальне середовище (пептонну воду) і поміщають у термостат.

Печінку (не менше, ніж 20 г) розтирають у ступці з невеликою кількістю стерильного фізіологічного розчину; по 0,1 см<sup>3</sup> цієї суспензії висівають на диференційно-діагностичні середовища і водночас у м'ясо-пептонний бульйон і на м'ясо-пептонний агар. На диференційно-діагностичні середовища висівають також зіскрібки зі слизової оболонки сліпих відростків кишок і тонкого відділу кишечника.

Фекалії, доставлені без консерванту, суспендують у збагачувальному середовищі в співвідношенні 1:5. Із суспензії роблять посів на диференційно-діагностичні середовища. Висіви збагачувальне та диференційно-діагностичні середовища в поміщають у термостат. Для посіву використовують паралельно два диференційно-діагностичних середовища: вісмут-сульфітний агар і середовище Ендо (Плоскірева, Левіна).

Фекалії (послід), доставлені у фосфатно-буферному розчині, висівають у рівний об'єм збагачувального середовища подвійної концентрації.

Фекалії (послід), доставлені в гліцериновому консерванті, висівають у збагачувальне середовище в співвідношенні 1:5.

Посів крові роблять у 2–3 флакони або 6–7 пробірок м'ясо-пептонного бульйону, який містить 10–20 % бичачої жовчі у розрахунку 1:10, або у звичайний м'ясо-пептонний бульйон (у разі відсутності жовчі). Водночас роблять посів крові на диференційно-діагностичні середовища. Посіви витримують за температури  $37 \pm 0,5$  °С протягом 18-24 год. Посів краще проводити безпосередньо після забору крові.

Проводять посіви з внутрішніх органів і крові у рідкі неселективні збагачувальні живильні середовища (м'ясо-пептонний бульйон, пептонну воду)

і водночас на два щільних диференційно-діагностичних середовища – вісмут-сульфідний агар і середовище Ендо (Плоскірева, Левіна).

Посіви на рідкі середовища здійснюють пастерівськими піпетками. Посіви на щільні середовища здійснюють одним із трьох способів:

- із засіяних рідких середовищ – пастерівською піпеткою в кількості 0,05–0,1 см<sup>3</sup> (2–4) краплі з подальшим ретельним штрихуванням бактеріологічною петлею чи шпателем;

- зі шматочка досліджуваного органу: для цього поверхню органу припікають шпателем, відрізають стерильними ножицями і притуляють зрізаною поверхнею до поверхні щільного середовища; для посіву на кожную нову чашку використовують нову порцію посівного матеріалу;

- із суспензії досліджуваного органу: шматочки органів ретельно розтирають у стерильній ступці, заливають стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:4–1:5; одержану суспензію відстоюють протягом 20–30 хв і з верхньої частини надосадової рідини роблять посіви пастерівською піпеткою.

У разі підозри на хронічний перебіг захворювання додатково роблять посіви з легень, сліпих відростків кишечника, а також зі змінених фолікулів яєчника птиці. У цьому випадку паралельно з неселективними використовують селективні збагачувальні середовища (середовища накопичення): селенітове, Мюллера, Кауфмана, Кіліана, Посіви необхідно робити не менше ніж на два рідких селективних середовища, одне з яких не містить діамантового зеленого, оскільки останній стримує ріст, *S. gallinarum-pullorum*, *S. dublin*, *S. enteritidis*. у рідких живильних середовищах.

Посіви з тонкого відділу і сліпих відростків кишечника проводять на селективні збагачувальні (середовища накопичення) і щільні диференційно-діагностичні середовища.

Посіви у неселективні рідкі середовища і на щільні диференційно-діагностичні середовища інкубують протягом 18–20 год. за температури 37±0,5

°С, а посіви на вісмут-сульфідний агар – протягом 24–48 год. У разі підозри на хронічний перебіг захворювання або сальмонелозносіїство посіви на щільні диференційно-діагностичні середовища необхідно паралельно інкубувати за температури  $43\pm 0,5$  °С.

Посіви у селективні збагачувальні середовища інкубують протягом 8–12 год. (зіскрібки зі слизової оболонки кишечника) та  $72\pm 1$  год. (вміст фолікулів яєчника птиці, жовткового мішка ембріонів, селезінки) за температури  $37\pm 0,5$  °С.

Облік росту сальмонел проводять на щільних і рідких живильних середовищах. Посіви на щільні живильні середовища у чашках Петрі досліджують візуально за допомогою лупи.

У разі виявлення типових або підозрілих колоній здійснюють морфологічне дослідження за допомогою мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом. Мазки роблять не менше ніж з трьох однакових за культурально-морфологічними ознаками колоній.

Ріст сальмонел на диференційно-діагностичних живильних середовищах описаний в розділі 6.1.

У разі, коли на щільних живильних середовищах росту колоній мікроорганізмів не зареєстровано, а в рідких середовищах спостерігається розмноження мікроорганізмів (ріст різних сероварів сальмонел на м'ясо-пептонному бульйоні може характеризуватися рівномірним помутнінням, утворенням пристінкового кільця або поверхневої плівки, а також осаду, іноді слизового), роблять мазки, фарбують їх за Грамом і проводять мікроскопію. У разі виявлення в мазках грам-негативних паличок роблять посіви з рідких середовищ на щільні диференційно-діагностичні середовища.

У разі виявлення в мазках за допомогою мікроскопії грам-негативних паличок перевіряють культуру на наявність каталази. У разі позитивного результату проводять визначання біохімічних властивостей в об'ємі

мінімального диференціовального ряду для ентеробактерій (табл. 2, розділ 6.2), для чого роблять посіви у відповідні середовища. Досліджують окремо біохімічні властивості не менше ніж трьох однакових за культурально-морфологічними ознаками колоній.

Для одержання ізольованих колоній на поверхні щільних середовищ необхідно уникнути утворення конденсату в чашках з посівами. Це забезпечують охолодженням середовища перед розливом до температури  $50 \pm 0,5$  °C і подальшим підсушуванням його.

Досліджуваний матеріал зберігають за температури 4–8 °C, доки не буде проведено оцінювання результатів з посівів у чашки з диференційно-діагностичними середовищами.

Водночас роблять посіви у чашки Петрі на м'ясо-пептонний агар для визначання антибіотикограм і проводять серологічну ідентифікацію культур.

Проводять ідентифікацію виділених культур за результатами біохімічних досліджень і здійснюють облік антибіотикограм. Якщо за біохімічними властивостями культури віднесено до роду *Salmonella*, здійснюють визначання їх антигенної структури в реакції аглютинації на склі з сироватками сальмонельозними О-комплексними і монорецепторними О- і Н-аглютинувальними для експрес-ідентифікації сальмонел. Для цього використовують добові культури мікроорганізмів на м'ясо-пептонному агарі.

За потреби визначають біовари виділених культур сальмонел, застосовуючи додаткові біохімічні тести, наприклад, здатність ферментувати рамнозу і інозит - для *Salmonella typhimurium* або арабінозу, дульцит і рамнозу - для *Salmonella enteritidis*, *Salmonella dublin*.

Якщо ріст висіви крові відсутній на диференційно-діагностичних середовищах, первинні висіви у м'ясо-пептонний бульйон продовжують інкубувати ще вісім діб. На 3, 4, 6 і 10 дні інкубування роблять висіви з первинного посіву на диференційно-діагностичні середовища. Усі висіви на

диференційно-діагностичні середовища інкубують за температури  $37\pm 0,5$  °C протягом 48 год. Аналізування росту у висівах проводять через 8–24 год і через 48 год. У разі виявлення типових або підозрілих колоній проводять дослідження їх культурально-морфологічних, біохімічних і антигенних властивостей за наведеною вище схемою.

Якщо у первинних посівах на щільні живильні середовища характерні для сальмонел колонії відсутні, то здійснюють облік росту на чашках Петрі з посівами зі збагачувальних середовищ. У разі виявлення підозрілих колоній досліджують їх за наведеним вище порядком.

Якщо внаслідок проведення бактеріологічних досліджень з органів загиблої тварини виділено та типовано до виду сальмонелу, то діагноз на сальмонельоз вважають установленим. Дослідження припиняють.

Якщо характерні і підозрілі колонії в чашках з первинними посівами зі збагачувальних середовищ відсутні, результат дослідження є негативним.

Для визначання патогенних властивостей сальмонел проводять біопробу на білих мишах масою (15–18) г. Культуру вводять підшкірно в об'ємі 0,2–0,3 см<sup>3</sup> кількістю 50–100 млн мікробних клітин в 1 см<sup>3</sup>. Тварини гинуть через 2–10 діб.

Діагноз вважають встановленим у разі виділення з патологічного матеріалу культури з відповідними морфологічними і біохімічними ознаками і визначання її серовару.

### **3. МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ *SALMONELLA SPP.* В КОРМАХ ДЛЯ ТВАРИН**

#### **3.1. Відбір зразків та готування проб до досліджень**

Обладнання для відбору зразків повинно бути виготовлено з неіржавіючої криці або іншого матеріалу відповідної міцності та якості, який не буде

викликати змін у пробі. Його поверхня повинна бути гладенькою, вільною від тріщин, усі кути – заокруглені. Перед стерилізацією чисті сухі інструменти загортають у папір.

Інструменти та ємності для відбору проб повинні бути сухими, попередньо простерилізованими. Якщо використовується пластикове обладнання, то воно повинне бути стерильним.

Стерилізацію проводять двома методами:

А – витримуванням в гарячому повітрі за температури  $160^{\circ}\text{C}$  протягом 2 год;

В – витримуванням в парі за температури не менше  $121\pm 1^{\circ}\text{C}$  протягом 20 хв (в автоклаві).

Після стерилізації методом А або В обладнання слід зберігати в стерильних умовах не більше 30 діб.

Якщо стерилізація методом А або В неможлива, можна використовувати альтернативні методи, які припустимі лише у випадку негайного використання обладнання. Допоміжними методами є:

С – затримування в полум'ї, яке б контактувало з усіма робочими поверхнями обладнання;

Д – занурювання в розчин етанолу з об'ємною часткою спирту не менше 70% з подальшим фламбуванням.

Відбір зразків для мікробіологічного дослідження здійснюють в асептичних умовах. Обладнання для відбирання зразків і тара повинні бути стерильними.

Відбір середнього зразку для бактеріологічного дослідження за наявності запакованої в тару продукції проводять згідно табл. 1

За наявності не запакованої продукції зразки відбирають не менше, ніж із 20 місць однорідної партії (однорідною партією вважається кількість корму, яка виготовлена по одній технології в одну зміну, запакована в мішки або іншу тару

або знаходиться в не запакованому вигляді (насіпом) та доставлена одним видом транспорту) зі всієї площі насипу. Маса однієї точкової проби повинна становити не менше 100 г. Маса об'єднаної проби повинна становити не менше 500 г.

*Таблиця 1*

<b>Об'єм партії (кількість одиниць)</b>	<b>Порядок відбору</b>
До 10	Від кожної запакованої одиниці
Від 10 до 100	Від 10 запакованих одиниць
Від 101 та вище	Від 10 запакованих одиниць і додатково по 3 з кожних 100 запакованих одиниць
Відбір консервованої продукції об'ємом:	
50 см <sup>3</sup>	8 шт.
50-100 см <sup>3</sup>	5 шт.
100-200 см <sup>3</sup>	3 шт.
200-300 см <sup>3</sup>	3 шт.

Відібрану пробу ретельно перемішують стерильною ложкою або шпателем, зважують або відміряють 1 г або 1 см<sup>3</sup> в стерильних умовах та готують первинне (вихідне) десятикратне розведення корму (10<sup>-1</sup>) в стерильній буферно-пептонній воді або фізіологічному розчині (9 см<sup>3</sup> розчинника). Проводять гомогенізацію зразків у стерильних пакетах для гомогенізації за допомогою гомогенізатора або BagMixer (або вортексу). Допускається механічне перемішування зразків у колбах або ступках.

Щоб уникнути пошкодження мікроорганізмів раптовими коливаннями температури, температура розчинника в ході операцій, описаних нижче, повинна бути приблизно такою ж, як і температура дослідного зразку.

Стерильною піпеткою відбирають 1 см<sup>3</sup> вихідної суспензії та переносять в пробірку з 9 см<sup>3</sup> стерильної буферно-пептонної води / фізіологічного розчину (одержують розведення (10<sup>-2</sup>). Після чого суспензію гомогенізують та іншою стерильною піпеткою переносять в наступну пробірку з 9 см<sup>3</sup> стерильного фізіологічного розчину, роблять ряд необхідних десятикратних розведень.

### 3.2. Виділення сальмонел

25 г/см<sup>3</sup> зразка вносять до 225 см<sup>3</sup> середовища передзбагачення (буферно-пептонної води). Дану суспензію можна використовувати як вихідне розведення (10<sup>-1</sup>). Культивують за температури 37±1 °С 18–20 год; 0,1 см<sup>3</sup> одержаної культури переносять до 10 см<sup>3</sup> середовища Раппапорт-Вессіліадіс та до 10 см<sup>3</sup> селеніт-цистинового середовища. Можливо також використання середовища Мюллера-Кауфмана. Культивують: середовища Раппапорт-Вессіліадіс – 41,5±1°С 24 год, селеніт-цистинове та середовища Мюллера-Кауфмана – 37±1 °С 24 год.

Культури, отримані на середовищах збагачення, висівають за допомогою петлі на поверхню двох селективних середовищ для виявлення сальмонел (на вибір): ксилозо-лізин-діоксихолатний агар (XLD), Ендо, вісмут- сульфід агар (ВСА), феноловий червоний діамантово-зелений агар (ДЗА) тощо. Для одержання більш швидкого результату рекомендується використовувати посів на хромогенні середовища видової ідентифікації (Rambach агар, сальмонеладиференційний агар тощо).

Чашки поміщають в інкубатор за температури 37±1°С на 24–48 год (в залежності від вибраного середовища, інструкцій виробника).

Після інкубації переглядають ріст на чашках на наявність типових для *Salmonella* колоній (розділ 6.1).

З кожної чашки відсівають не менше 5 типових для *Salmonella* колоній на поверхню поживного агару. Культивують за температури 37±1°С 24 год.

Далі проводиться біохімічна ідентифікація та серологічне типування виділених культур сальмонел (описано в розділі 6.2).

### 3.3. АВТОМАТИЗОВАНИЙ МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *SALMONELLA* ЗА ДОПОМОГОЮ ПРИЛАДУ MINI-VIDAS

Суть методу – фермент-зв'язаний-флуоресцентний аналіз. Проводиться на автоматичних аналізаторах VIDAS.

Наконечник, який використовується як титрувальний пристрій, одночасно служить носієм твердої фази. На внутрішню сторону наконечника нанесені антитіла до *Salmonella spp.* Реактиви, необхідні для аналізу, знаходяться в лунках стріпа.

**Проведення випробування.** Попереднє збагачення: стерильно внести 25 г (25 см<sup>3</sup>) зразку в 225 см<sup>3</sup> буферно-пептонної води, гомогенізувати. Інкубувати протягом 16–20 год за температури 37±1 °С.

Збагачення: після закінчення інкубації переносимо 0,1 см<sup>3</sup> суспензії в 10 см<sup>3</sup> бульйону Раппапорта-Вассіліадіса (RV) соєвого. Інкубувати 6–8 год за температури 41,5±1 °С.

Вторинне збагачення: після закінчення інкубації перенести 1 см<sup>3</sup> бульйону Раппапорта-Вассіліадіса соєвого в 10 см<sup>3</sup> бульйону М. Продовжувати культивувати RV бульйон та бульйон М протягом 16-20 год за температури 41,5±1 °С (М бульйон можна зберігати не більше 48 год за температури 2-8 °С до постановки тесту на приладі VIDAS).

Після закінчення інкубації перенести 1 см<sup>3</sup> бульйону М в іншу стерильну пробірку. Щільно закрити пробірку та помістити у водяну баню на 15±1 хв за температури 95–100 °С.

Після того, як прокип'ячений бульйон остигне, проводять тест на приладі VIDAS згідно протоколів дослідження виробника. При одержанні позитивного

результату, виявлення сальмонел слід підтвердити класичним (мікробіологічним) методом.

#### **4. ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМИВІ З ОБ'ЄКТІВ ВИРОБНИЦТВА ТА РЕАЛІЗАЦІЇ, ЯКІ ПІДЛЯГАЮТЬ ВЕТЕРИНАРНОМУ НАГЛЯДУ НА НАЯВНІСТЬ *SALMONELLA SPP.***

##### **4.1. Підготовка матеріалу, відбір змивів та відбитків**

Тампони для відбору змивів роблять на металевих стрижнях завдовжки 18-20 см, пропущених через ватно-марлеві, коркові, гумові або металеві пробки. Змонтовані тампони поміщають у пробірки, закривають їх та стерилізують за температури 121°C (1,0 атм) протягом 30 хв. Потім в кожную пробірку з тампоном наливають по 2 см<sup>3</sup> стерильного розчинника (дистильованої води, фізіологічного розчину, пептонно-буферної води та інших) так, щоб ватний тампон знаходився над поверхнею рідини на висоті 2–3 см. Дозволяється відбирати зразки змивів безпосередньо у 5 см<sup>3</sup> селективного середовища (Мюллера, Кауфмана, Кілліана або селенітовий бульйон).

Підготовлений до відбору зразків матеріал використовують упродовж доби, дотримуючись правил асептики, а за необхідності – згідно встановлених вимог до витратних матеріалів, не довше трьох діб.

*Для відбору відбитків* застосовують комерційні агарові пластини або виготовляють витратні матеріали самостійно.

Готують предметні скельця (розміром 2,5×7,5 см або 1,2×7,5 см). Скельця кип'ятять 10–15 хв у 2-5% розчині миючого засобу. Потім йоршиком поверхнево з обох сторін предметне скло натирають порошком або миючим засобом, злегка зволожуючи водою. Після чого ретельно промивають скло під проточною водопровідною водою, ополіскуючи в дистильованій воді, й висушують.

Ванни, лотки та інший посуд, який використовується для приготування скелець для відбитків, попередньо ретельно миють гарячим мильним розчином, потім ополіскують водопровідною водою, далі обробляють 70% етиловим спиртом або кип'яченою дистильованою водою і піддають знезараженню УФ-променями впродовж 2 год.

У стерильному боксі на предметні скельця наносять тонкий шар розплавленого щільного поживного середовища (Ендо, тощо). Прогріті над полум'ям предметні скельця, взяті корнцангами, розкладають на рівній горизонтальній поверхні столу. На них піпеткою наносять агар, відступивши на 2 см від поперечного краю скла. На вузьке предметне скло наносять  $0,15 \text{ см}^3$  (4 краплі) і  $0,33 \text{ см}^3$  (8 крапель) – на широке. Потім піпеткою під кутом  $30^\circ$  розподіляють середовище по середній третині поверхні скла та підсушують на повітрі за кімнатної температури за асептичних умов.

Для переміщення агарових пластин застосовують пластмасові ванни (лотки) або інші ємності для предметних скелець (контейнери, чашки Петрі), що закриваються. На дно ємностей попередньо вносять  $1 \text{ см}^3$  та в пробірки –  $0,1 \text{ см}^3$  стерильної дистильованої води / фізіологічного розчину для підтримання вологості.

Підготовлені скельця із середовищами зберігають за температури  $3 \pm 2^\circ\text{C}$  не більше 10 діб. з агаром Ендо – 2–3 доби в затемненому місці.

**Відбір проб змивів** проводять після закінчення терміну експозиції, але до початку провітрювання приміщень. З одягу працівників - після знезараження, прання, відтискання, прасування.

Проби змивів беруть з усіх поверхонь, які контактують з продукцією у процесі виробництва, з інструментів та іншого інвентарю, що знаходиться в приміщенні.

Змиви зі стін, панелей кімнат та холодильників відбирають на рівні 1–1,5 м від підлоги з площі  $100 \text{ см}^2$  ( $10 \times 10 \text{ см}$ ).

Зі столів, дошок, тари, колод, терезів, столів, пилки, нарізних машин, пакувальних та вакуумних машин відбирають з площі в 100 см<sup>2</sup>.

З дрібних предметів: ножів, сокир, виделок, ложок, мускатів, ополоників, спиць, решіток, частин м'ясорубки, лопатей фаршемісу, полотна пилки, посуду та іншого інструменту – з усієї поверхні.

Зі шлангів і трубопроводів змиви відбирають без обліку площини - із внутрішньої поверхні по всій довжині спірально.

Змиви із санітарного одягу беруть перед початком роботи, протираючи одним тампоном чотири площі по 25 см<sup>2</sup> (нижня частина кожного рукава і дві площі з верхньої передньої частини спецодягу).

Змиви з рук відбирають перед початком роботи, протираючи поверхні долоні рук, проводячи вологим тампоном не менше п'яти разів по кожній долоні і пальцях, під нігтями.

Дозволяється однією петлею відібрати пробу-змив з трьох однакових предметів - одна об'єднана проба (для ринків).

Тампоном, змоченим безпосередньо перед взяттям змиву в розчиннику, в горизонтально-вертикальному напрямі (до 10 разів у кожному) щільно протирають поверхню об'єкту, після чого повертають тампон назад у пробірку.

Пробірки маркують: на першій пробірці позначають найменування об'єкту і номер проби (згідно акту відбору), дату відбору і час, мету дослідження (у разі відбору змивів на декілька різних показників). Транспортувати зразки змивів необхідно в сумках-холодильниках у вертикальному положенні, щоб попередити витікання розчинника, не довше, ніж 6 годин, за температури +5–10°C (при цьому відібрані зразки не повинні торкатись холодоагентів).

Проби повинні бути досліджені не пізніше, ніж через 6 годин з моменту відбору.

**Відбитки** відбирають шляхом прикладання пластин / скелець із поживним середовищем до поверхні дослідного об'єкту протягом 2 хв так, щоб уся

поверхня середовища торкалася до дослідної поверхні, далі – відбитки поміщають у стерильний посуд (ванну, контейнер, пробірку, чашку Петрі) для транспортування у лабораторію.

Якщо площа відбору вертикальна або важкодоступна, то експозиція контакту повинна тривати від 30 с до 1 хв.

Час доставки відбитків у лабораторію не повинен перевищувати 6 годин за кімнатної температури. За необхідності зразки відбитків необхідно транспортувати в сумках-холодильниках на льоду.

При відборі змивів та відбитків складають акт відбору, де вказують: найменування організації та адресу, напрямок діяльності, дату і час відбору, П.І.Б. осіб, які відібрали та у присутності кого, перелік місць та об'єктів відбору, час доставки в лабораторію та іншу необхідну інформацію, що впливає на результати досліджень.

Дозволяється застосовувати інші комерційні системи, які зареєстровані в Україні і мають відповідне призначення, наприклад, свеб-системи, нова-стріки, хай-діпи, вимоги до використання та транспортування згідно інструкції виробника.

**Приготування розведень.** У пробірки із 2 см<sup>3</sup> змивної рідини додають 8 см<sup>3</sup> розчинника, тампон ретельно відмивають у цій рідині, віджимають і видаляють, пробірку закривають стерильною пробкою. Дане розведення вважається вихідним (10<sup>0</sup>).

Далі готують три десятикратних розведення 1:10, 1:100 і 1:1000. З вихідного розведення відбирають стерильною піпеткою 1 см<sup>3</sup> суспензії і вносять у 9 см<sup>3</sup> розчинника, суспендують, отримуючи таким чином перше розведення 1:10 (10<sup>1</sup>). Наступні десятикратні розведення готують аналогічно, кожного разу використовуючи нову стерильну піпетку.

## 4.2. Виділення сальмонел

1 см<sup>3</sup> суспензії висхідного розведення засівають у пробірку із середовищем накопичення (Мюллера, Кауфмана, Кілліана або селенітовий бульйон) і культивують за температури 37±1°C 16-20 год. Дозволяється відбирати змиви одразу на пептонно-буферну воду та інкубувати за того ж температурного режиму з подальшим пересівом у пробірки з 5 см<sup>3</sup> одного із вище наведених середовищ накопичення.

Після накопичення проводять пересів на два диференційно-діагностичні агари на вибір (Ендо, Плоскірева, Левіна, вісмут-сульфіт агар або інші) бактеріологічною петлею штрихом і культивують за температури 37±1°C 18-24 год, ВСА – 48 год. Культуральні характеристики росту сальмонел описані в розділі 6.1.

Підозрілі колонії пересівають на МПА / ТСА, культивують 20–24 год за температури 37±1°C.

Проводять визначення морфологічних та тинкторіальних властивостей. Колонії фарбують за Грамом. Сальмонели – грам-негативні дрібні палички. Визначають ферментацію вуглеводів (розділ 6.2).

Серологічне підтвердження належності сальмонел проводять у реакції аглютинації з полівалентними сальмонельозними сироватками (розділ 6.3).

## 5. ВИЯВЛЕННЯ НАЯВНОСТІ ВИДІВ *SALMONELLA* У ВОДІ (ПИТНІЙ, ВОДОЙМИЩ, СТІЧНІЙ, ІНШІЙ)

Сальмонели відносяться до числа найбільш розповсюджених і в той же час стійких до дії фізико-хімічних факторів мікроорганізмів – збудників гострих кишкових інфекцій, які поряд з іншими мають водний шлях передачі. На сьогодні ідентифіковано понад 2500 сероварів сальмонел, і не існує жодного рівноцінного методу виділення для всіх відомих сероварів.

Запропоновані у даних методичних рекомендаціях методи є досить ефективними для виявлення багатьох циркулюючих у воді сероварів.

Як правило, сальмонели присутні у воді в низьких концентраціях. Тому бажано проводити їх попереднє концентрування, що дозволяє уникнути ускладнень при роботі з великими об'ємами води. Крім того, сальмонели у водному середовищі зазнають ушкодження, і для відновлення їх фізіологічної активності доцільно використовувати неселективне попереднє збагачення, щоб відбулося відновлення фізіологічної активності сальмонел, але не відбулося інтенсивного розмноження супутньої мікрофлори. Наступне селективне збагачення створює більш сприятливі умови для розвитку сальмонел у порівнянні із супутньою мікрофлорою, що підвищує результативність аналізу.

### **5.1. Відбір, зберігання і транспортування проб води**

Проби води відбирають у спеціально призначені для такого відбору води стерильні флакони місткістю не менше 500 см<sup>3</sup> зі щільно закритими пробками, які захищені та фіксовані ковпачками. Пробки повинні бути з матеріалу, який витримує стерилізацію сухим жаром чи в автоклаві. Ватно-марлеві пробки після стерилізації заміняють на стерильні щільні пробки. Проби відбирають в об'ємі не менше 1-5 дм<sup>3</sup> у залежності від передбачуваної концентрації сальмонел у воді та методу визначення.

Відбір проб проводять з дотриманням правил асептики: пробка з ковпачком знімається безпосередньо перед відбором проби, край флакона та пробка не повинні ні до чого торкатися. Після відбору проби флакон щільно закривають пробкою з ковпачком, який фіксують. Води відбирають стільки, щоб не замочити пробку під час транспортування. Якщо пробка замочилася, то це обов'язково відмічають у супроводжувальних документах.

Проби води з водорозбірних кранів відбирають після їх стерилізації шляхом фламбування тампоном, змоченим спиртом, і наступного спускання

води протягом 10-15 хвилин при повністю відкритому крані. Воду відбирають безпосередньо з крану без гумових шлангів, водорозподільчих сіток чи інших насадок. Якщо через пробовідбірний кран відбувається постійний вилив води, відбір проб проводять без попереднього фламбування, не змінюючи напору води і наявної конструкції, облаштованих силіконовими чи гумовими шлангами.

Проби хлорованої водопровідної води відбирають в ємкості, куди попередньо для нейтралізації залишкової кількості дезінфектанту вносять до стерилізації 10 мг натрію сірчистокиислого у вигляді кристалів чи 2 см<sup>3</sup> його 1,5% розчину на 500 см<sup>3</sup> води.

При відборі проб в одній і тій же точці для різних досліджень першими відбирають проби для бактеріологічних досліджень.

Відібрані проби маркують і супроводжують актом відбору проб води, в якому вказують:

- при відборі проб з очисних споруд – етап очищення та місцезнаходження точки контролю;
- при відборі проб з периферичної водопровідної мережі – точне місце знаходження водорозбірного крану, з якого відбирали проби;
- нормативно-технічний документ, згідно якого проведений відбір;
- дату та час відбору і доставки проби;
- особливі обставини, які мали місце при відборі проб (час спуску води з крану, умови транспортування тощо);
- мету дослідження: відбір проби в порядку поточного санітарно-епідеміологічного нагляду, за епідпоказаннями чи за особливими обставинами (рекомендації санітарно-епідеміологічної служби, звернення населення при змінах органолептичних властивостей води тощо).

Доставка проб здійснюється в продезінфікованих термokonтейнерах за температури  $+6\pm 2$  °C. В холодний період року контейнери повинні мати

терморегулюючі прокладки, які запобігають промерзанню проб. Допускається зберігати проби води за  $+6 \pm 2$  °C до 24 год.

**Підготовка проб води.** Перед мікробіологічним дослідженням пробу ретельно перемішують. Край ємкості фламбують для запобігання можливого вторинного забруднення, яке може мати місце під час транспортування. На флаконах, пробірках і чашках, які використовуються для дослідження, позначають номер проби, об'єм, дату посіву. Перед кожним відбором нової порції води для аналізу зразок перемішують стерильною піпеткою.

Для фільтрації використовують мембранні фільтри діаметром від 35 до 50 мм з розмірами пор 0,45 мкм в стерильній та нестерильній упаковках.

Нестерильні фільтри стерилізують безпосередньо перед їх використанням: кип'ятінням або іншим способом, рекомендованим фірмою-виробником. Для кип'ятіння фільтри кладуть у склянку або медичний стерилізатор з дистильованою водою, нагрітою до 30 °C, повільно доводять до кипіння на слабкому вогні, після чого воду міняють і кип'ятять 10 хвилин. Підготовлені фільтри використовуються протягом робочого дня.

**Підготовка фільтрувального апарату.** Лійку та столик фільтрувального апарату протирають ватним тампоном, змоченим спиртом, і стерилізують фламбуванням.

Після охолодження на нижню частину фільтрувального апарату (столик) кладуть стерильним пінцетом підготовлений мембранний фільтр, притискають його верхньою частиною приладу (лійкою), яку закріплюють пристроєм, передбаченим конструкцією приладу.

**Методика фільтрування води.** Перед проведенням дослідження перевіряють правильність складання фільтрувального апарату. Для цього в лійку фільтрувального апарату, дотримуючись правил стерильності, наливають необхідну кількість води і утворюють вакуум у приймальному посуді. Вода не повинна вилитися за межі фільтра або проникати через фільтр до утворення

вакууму. Після цього можна починати досліджувати пробу води.

При посіві декількох об'ємів однієї проби слід фільтрувати через один фільтрувальний апарат спочатку менші, а потім більші об'єми води, замінюючи кожного разу фільтри. При фільтрації невеликих об'ємів води ( $1 \text{ см}^3$ ) у лійку спочатку наливають  $10 \text{ см}^3$  стерильної води, а потім вносять досліджувану пробу води. При відсутності мірних міток у лійці проби об'ємом  $100 \text{ см}^3$  і більше відбирають стерильними піпетками Мора, а об'ємом  $10$  та  $1 \text{ см}^3$  – стерильними піпетками.

Після закінчення фільтрування лійку знімають, фільтр обережно піднімають за край профламбованим пінцетом при зберіганні вакууму для видалення залишків вологи на нижній поверхні фільтру, а потім переносять його, не перевертаючи, на поверхню відповідного середовища, розлитого в чашки Петрі, запобігаючи утворенню пухирців повітря між фільтром і середовищем. Поверхня фільтру з бактеріями, які осіли на неї, повинна бути повернена вгору. Вакуум відключається до внесення наступної порції води, що досліджується.

Під кожним фільтром на дні чашки роблять напис із зазначенням об'єму профільтрованої води, дати посіву і номера проби. На одній чашці можна розмістити 2–4 фільтри за умови, що фільтри не торкаються один одного.

Якщо досліджувана вода має велику кількість завислих речовин чи клітин фітопланктону, то її попередньо фільтрують через передфільтр для видалення зависі великих розмірів. Для цього передфільтр розташовують у фільтрувальному апараті над фільтром для бактеріологічного аналізу. Після закінчення фільтрування два фільтри (передфільтр і фільтр) переносять на середовище. При підрахунку результатів аналізу враховують ріст бактерій на обох фільтрах.

## 5.2. Виділення сальмонел

**Принцип методу.** Метод полягає в концентрації проб, накопиченні сальмонел у середовищі попереднього збагачення з наступним збагаченням в елективних рідких поживних середовищах, селекцією на двох різних диференційно-діагностичних поживних середовищах та ідентифікацією виділених мікроорганізмів за біохімічними і серологічними ознаками (схема 1).

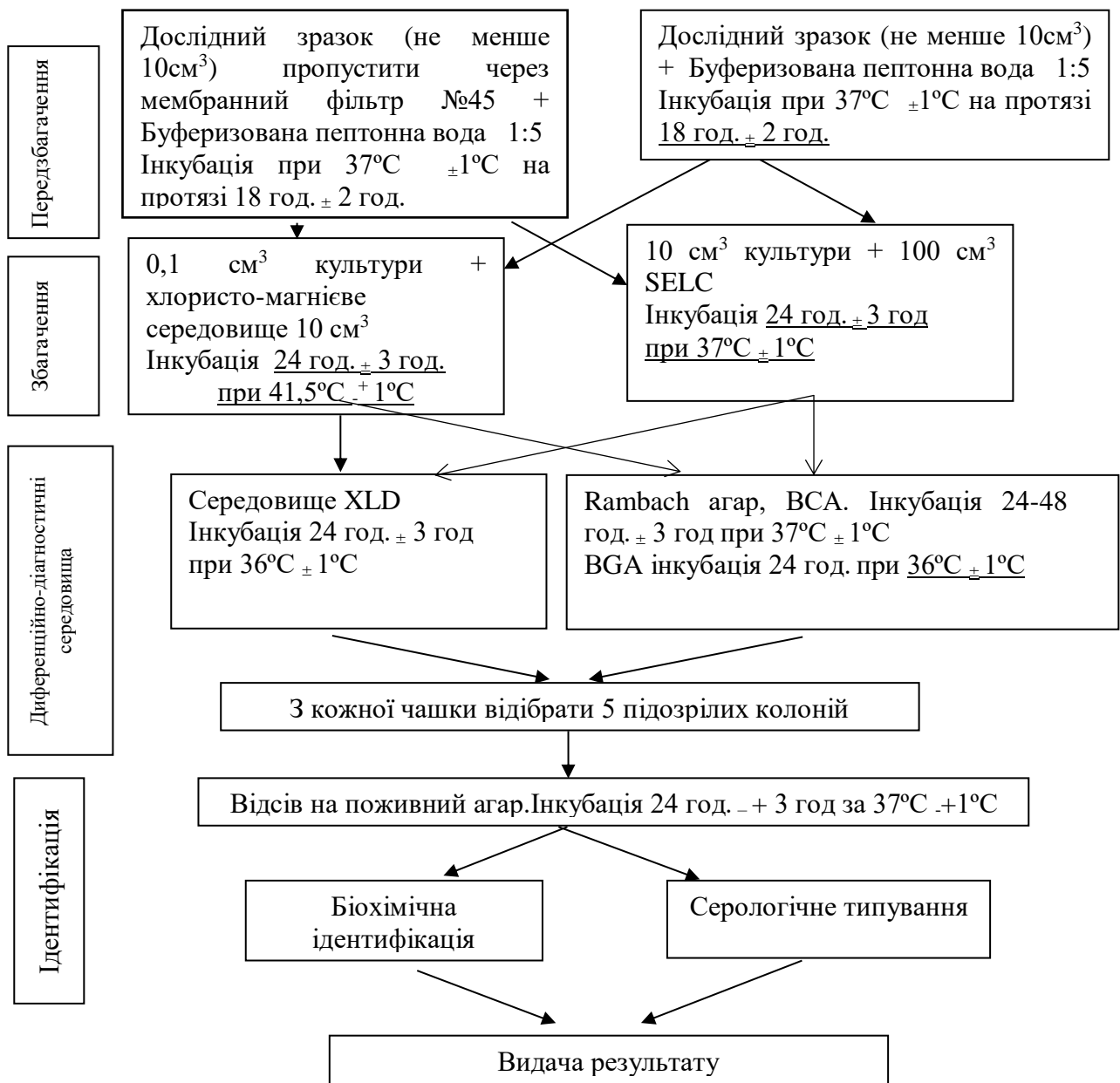


Схема 1. Принцип методу дослідження води з використанням мембранних фільтрів

З метою підвищення результативності дослідження води на наявність сальмонел найчастіше виконують наступні послідовні методичні прийоми першого етапу дослідження:

- концентрування,
- попереднє збагачення,
- елективне збагачення.

**Варіанти першого етапу дослідження.** У залежності від рівня передбачуваного забруднення води, наявності устаткування для фільтрації води можливі такі варіанти першого етапу дослідження:

- фільтри без попереднього збагачення проби відразу поміщають у рідкі елективні поживні середовища. У цьому випадку 1 дм<sup>3</sup> води поділяють на два об'єми по 500. см<sup>3</sup> і кожен об'єм фільтрують через окремий фільтр.

- досліджувану воду безпосередньо засівають у середовище попереднього збагачення (фосфатно-буферна пептонна вода) подвійної концентрації у співвідношенні 1:1.

- досліджувану воду об'ємом по 500 см<sup>3</sup> відразу засівають у елективні рідкі середовища подвійної концентрації.

У робочих журналах обов'язково відзначають, яким способом виконано перший етап дослідження.

**Виконання методу концентрування.** Концентрування сальмонел здійснюється *методом мембранної фільтрації*.

Воду об'ємом не менше 1 дм<sup>3</sup> фільтрують через один-два фільтри у залежності від кількості завислих речовин. Для дуже каламутних вод використовують передфільтри.

Фільтри стерильним пінцетом переносять у 100 см<sup>3</sup> буферної пептонної води нормальної концентрації (для попереднього збагачення. Інкубацію всіх фільтрів та передфільтрів однієї проби проводять разом. Інкубація за 36±1 °С не більше 16 год.

По 1 см<sup>3</sup> збагаченої проби переносять у 10 см<sup>3</sup> елективних рідких середовищ нормальної концентрації – селенітовий бульйон магнієве середовище, середовище Мюллера. При цьому використовують не менше двох середовищ збагачення. Флакони з посівами інкубують за 36 ± 1 °С протягом 16-24 год.

Після інкубації проводять висів на щільні диференційно-селективні середовища: чашки з вісмут-сульфіт агаром, середовищами Ендо, Плоскірева, ксилозо-лізин-дезоксихолатним агаром, діамантово-зеленим агаром, SS-агаром тощо. При пересіванні на кожну пробу використовують не менше 2 чашок з селективними середовищами. Чашки із середовищами Ендо, Плоскірева, Мак-Конкі, ксилозо-лізин дезоксихолатним агаром, діамантово-зеленим агаром, SS-агаром інкубують за 36 ± 1 °С протягом 24 год., із вісмут-сульфіт агаром за умов тієї ж температури – 48 год.

Після інкубації чашки переглядають і відзначають підозрілі на сальмонели колонії. Колонії сальмонел легко знімаються з агару, їм не властива слизувата або клейка консистенція. Ріст на диференційно-діагностичних середовищах описаний в розділі 6.1.

З чашок відбирають по 2-3 підозрілі колонії кожного типу і засівають у пробірки з середовищем Олькеницького або Кліглера. Штрихом засівають скошену частину і уколом – стовпчик.

Пробірки із середовищем Олькеницького або Кліглера інкубують за 36 ± 1 °С протягом 24 год. Облік результатів проводять відповідно до ознак, наведених у таблиці 2 розділу 6.2, які дозволяють зробити первинну ідентифікацію.

Якщо при первинному посіві і при висіві із середовищ збагачення підозрілих колоній не виявлено, може бути видана відповідь про негативний результат дослідження.

**Концентрація проб методом осадження.** Концентрацію сальмонел у

пробах води, що мають велику кількість завислих речовин, доцільно проводити методом осадження за допомогою розчину сульфату алюмінію. До проби води об'ємом 1-5 дм<sup>3</sup> при помішуванні вносять 20 см<sup>3</sup> на 1 дм<sup>3</sup> води 10% розчину сірчаноокислому алюмінію. Після перемішування проби доводять рН води до 5,4–5,8. Пробу витримують 16–20 годин за 6±2 °С для випадіння осаду.

Рідину над осадом зливають, а осад із залишками води засівають у елективні середовища збагачення подвійної концентрації у співвідношенні 1:1.

Усі підозрілі культури пересівають на поживні середовища мінімального диференційного ряду для підтвердження належності даної культури мікроорганізмів до роду *Salmonella* і проводять серологічну ідентифікацію (розділ 6.3).

Для прискорення досліджень, отримання відтворюваних результатів доцільно для біохімічної ідентифікації використовувати діагностичні системи та набори, що зареєстровані в Україні, типу ЕНТЕРОтест (PLIVA-Lachema), АРІ(bioMereux).

Крім наведених вище тестів ідентифікації виділених культур роблять також посів виділеної культури для дослідження її на **чутливість до сальмонельозного О-бактеріофагу**.

Для цього дві краплі 4-х або 18-годинної бульйонної культури досліджуваного штаму наносять тонко відтягнутою пастерівською піпеткою або петлею (діаметр 0,4–0,5 мм) на добре підсушений слабо лужний агар у чашці Петрі. Після підсихання на одну з крапель петлею або пастерівською піпеткою меншого діаметру наносять О-бактеріофаг, а на іншу, як контроль, - краплю бульйону. Фаг наносять у робочому розведенні, зазначеному на етикетці. На одній чашці, таким чином, можна випробувати одночасно 5–6 культур. Чашки з нанесеними культурами і О-бактеріофагом поміщають у термостат за 36 ± 1 °С на 18–20 годин, після чого проводять облік результатів.

Поява на місці нанесення фагу чітко обмеженої зони зливного лізису або

більшого чи меншого числа негативних колоній, чітко видимих неозброєним оком, свідчить про чутливість культур до О-бактеріофагу.

При відсутності лізису в місцях нанесення фагу буде суцільний ріст культури, як у контролі.

О-фаг може бути використаний для попереднього дослідження культури з чашки з диференційним середовищем.

Культура, що лізується О-фагом, є підозрілою на сальмонелу і може бути прямо з чашки випробувана в реакції аглютинації з полівалентними сальмонельозними О-сироватками.

Атипові сальмонельозні культури в більшості випадків чутливі до О-фагу, в той час як культури, подібні до сальмонел за біохімічними властивостями (наприклад, лактозонегативні *E. coli*), як правило, не лізуються цим фагом.

Серологічну ідентифікацію сальмонел починають з випробовування їх у реакції аглютинації на склі з полівалентною сироваткою. Більш детально серологічна ідентифікація описана в розділі 6.3.

Результати оцінюють по кожній пробі окремо. Штами, що дають типові біохімічні властивості та позитивні серологічні реакції з полівалентною аглютинуючою сальмонельозною сироваткою, відносяться до сальмонел. Позитивні реакції аглютинації з О- та Н-сальмонельозними сироватками дозволяють встановити антигенну формулу виділеної культури, тобто її серологічний варіант.

## **6. ІДЕНТИФІКАЦІЯ САЛЬМОНЕЛ**

### **6.1. Ріст на диференційно-діагностичних середовищах**

Сальмонели на диференційно-діагностичних агарах ростуть за наступними культуральними характеристиками:

На **вісмут-сульфідному агарі** більшість сероварів сальмонел утворюють чорні колонії з металевим графітним блиском і редуційною зоною – пігментацією від коричневого до чорного кольору та провалюванням середовища під колонією. Можливий ріст колоній з чорним центром і напівпрозорим краєм, а також невеликих плоских колоній темно-зеленого кольору. В міру старіння колоній з'являється піднятий центр і валик навколо центру.

Сальмонели серогрупи С (наприклад, *Salmonella cholerae suis*), утворюють ніжні, кольору середовища (зеленуваті) колонії. Іноді, за щільності більш ніж 100 колоній на чашку, такі самі колонії здатні утворювати і сальмонели інших серогруп, наприклад, Д<sub>1</sub> (O9). Представники роду *Citrobacter* здатні також утворювати чорні колонії з металевим блиском. Однак під їх колоніями відсутня редуційна зона, а ріст супроводжується неприємним запахом.

На середовищі **Ендо** – сальмонели утворюють прозорі колонії, ледь рожеві за кольором, які часто мають більшу щільність у центрі. Зміни кольору середовища не відбувається

На середовищі **Плоскірєва** – дрібні прозорі колонії, можуть бути злегка мутнуватими, іноді в центрі колонії спостерігається почорніння.

На середовищі **Левіна** - сальмонели утворюють прозорі колонії; можуть бути з фіолетовим відтінком або світло-рожеві.

**Агар Еделя Кампельмахера** (феноловий червоний **діамантово-зелений агар**, ДЗА) – ріст дрібних колоній (1-2 мм), колір колоній може бути від рожево-сірого до червоно-рожевого (*S. typhi* – рожево-червоні). Типові для сальмонел колонії, викликають зміну кольору агару на рожевий або червоний.

На **XLD агарі** (ксилозо-лізин-дезоксихолатний агар) – сальмонели утворюють прозорі колонії червоного або рожевого кольору з чорним центром, жовті по краях. Колір середовища змінюється на червоний. Сальмонели, які не продукують сірководень, наприклад *S. typhi*, *S. senftenberg*, *S. pullorum*, можуть

рости у вигляді червоних колоній без почорніння.

На *Rambach* агарі - ріст червоних колоній.

На *диференційному агарі сальмонел* (ДАС) - ріст червоних колоній.

*Мак-Конкі, SS-агар* - це безбарвні або блідо-рожеві злегка опуклі блискучі колонії.

## 6.2. Біохімічна ідентифікація

З метою біохімічної ідентифікації проводять посів на *трицукровий залізовмістний агар (TSI агар) / середовище Кліглера / середовище Олькеницького* петлею штрихом на поверхню скошеного агару та уколом в стовпчик. Культивують за температури  $37 \pm 1$  °C 24 год.

На середовищах Олькеницького або Кліглера оцінюють забарвлення та газоутворення. При рості сальмонел стовпчик забарвлюється в жовтий колір через ферментацію глюкози. Скошена частина середовища залишається блідо-рожевою при відсутності ферментації лактози, сахарози або обох вуглеводів. Газоутворення встановлюють по тріщинах та розривах у стовпчику агару. Утворення сірководню виявляють на основі почорніння середовища (від темної лінії по місцю проколу середовища до розлитого почорніння усього стовпчика). Гідроліз сечовини виявляється по відновленню рожевого кольору стовпчика середовища.

Ріст сальмонел - позитивна реакція на Олькеницького, Кліглера – скошена частина агару без змін (відсутність ферментації - лактози / сахарози), а у стовпчику зміна кольору середовища на жовтий (ферментація глюкози), присутність чи відсутність газу та почорніння агару (продукування сірководню).

Проводять посів колоній у *бульйон з вуглеводами (глюкозою, лактозою, сахарозою) або в середовище Гісса* з відповідними цукрами. Також можна застосовувати диски, просочені вуглеводами, які поміщають у бульйон з

індикатором (наприклад, феноловий червоний) або в чашку на поверхню агару з індикатором, при цьому посів проводять шпателем (на одній чашці – одна колонія - можна помістити від 5 до 7 дисків з різними вуглеводами). Інкують за температури  $37\pm 1$  °C 20–24 год.

Позитивна реакція характерна для сальмонел - відсутність кислоти на лактозі, сахарозі, утворення кислоти і газу в глюкозі, маніті та аргініні.

**Постановка реакції Фогес-Проскауера:** в пробірку з  $3,0\text{ см}^3$  VP-середовища або середовища Кларка вносять петлю повну культури. Інкують за температури  $37\pm 1$ °C 24 год. Після чого вносять 2 краплі 0,5 % водного розчину креатину, 3 краплі 6% спиртового розчину 1-нафтолу та 2 краплі 40 % розчину калію гідроксиду. Змішують після внесення кожного реактиву. Реакцію враховують протягом 15 хв. Всі сальмонели дають негативну реакцію Фогес-Проскауер (VP).

**Реакція на утворення індолу:** провести посів у пробірки, що містять  $5\text{ см}^3$  триптон-триптофанового середовища. Інкубувати за температури  $37^\circ\text{C}$  24 год, після чого додати  $1\text{ см}^3$  реактиву Ковача або перед початком інкубації пробірок під кришку поміщають смужки з реактивом Ковача. Сальмонели не утворюють індолу (виняток – *S. lastbourne*).

**Утилізацію цитрату** визначають на цитратному середовищі Сіммонса чи Крістенсена, висівом на скошену поверхню агару. Інкують за температури  $37\pm 1$ °C впродовж 24 год. Позитивна реакція - зміна кольору середовища Сіммонса із зеленого на синє, цитратний Крістенсена - із рожевого на фіолетове забарвлення. Сальмонели утилізують цитрат (крім *S. typhi*).

Сальмонели не продукують оксидазу.

Для біохімічної ідентифікації сальмонел також можна використовувати комерційні тест-системи для біохімічної ідентифікації.

Ферментативні властивості сальмонел різноманітні, при чому не тільки у окремих представників окремих підродів, але можуть змінюватись і в межах

одного і того ж сировару (табл. 2). Вони звичайно утворюють сірководень і не утворюють індол, хоча іноді зустрічаються окремі серовари або їхні різновиди, які утворюють індол і не розкладають сечовину. Сальмонели, як правило, не ферментують лактозу, утилізують цитрат на середовищі Сімонса (*S. typhi* не утилізують).

Таблиця 2

Біохімічні властивості родів родини *Enterobacteriaceae*,  
що зустрічаються найчастіше

Тест або субстрат	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>
Цитрат Сімонса	+, -	-	-	+	+	X
Сечовина	-	-	-	X	(+)	+, -
Малонат натрію	-, +	-	-	-, +	+	-
Рухливість	+, -	-	+, -	+	-	+, -
Індол	-	-, +	+, -	-, +	-, +	+, -
Сірководень	+, -	-	-	+, -	-	+, -
VP	-	-	-	-	-	-, +
MR	+	+	+	+	+	+
Фенілаланін-дезаміназа	-	-	-	-	-	+
Лізиндекарбоксілаза	+, -	-	+, -	-	+	-
Орнітин-декарбоксілаза	+	-, +	X	X	-	-, +

Примітки:

+ позитивна реакція

- негативна реакція

+, - не постійно позитивна реакція -

+ - негативна реакція, але деякими варіантами ферментується

X різні типи реакції.

Для сальмонел характерні також ферменти лізин-, орнітиндекарбоксілаза і аргініндегідролаза, хоча відомі штами *S. typhimurium*, *S. enteritidis* v. *ratin* та деякі інші серовари, які мають знижений вміст ферменту лізиндекарбоксілази

або зовсім його не мають.

Всі сальмонели дають позитивну реакцію з метиловим червоним (MR) і негативну реакцію Фогес-Проскауер (VP), редукують нітрати, ферментують маніт і глюкозу (з утворенням газу), але у таких серологічних типів як *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. thompson*, *S. enteritidis* можуть зустрічатися і безгазові варіанти. Постійно не утворюють газу *S. typhi* і *S. gallinarum*. Не ферментують сахарозу і адоніт, хоча відомі випадки виділення штамів окремих сероварів, що ферментують сахарозу (*S. newport*, *S. meleagridis*, *S. stanleyville* та ін.). Майже всі сальмонели ферментують сорбіт і, як правило, не розріджують желатину.

Відношення сальмонел до арабінози, дульциту, інозиту, ксилози, рамнози, трегалози, гліцерину за Штерном, а також до d- та L-тартрату, цитрату і мукату неоднакове навіть у межах одного серологічного типу, що дозволяє підрозділяти їх на ряд стабільних біохімічних варіантів. Результати біохімічного типування використовуються в епідеміологічних дослідженнях.

Культури, що не ферментують лактозу і не гідролізують сечовину, але ферментують глюкозу (з утворенням чи без утворення газу) та утворюють сірководень, підлягають подальшому вивченню.

Культури, що не ферментують лактозу, ферментують глюкозу без газоутворення, не утворюють сірководень і не гідролізують сечовину, підозрілі на *S. paratyphi* та *Shigella*. Їх випробовують реакцією аглютинації з полівалентними сальмонельозними та шигельозними сироватками, і подальше вивчення роблять в залежності від результату аглютинації.

Культури, що не ферментують лактозу, ферментують глюкозу з утворенням газу, не утворюють сірководню і є позитивними в реакції аглютинації з полівалентними сальмонельозними сироватками, можуть належати до роду *Salmonella*.

### 6.3. Серологічне типування виділених культур сальмонел

Сальмонели мають два основні антигенні комплекси, що представляють різні структурні частини бактеріальної клітини:

- соматичні – О-антигени – термостабільні, зберігаються при кип'ятінні культури протягом 2–5 годин;
- джгутикові – Н-антигени – термолабільні.

О-антигени являють собою складні фосфоліпідно-полісахаридні комплекси, структура яких вивчена досить повно.

Н-антигени мають білкову природу, можуть існувати у двох серологічних фазах: першій і другій (або «специфічній» та «неспецифічній»).

Vi – термолабільний соматичний антиген, є одним із компонентів О-антигену і відноситься до групи К-антигенів. Він властивий трьом серологічним варіантам сальмонел – *S. typhi*, *S. paratyphi C*, *S. dublin*, а також зустрічається у деяких інших представників родини *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Citrobacter*).

Антигенна структура покладена в основу схеми Кауфмана-Уайта для ідентифікації серогруп і сероварів сальмонел, однак основними класифікаційними ознаками сальмонел, як і у всіх ентеробактерій, є біохімічні властивості, а не серологічна структура.

На підставі спільності будови О-антигенів сальмонели об'єднують в серологічні групи, які позначаються буквами латинського алфавіту (А, В, С, D, Е, F, H та ін. до Z) і далі арабськими цифрами (від 51 до 67) і які містять серологічні типи, що відрізняються між собою структурою Н-антигенів.

В даний час схема Кауфмана-Уайта містить у собі 67 О-груп, що відрізняються різними комбінаціями понад 20 комплексів Н-антигенів першої фази і більш 10 різних комплексів Н-антигенів другої фази. Бактерії *Arizonae* включені до роду *Salmonella*, ідентифікація їх сероварів здійснюється за

схемою Кауфмана-Уайта.

Серологічну ідентифікацію сальмонел починають з випробовування їх у реакції аглютинації на склі з О-аглютинуючими полівалентними сальмонельозними сироватками О-АВСДЕ та полівалентними сироватками рідких груп. Визначення серологічного варіанту проводять у реакції з моновалентними сироватками з О- та Н-антигенами (І та ІІ фаз).

На предметне або часове скло наносять піпеткою краплю розчиненої сироватки, поблизу неї – петлю 18–24 годинної культури (з МПА/ТСА) і розтирають її у сироватці. Для визначення О-антигену слід відбирати культуру з верхньої частини агару, а для Н-антигену – з нижньої частини агару. Попередньо культуру контролюють на відсутність спонтанної аглютинації. Для цього її розтирають у краплі 0,85% розчину хлористого натрію. Також перевіряють сироватку на самоаглютинацію, тобто сироватка у фізіологічному розчині. Перевірка на **самоаглютинацію**: розмістити краплю фізіологічного розчину на ретельно очищене предметне скло. Розчинити у цій краплі частину колонії, одержаної на поживному агарі так, щоб утворилась гомогенна суспензія. Повільно струшувати скло коливальними рухами протягом 30–60 с. Спостерігати результат реакції проти темного фону, для зручності використовувати лупу.

Серологічну ідентифікацію сальмонел починають з випробовування їх у реакції аглютинації на склі з полівалентною сироваткою АВСDE, що включає в себе аглютиніни до О-антигенів 2, 4, 61, 62, 7, 8, 9 і 3-10, 12, Vi.

Для цього на предметне скло поміщають краплю ізотонічного розчину хлористого натрію і поряд краплю полівалентної аглютинуючої сальмонельозної сироватки. Потім в кожну з крапель, починаючи з ізотонічного розчину, вносять бактеріологічною петлею культуру, рівномірно розтирають, похитуючи предметним склом протягом 30–60 с.

Скло поміщають на темне поле і розглядають за допомогою лупи. При

позитивній реакції аглютинації через 0,5–2,0 хв. в краплі сироватки утворюються пластівці, рідина просвітлюється. В краплі з ізотонічним розчином залишається рівномірне помутніння.

При відсутності реакції аглютинації з зазначеною сироваткою культуру випробовують з полівалентною до рідких груп сальмонел сироваткою, що включає антитіла до антигенів 11, 13-22, 14-34, 15, 19, 23 тощо.

При одержанні позитивних результатів аглютинації з однією з полівалентних сироваток культуру випробовують з кожною з О-сироваток, що входять до її складу окремо, для визначення належності її до однієї з О-груп.

Після встановлення належності культури до зазначеної О-групи її випробовують з Н-сироватками спочатку першої фази, а потім – другої. Починати слід з Н-сироваток, що відповідають більш розповсюдженим серологічним типам сальмонел даної групи.

Після визначення Н-антигену першої фази визначають Н-антигенні компоненти другої фази і у такий спосіб встановлюють антигенну формулу виділеної культури, тобто її серологічний варіант. При позитивному результаті реакції аглютинації виділеної культури з відповідними сироватками можна видати попередню відповідь про вид сальмонел.

Для аглютинації з О-сироваткою культуру варто брати з верхньої частини росту на скошеному агарі, для аглютинації з Н-сироватками – з найнижчої частини росту культури чи з конденсату, де розташовуються мікроорганізми з найбільш розвинутим Н-антигеном.

Облік результатів реакції аглютинації проводять протягом 2–3 хв, оцінюючи в хрестах:

- .... гомогенна мутна рідина;
- + .... незначна кількість аглютинату на фоні мутної рідини;
- ++.... незначний аглютинат на фоні мутної рідини;
- +++.... чіткий аглютинат на фоні мутної рідини;

++++.... чіткий аглютинат при повному просвітленні рідини.

Позитивна реакція – не менше, ніж в три хрести. Сальмонели дають позитивну РА.

У разі сумніву для підтвердження наявності сальмонел можна проводити інші додаткові тести.

#### **6.4. Додаткові методи ідентифікації збудника**

У разі виділення культур, у яких було зареєстровано відхилення від типових біохімічних властивостей сальмонел, проводять додаткові дослідження. Зареєстровані відхилення можуть бути такі:

—культура дає чітку реакцію аглютинації з О- і Н-аглютинувальними сальмонельозними сироватками, але за ферментативними властивостями дещо відрізняється від сальмонел;

—культура має типові ферментативні властивості, але не аглютинується О- і Н-аглютинувальними сальмонельозними сироватками або дає нечіткі реакції.

У першому випадку необхідно перевірити чистоту культури, направленої на дослідження. Для цього проводять висів культури на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром і одним з диференційних середовищ, після чого забирають (5-6) характерних колоній і досліджують їх біохімічні і антигенні властивості.

У другому випадку перевіряють, чи не відноситься культура до іншого роду представників родини *Enterobacteriaceae*, які характеризуються уповільненою ферментативною активністю. З цією метою проводять висіви культури у середовища Гісса з лактозою і сахарозою та інкубують їх за температури  $37 \pm 0,5$  °С протягом 21 доби з урахуванням результатів подового. Для швидшого виявлення ферментативної активності культур рекомендовано застосовувати середовища Гісса з 4 % утриманням вуглеводів. Необхідно також провести вивчення культури для встановлення спроможності до ферментації саліцину (сальмонели не ферментують саліцин).

Якщо культура має типові ферментативні властивості і не дає чіткої реакції аглютинації із сальмонельозними О-комплексними і О-та Н-монорецепторними сироватками, необхідно провести (4—5) послідовних пасажів культури на м'ясо-пептонному бульйоні, який містить 10 % жовчі великої рогатої худоби, і м'ясо-пептонному агарі. Після цього проводять розсів культури на чашку Петрі з м'ясо-пептонним агаром з подальшим відбиранням характерних колоній.

Якщо і після цього культура не аглютинується О- і Н-сальмонельозними сироватками, можна перевірити її здатність до лізису сальмонельозним О-бактеріофагом. Позитивний результат реакції є додатковою ознакою, що вказує на належність культури до роду *Salmonella*. Після цього культуру необхідно направити у вищу за рангом лабораторію для остаточної ідентифікації.

Під час серологічної ідентифікації сальмонел іноді виникають труднощі щодо визначання джгутикових антигенів чи однієї з їх фаз, що може бути наслідком пригнічення або втрати Н-антигену (втрата рухомості) внаслідок дії хімічних чи фізичних факторів. Необхідно також брати до уваги, що такі серовари сальмонел, як *S. pullorum* і *S. gallinarum*, нерухомі, тобто не мають Н-антигенів, а у *S. choleraesuis* var. *kunzendorf*, *S. typhimurium* var. *binus* відсутні Н-антигени першої фази.

Для виявлення специфічної фази джгутикового антигену використовують феномен «роїння» по Свену-Гарду. Для цього культуру, що її досліджують, засівають у центр чашки Петрі з 0,8-1,0 % живильним агаром у вигляді бляшки. Перед тим, як розлити агар у чашки Петрі, його охолоджують до температури  $50 \pm 0,5$  °С і додають 2–3 краплі аглютинувальної Н-сироватки тієї фази джгутикового антигену, яку попередньо виявили у культури. Після добової інкубації за температури  $37 \pm 0,5$  °С мікробні клітини з фазою Н-антигену, яку визначають, виявляються на периферії макроколонії.

Під час ідентифікації культур, вирішальне значення мають їх біохімічні властивості. Після того, як за біохімічними властивостями культуру віднесено

до роду *Salmonella*, проводять визначання її серовару в РА.

Ідентифікація культур лише за допомогою реакції аглютинації з первинних посівів (без подальшого визначання біохімічних властивостей) не припустима і може призвести до діагностичних помилок, оскільки представники деяких інших родів родини *Enterobacteriaceae* мають спільні з сальмонелами антигени.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. ДСТУ 4769:2007
2. ДСТУ ISO 6222:2002
3. ДСТУ ISO 6887-1:2003
4. ДСТУ ISO 8199:2009
5. Інструкція з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1344-16#Text>
6. Кравцова, О. Л., Чечет, О. М., Гайдей, О. С., Шуляк, С. В., Гереймович, В. Л., Марчук, О. О., ... & Олексієнко, І. С. (2022). Моніторинг якості та безпечності кормів для тварин за мікробіологічними критеріями. *Грааль науки*, (18-19), 143-151.
7. Крюкова, Н. В. (2011). Сальмонельоз птиці (серотип *Salmonella enteritidis*) та засоби його специфічної профілактики. *Ветеринарна медицина*, (95), 249-251.
8. Малий, В. П. (2013). Сальмонельоз: клініка, діагностика, лікування. Харківська медична академія післядипломної освіти. *Огляди та лекції. Інфекційні хвороби*, (2): 103-111.
9. Малиш, Н. Г. (2019). Сальмонельоз в Україні: епідеміологічні аспекти (Doctoral dissertation, ДУ" Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. ЛВ Громашевського").
10. Методичні вказівки 10.2.1-113-2005 Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води. Київ, 2005. МОЗ України, наказ № 60 від 03.02.2005 р.
11. Методичні вказівки щодо санітарно мікробіологічного контролю об'єктів виробництва та реалізації, які підлягають ветеринарному нагляду. Затверджені Державною ветеринарною та фітосанітарною службою України. Протокол №1 від 19 грудня 2013 р.
12. Методичні рекомендації щодо бактеріологічного аналізу кормів для тварин. Київ, ДНДІЛДВСЕ, 2014 р. пр № 1 від 21.12.2012 р.
13. Методичні рекомендації щодо методів детекції бактерій роду *Salmonella*, *Listeria* (*L.monocytogenes*) із харчових продуктів, продовольчої сировини та кормів для тварин з використанням автоматичних аналізаторів VIDAS. Київ ДНДІЛДВСЕ, 2011 р. пр №4 від 21.12.2011 р
14. Про безпечність та гігієну кормів (Закон України) № 2264-VII від 21.12.2017 зі змінами № 1206-IX від 21.03.2021.
15. Про затвердження Порядку відбору зразків та їх перевезення (пересилання) до уповноважених лабораторій для цілей державного контролю та форми акта відбору зразків. (Наказ МАППУ) № 490 11.10.2018.
16. Чемич, О. М., & Мороз, Л. В. (2016). Зміни інтегральних, інтегративних показників ендогенної інтоксикації та імунореактивності під час лікування хворих на сальмонельоз. *J. Clin. Exp. Med. Res.*;4(3):426–441.