

Державна служба України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

03151, м. Київ, вул. Донецька, 30, admin@biocontrol.com.ua

Національна академія аграрних наук України

Інститут ветеринарної медицини

03151, м. Київ, вул. Донецька, 30, ivm_naan@ukr.net

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПРАВИЛ ВІДБОРУ ПРОБ,
ПІДГОТОВКИ ЗРАЗКІВ ҐРУНТУ ТА ОБ'ЄКТІВ НАВКОЛИШНЬОГО
СЕРЕДОВИЩА ДО ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ІНДИКАЦІЇ, ІДЕНТИФІКАЦІЇ
ЗБУДНИКА СИБІРКИ БАКТЕРІОЛОГІЧНИМ
ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ**

УДК 619:616.98:579.852.11:615.371:001.53

Методичні рекомендації розглянуті і схвалені Вченою радою Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (протокол № 3 від 15.08.2025р.) та Вченою радою Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України (протокол № 9 від 11.09.2025 р.)

Розробники: Уховський В.В., Дерев'янку С.В., Болотін В.І., Тарасов О.А., Пінчук Н.Г., Боровков С.Б., Ареф'єв В.Л., Дерябін О.М.

Рецензенти:

Валерій ГОЛОВКО – професор кафедри епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету, доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН

Раїса СЕВЕРИН – завідувачка кафедри епізоотології та мікробіології Державного біотехнологічного університету, кандидат ветеринарних наук, доцент

Олександр ТАШУТА – науковий співробітник відділу бактеріологічних досліджень і контролю якості ВІЗ Державного науково-контрольного інституту біотехнології, кандидат ветеринарних наук.

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПРАВИЛ ВІДБОРУ ПРОБ, ПІДГОТОВКИ ЗРАЗКІВ ҐРУНТУ ТА ОБ'ЄКТІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ДО ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ІНДИКАЦІЇ, ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКА СИБІРКИ БАКТЕРІОЛОГІЧНИМ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ / [Уховський В.В., Дерев'янку С.В., Болотін В.І., Тарасов О.А., Пінчук Н.Г., Боровков С.Б., Ареф'єв В.Л., Дерябін О.М.]. – К., ДНКІБШМ, 2025– 59 с.

Методичні рекомендації розроблені авторським колективом фахівців в рамках виконання проекту за реєстраційним номером 2023.04/0141 «Розробка системи моніторингу, молекулярно-генетичного контролю *Bacillus anthracis* та нових підходів до санації ґрунту й об'єктів навколишнього середовища» за конкурсом «НАУКА ДЛЯ ЗМІЦНЕННЯ ОБОРОНОЗДАТНОСТІ УКРАЇНИ»

Введено в дію вперше. Методичні рекомендації призначені для спеціалістів регіональних, міських, районних та міжрайонних державних лабораторій Держпродспоживслужби, фахівців державної служби у ветеринарній медицині, що здійснюють відбір проб, індикацію та ідентифікацію збудника сибірки бактеріологічним та молекулярно-генетичними методами, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

ЗМІСТ

Умовні позначення	4
Вступ	5
1. Заходи біобезпеки при роботі зі збудником сибірки	8
1.1 Загальні принципи	8
1.2 Засоби індивідуального захисту	10
1.3 Алгоритм дій при аварійних ситуаціях	10
1.4 Правила безпеки при поводженні із зразками	11
1.5. Деконтамінація	17
2. Збір зразків з об'єктів навколишнього середовища	19
2.1 Відбір зразків ґрунту	19
2.2 Виділення спор <i>B. anthracis</i> зі зразків ґрунту	20
2.3 Збір листя з метою ізоляції <i>B. anthracis</i>	23
2.4 Збір личинок комах з метою ізоляції <i>B. anthracis</i>	24
2.5 Збір м'ясних мух з метою ізоляції <i>B. anthracis</i>	25
2.6 Збір назальних зразків з метою ізоляції <i>B. anthracis</i>	25
3. Підготовка середовища для культивування <i>B. anthracis</i>	27
4. Виділення культури від тварин, довкілля та з інфікованих зразків	33
5. Визначення рухливості	40
6. Ідентифікація <i>B. anthracis</i>	44
7. Виділення ДНК з культури <i>B. anthracis</i>	47
8. Молекулярно-генетична ідентифікація збудника сибірки	51
9. Валідація та контроль якості	55
Бібліографія та нормативні посилання	58

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

ВООЗ – всесвітня організація охорони здоров'я;
г – грам;
г/дм³ – грам на дециметр кубічний;
г/см³ – грам на сантиметр кубічний;
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
ЕДТК - етілендіамінтетраоцтова кислота;
ЗІЗ – засоби індивідуального захисту
КА – кров'яний агар;
кг – кілограм;
м – метр;
мкг/см³ – мікрограми на сантиметр кубічний;
мкл – мікролітр;
мкм – мікромметр;
мм – міліметр;
моль/см³ – моль на сантиметр кубічний;
МПА – м'ясопептонний агар;
МПБ – м'ясопептонний бульйон;
НТА-ТТХ – напівтвердий агар з тетрафеніл тетразол хлоридом
об/хв – обертів на хвилину;
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
п.н. – пари нуклеотидів;
см – сантиметр;
см² – сантиметр квадратний;
см³ – сантиметр кубічний;
ФСБ – фосфатний сольовий буфер;
хв. – хвилини;
ШББ – шафа біологічної безпеки;
% – відсотки;
мкм – мікромметр;
A/BSL – рівень біологічної безпеки;
АСТ – аспаратамінотрансфераза;
BSC – збалансована система показників;
BSL-2 – рівень біологічної безпеки 2;
BSL-3 – рівень біологічної безпеки 3;
°C – градуси Цельсія;
IPC – внутрішній позитивний контроль;
pH – водневий показник;
SOP – стандартна операційна процедура;
LAMP – петлеподібна ізотермічна ампліфікація;
qPCR – кількісна полімеразна ланцюгова реакція;
SNP-аналіз – метод генетичного тестування, який виявляє
однонуклеотидні поліморфізми;
VHP – це процес стерилізації, що використовує пароподібний перекис
водню.

ВСТУП

Одне з перших місць серед зоонозних захворювань в історії мікробіології займає сибірка.

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

Світовий досвід останніх років засвідчує, що це захворювання є не лише ветеринарною проблемою, а й медичною, економічною, політичною, військовою, тому що високовірулентні штами збудника сибірки можуть бути використані як біологічна зброя (Завірюха Г. А., 2011; Рубленко І. О., 2012). Ситуація щодо захворювання на сибірку в Україні є досить складною, оскільки пов'язана з наявністю старих неблагополучних захоронень тварин, що створює постійну потенційну загрозу появи хвороби серед тварин і людей (Козловська Г.В., 2006).

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. Висока патогенність збудника сибірки та здатність його спорової форми зберігатися в умовах зовнішнього середовища багато десятиліть, відносить його до особливо небезпечних біологічних агентів (World Health Organization; 2003).

Україна багата на родючі землі, що створює сприятливі умови для збереження спор і вегетативних форм збудника *B. anthracis*. Основним джерелом інфекції є ґрунти, пасовища та ґрунтові води. На території України знаходиться 2833 старих сибіркових поховань, що складають основну загрозу виникнення сибірки. Значна кількість таких поховань з часом зникає з мап районів, робота з перевірки санітарного стану окремих об'єктів контролюється недостатньо, а значить – існує ризики виникнення нових спалахів сибірки. Через війну ворог по всій лінії фронту завдав руйнівні дії щодо упорядкованості осередків поховань тварин, які загинули від небезпечних захворювань, а таких поховань, констатуємо, більш за все на окупованих територіях. У цих регіонах не відбувається щеплення приватного сектору, щоб у майбутньому могло запобігти виникненню сибірки в країні.

На сьогодні маємо тимчасово окупованими території Донецької, Луганської, частково Запорізької, Харківської та Херсонської областей, а також п/о Крим. Зазначені зони не контрольовані щодо забезпечення стабільної епізоотичної ситуації по сибірці. Через те їх можна вважати зонами ризику у виникненні захворювання.

За даними Держпродспоживслужби України (Епізоотична ситуація в світі: інформація Міжнародного епізоотичного бюро. <http://vet.gov.ua/db/meb>, 2022), на території України знаходяться до п'яти тисяч сибіркових захоронень, з них 60 % віднесено до так званих «старих» поховань (до 1954 року включно). Саме вони становлять найбільшу небезпеку, оскільки більшість з них знаходяться на території, де вже немає поселень, або не позначено на мапах, тож про їх

існування нове покоління ветеринарних спеціалістів не знає. Найбільша кількість старих поховань сконцентрована переважно у північних, центральних, південних та частково у західних областях України. Повені, дощі, бомбардування території можуть привести до виходу спорових форм *B. anthracis*. Безпритульна сільськогосподарська худоба, яка не отримає своєчасної вакцинації буде сприяти виникненню нових спалахів сибірки.

Історично сибірка була зареєстрована більш ніж в 200 країнах світу. В даний час сибірка у сільськогосподарських і диких тварин зареєстрована практично на всіх континентах. Спалахи сибірки у диких тварин були зареєстровані в країнах Азії, Північної Америки та Африки (Kamal et al., 2011; Лухнова та ін., 2018; Walsh та ін., 2018; Manish та ін., 2020). В результаті глобального потепління, сибірку стали реєструвати в північних континентах, де раніше вона практично не була широко поширена. З цієї причини це захворювання було визначено як кліматично чутливу інфекцію (Revich et al., 2012; Parkinson та ін., 2014; Walsh та ін., 2018).

Щорічно сибірка реєструється майже в 100 країнах світу у 54 видів тварин. У розвинених країнах спостерігаються спалахи цього захворювання серед людей, які бувають або спорадичними, або відсутніми, але в країнах, що розвиваються (Азія, Південна Америка і Африка) це захворювання зустрічається досить часто. Загалом сибірку часто реєструють у Африці, Азії, на Близькому Сході, у Північній та Південній Америці, Європі та Австралії. Масові спалахи сибірки серед тварин призводять до значної захворюваності серед людей. Фактично щорічна захворюваність на сибірку в світі коливалася в минулому столітті в межах 20 000–100 000 чоловік (Hugh-Jones, 1999; Kamal та ін., 2011; Дога-най і Деміраслан, 2015; Мунуа та ін., 2016). Наразі щороку у світі реєструється приблизно 2 000–20 000 випадків сибірки (Макурімідзе та ін., 2021). За даними Carlson et al. (2019), 1,83 мільярда людей живуть у регіонах із ризиком сибірки.

Більш того, збудник сибірки в даний час визнаний найнебезпечнішим агентом біотероризму (Klietmann & Ruoff, 2001; Webb, 2003).

У підтриманні стаціонарності ґрунтових вогнищ сибірки провідну роль відіграють траводні тварини певних територій, які можуть гарантувати постійне повторне забруднення ґрунтів (Ямтитіна та Макаров, 2018). Підраховано, що 95% випадків сибірки у людей пов'язані зі шкірною формою сибірки, на один випадок шкірної форми сибірки у людини припадає 10 забитих та оброблених туш тварин, інфікованих сибіркою, а приблизно на кожні 150 випадків шкірної форми сибірки припадає один випадок генералізованої сибірки (Makarov & Mahamat, 2019). Китайські дослідники, аналізуючи епідеміологічну ситуацію в Китаї за період 1955–2014 рр., вказали, що більшість (97,7%) зареєстрованих випадків у людей були представлені шкірною формою сибірки (Li et al., 2017; Li та ін., 2020).

Вегетативні форми збудника сибірки (*Bacillus anthracis*) не є резистентними. Вони гинуть в трупі тварини протягом 2-3 діб. Через тиждень труп може звільнитися від збудника сибірки за умови, що він не був розсічений. Спори *B. anthracis*, навпаки, надзвичайно стійкі. Вони можуть виживати протягом багатьох років у воді, трупах і протягом десятиліть у ґрунті (можливість розмноження збудника в ґрунті наразі доведена) (Schmid & Kaufmann, 2002).

Сибірка – інфекційне захворювання, яке належить до сапрозоонозів, коли збудники ведуть переважно вільний спосіб життя, не прив'язаний до хребетних, а резервуари та джерела збудника є факторами абіотичного середовища. Поняття «абіотичне» середовище набагато ширше, адже кожне середовище включає в себе величезну кількість паразитарних та інших симбіотичних систем, які епідеміологи та епізоотологи трактують як різновид «абіотичного» речовини (вода, ґрунт і т.д.). Зовнішнє середовище – це, перш за все, біота, оскільки абіотичних середовищ у природі фактично не існує (Корнієнко та ін., 2009; Белов і Огарков, 2010).

Незважаючи на постійні заходи контролю та профілактики, патоген *B. anthracis* продовжує циркулювати в екосистемах, впливає на чисельність та регулювання популяцій диких тварин і часто викликає спалахи серед людей та тварин. Аналіз та розуміння таких епідеміологічних особливостей може допомогти у прогнозуванні небажаних наслідків та їх запобіганні (Verghnaud, 2020; Timofeev та ін., 2021). *B. anthracis* широко поширена на європейських ґрунтах, вогнища хвороб тварин трапляються особливо часто в Південній та Східній Європі. Спорадичні випадки захворювання у людей трапляються в цих районах, а іноді додаткові випадки виникають після споживання або використання забруднених імпортованих матеріалів або надходять з країн за межами Європи, де сибірка досить поширена (Schmid & Kaufmann, 2002). Дослідники вказують, що виживання та поширення патогену в ґрунтах може залежати від кількості опадів та характеристик ґрунту (лужні ґрунти є кращими для виживання патогена). Дійсно, сприятливими умовами для появи сибірки є волога і тепла зима, яка швидко змінюється сухим літом, а спори збудника з'являються на поверхні ґрунту (Hugh-Jones & Blackburn, 2009; Карлсон та ін., 2019; Pittiglio та ін., 2022). Інші фактори, які сприяють виникненню та поширенню спалахів сибірки, включають високу щільність поголів'я худоби (Chen et al., 2016), а також переміщення та випас худоби, такі як рух популяції та торгівля (Blackburn et al., 2015).

Виходячи з вищевикладеного, актуальною та необхідною вимогою сьогодення є розробка **методичних рекомендацій щодо правил відбору проб, підготовки зразків ґрунту та об'єктів навколишнього середовища до дослідження та індикації, ідентифікації збудника сибірки бактеріологічним та молекулярно-генетичними методами** для спеціалістів регіональних, міських, районних та міжрайонних державних лабораторій Держпродспоживслужби, фахівців державної служби у ветеринарній медицині, що здійснюють відбір проб, індикацію та ідентифікацію збудника сибірки бактеріологічним та молекулярно-генетичними методами, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

1. ЗАХОДИ БІОБЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ ЗІ ЗБУДНИКОМ СИБІРКИ

1.1 ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ

Робота зі зразками навколишнього середовища, підозрілими на наявність *B. anthracis*, здійснюється лише у лабораторіях, атестованих на відповідний рівень біологічної безпеки.

BSL-2 — дозволяється робота з клінічними/екологічними зразками, виділення ДНК та постановка молекулярних методів (ПЛР, qPCR, LAMP).

BSL-3 — обов'язковий рівень для культивування живих ізолятів *B. anthracis*, проведення маніпуляцій з культурами (посіви, зберігання штамів, експериментальні інфекції).

Усі процедури проводяться у шафах біологічної безпеки (ШББ) II класу.

Процедури

Всі технічні процедури необхідно здійснювати у такий спосіб, щоб звести до мінімуму утворення аерозолів і крапель. Вся біологічна робота повинна проводитися в боксі біобезпеки (BSC). У випадку підвищеного ризику утворення аерозолів, роботу потрібно виконувати у боксі або іншому засобі ізоляції.

Обмежити використання гострого інструменту. Користуватися голками з захисним ковпачком і шприцями в разі необхідності за винятком тих випадків, які прописані в плані заходів, спрямованих на недопущення контакту. Увесь гострий інструмент і шприци повинні утилізуватися в контейнерах для гострого інструменту.

Про всі виливи, нещасні випадки, відкритий або потенційний контакт з інфекційним матеріалом доповідати завідувачу лабораторії, відповідальному за техніку безпеки, голові режимної комісії, відповідальному за біобезпеку. Облік таких нещасних випадків та інцидентів ведеться у письмовому форматі.

Очищення виливу здійснюється за прописаними стандартними робочими процедурами.

Робочі зони в лабораторії

Лабораторія повинна утримуватися в акуратному чистому стані, а всі матеріали, не задіяні в роботі, повинні бути прибрані.

Всі інфекційні роботи повинні проводитися в засобах ізоляції: як правило, в боксі BSC. Так само всі хімічні роботи проводяться у витяжних шафах.

Робочі поверхні знезаражуються після кожного виливу потенційно небезпечного матеріалу і в кінці робочого дня.

Всі контаміновані матеріали, проби і культури перед утилізацією або очищенням для повторного використання знезаражуються.

Упаковка і транспортування повинні відповідати чинним національним та (або) міжнародним нормативним вимогам.

В лабораторіях рівня BSL-2 або BSL-3 вікна відчиняти не дозволяється.

Управління біобезпекою

Завідувач лабораторії (особа, яка безпосередньо очолює лабораторію) забезпечує проходження всіма працівниками лабораторії навчання, що фіксується документально, наявність у них відповідної кваліфікації для роботи з визначеними збудниками, дотримання всіх вимог техніки безпеки і стандартних робочих процедур.

Працівникам повідомляється про особливі небезпеки, від них вимагається ознайомлення з вимогами техніки безпеки та робочими інструкціями, дотримання стандартної практики та процедур. Завідувач лабораторії повинен проконтролювати розуміння особовим складом усіх вимог. Примірник цього посібника, порядку роботи на кожній ділянці і стандартних робочих процедур у лабораторії або відповідному кабінеті.

План і технічна база лабораторії

При визначенні тих робіт, які будуть виконуватися в лабораторії, слід продумувати її планування. Окрему увагу слід приділяти тим умовам, що зазвичай викликають проблемні питання в частині безпеки. До них належать наступні:

- Відсутність витяжної вентиляції
- Потрапляння повітря з інфікованої ділянки в інші зони
- Доступ до боксу біобезпеки
- Доступ до витяжної шафи
- Утворення аерозолю
- Робота з великими обсягами та (або) високими концентраціями мікроорганізмів
- Скупчення персоналу і обладнання
- Прохід сторонніх осіб
- Робочий процес
- Специфіка зразків і реактивів.

Основне оснащення з біобезпеки

Бокси біобезпеки повинні використовуватися в наступних випадках:

- При роботі з інфекційним матеріалом;
- В роботах, при яких існує вірогідність утворення аерозолю біологічного характеру; окрім інших, до них можуть належати центрифугування – інфекційні матеріали дозволяється центрифугувати за умови знаходження збудника в герметизованій центрифугі. Якщо використовуються пробірки з ковпачками, вони наповнюються і їхній вміст видаляється в боксах біобезпеки, які сертифікуються раз на рік.

Додаткові процеси можуть передбачати: подрібнення, приготування суміші, інтенсивне струшування або змішування, застосування дії звукового сигналу для розриву, відкривання контейнерів з інфікованим матеріалом, внутрішній тиск у яких може відрізнятись від тиску в зовнішньому середовищі, внутрішнє щеплення тварин, відбір інфікованих тканин у тварин і яєць.

Пластикові одноразові мікробіологічні петлі. Як варіант, для меншого утворення аерозолю в боксі біобезпеки використовується електричний пальник для бактеріологічної петлі.

Пробірки і колби з кришечками, що закручуються.

Автоклави для знезараження інфекційних матеріалів.

В усіх можливих випадках користуватися не скляними, а пластиковими одноразовими піпетками Пастера.

Перед використанням обладнання (наприклад, автоклави, бокси біобезпеки) валідується відповідними методами (відповідним спеціалістом). Сертифікація повинна проводитися періодично (як правило, раз на рік або при кожному переміщенні боксу біобезпеки на нове місце або до іншого приміщення).

Ефективна програма безпеки розпочинається з керівника лабораторії, який відповідає за внесення положень і процедур з техніки безпеки в лабораторії до програми базової підготовки кожного працівника. Керівник або уповноважена ним особа відповідає за документальне засвідчення володіння кожним працівником знаннями, кваліфікацією і компетентністю відповідного рівня, необхідного для виконання покладених на нього службових обов'язків з дотриманням вимог безпеки. Це забезпечується планом стажування, який складається для кожного працівника. Такий план складається очільником лабораторією за участі відповідального за біобезпеку.

1.2 ЗАСОБИ ІНДИВІДУАЛЬНОГО ЗАХИСТУ (ЗІЗ)

Комбінезон (типу Tyvek) або лабораторний халат з довгими рукавами.

Подвійні рукавички (латексні або нітрилові).

Респіратор класу N95 або вище (при роботі з аерозоленебезпечними процедурами — респіратор PAPR).

Захисні окуляри або лицьовий щиток.

ЗІЗ знімаються у спеціально відведеній зоні з дотриманням правил «чистої» та «брудної» зони.

1.3 АЛГОРИТМ ДІЙ ПРИ АВАРІЙНИХ СИТУАЦІЯХ

Розлив інфікованого матеріалу

Негайно зупинити роботу, обмежити зону розливу.

Засипати серветками, змоченими 10 % розчином гіпохлориту натрію, залишити на 30 хв.

Утилізувати використані матеріали як біологічні відходи.

Прокол шкіри/поріз інструментом

Зняти рукавички, промити рану великою кількістю води з милом.

Обробити 70 % етанолом або іншим антисептиком.

Негайно повідомити керівника лабораторії та звернутися до медичного персоналу.

Аварійне утворення аерозолю

Негайно припинити роботу.

Залишити приміщення на 30 хв для осідання аерозолів.

Після цього провести дезінфекцію приміщення (аерозольним чи паровим методом, згідно з SOP).

Схема поводження з відходами

Тверді відходи (рукавички, серветки, пластиковий посуд):

Збираються у подвійні пакети для біологічних відходів.

Попередньо автоклавуються при 121 °С, 30 хв.

Після цього передаються на спалювання або утилізацію як небезпечні відходи.

Рідкі відходи (культури, буфери, середовища):

Обробляються 10 % розчином гіпохлориту натрію (експозиція не менше 30 хв).

Зливаються у спеціальні контейнери для знезаражених рідких відходів.

Гострі предмети (скальпелі, голки, піпетки):

Збираються у жорсткі контейнери з маркуванням «sharps».

Після наповнення контейнери автоклавуються і передаються на утилізацію.

Залишки культур/штамів:

Повністю знезаражуються (автоклавування, хімічна інактивація).

Документування

Усі аварії, випадки контакту з матеріалом або пошкодження ЗІЗ реєструються у журналі біобезпеки.

Щомісяця проводиться контрольна перевірка інвентаризації штамів і відходів.

1.4 ПРАВИЛА БЕЗПЕКИ ПРИ ПОВОДЖЕННІ ІЗ ЗРАЗКАМИ

Порушення правил збору, транспортування і роботи зі зразками в лабораторії несуть у собі ризик інфікування персоналу.

Контейнери для матеріалів

Контейнери для матеріалів можуть бути виготовлені зі скла, але краще користуватися пластиковими контейнерами. Вони повинні бути міцними і не протікати за умови правильного закриття кришкою або корком. Забороняється залишати матеріал поза контейнером. Контейнери повинні маркуватися відповідним чином у цілях ідентифікації. Заявка на лабораторію щодо матеріалу або технічні форми не обгортаються навколо контейнера, а утримуються в окремому (бажано водонепроникному) конверті.

Перенесення матеріалів на території закладу

У цілях недопущення випадкового протікання або розбрикування матеріали слід переносити у вторинному герметично закупореному контейнері або холодильнику з кришкою. На ньому повинен бути прикріплений знак біобезпеки, а контейнери з матеріалами встановлені на підставку у вертикальному положенні. Другорядний контейнер повинен бути виготовлений з металу або пластику, придатний для автоклавування або для обробки хімічними дезінфекційними засобами, мати герметизаційну прокладку.

Контейнери повинні періодично знезаражуватися (особливо після використання).

Отримання матеріалів

Лабораторії, які отримують матеріали у великій кількості, повинні мати окремо виділене приміщення або зону для цих цілей.

Відкривання пакету

Персонал, який отримує і відкриває пакет з матеріалом, повинен знати про можливу небезпеку для здоров'я і пройти інструктаж із питань нормативних запобіжних заходів, особливо у разі розбитого або протікаючого контейнера. Первинний контейнер зі зразком відкривається у шафі біологічної безпеки. Дезінфекційні засоби повинні знаходитися під рукою і застосовуватися в разі необхідності.

Застосування піпеток і дозаторів

- Слід завжди користуватися дозаторами. Піпетування ротом категорично забороняється.

- Всі серологічні піпетки повинні мати ватний тампон, який зменшує контамінацію дозатора.

- Рідину, яка містить інфекційний матеріал, забороняється продувати повітрям.

- Інфекційні матеріали не повинні змішуватися у процесі наступного всмоктування і витіснення з піпетки.

- Рідину не слід силою виштовхувати з піпетки.

- Краще користуватися промаркованими піпетками, оскільки вони не вимагають виштовхування до останньої краплі.

- Контаміновані піпетки цілковито занурюються у відповідний дезінфекційний розчин, налитий у контейнер, що не б'ється. До утилізації їх слід залишити в дезінфекційному розчині протягом відповідного часу.

- Контейнер для використаних піпеток повинен знаходитися всередині шафи біологічної безпеки, а не біля неї.

- Забороняється користуватися шприцами з гіпотермічними голками в цілях піпетування.

- Слід користуватися засобами для відкривання кришок із гумовою діафрагмою, які дозволяють користуватися піпетками і не вдаватися до використання гіподермічних голок і шприців.

- В цілях недопущення дисперсії інфекційного матеріалу, який може капнути з піпетки, на робочу поверхню слід покласти поглинаючу серветку; такі серветки після використання повинні утилізуватися в порядку утилізації інфекційних відходів (в установлений період).

Недопущення дисперсії інфекційного матеріалу

- В цілях недопущення передчасного скидання матеріалу при переносі мікробіологічні петлі повинні мати в діаметрі 2–3 мм і бути цілковито закритими. Для мінімальної вібрації рукоятка повинна не перевищувати в довжині 6 см.

- Відкрите полум'я забороняється; замість нього для стерилізації петель можна користуватися закритими електричними мікропечами. Краще користуватися одноразовими стерильними петлями, які не вимагають повторної стерилізації.

- Зразки мокроти слід висушувати обережно в цілях недопущення утворення аерозолі.

- Відпрацьовані зразки і культури, призначені для автоклавування та (або) утилізації, повинні поміщатися у багаторазові герметичні контейнери (наприклад, лабораторні пакети для сміття) і готуватися відповідним чином до транспортування. Верх потрібно зав'язати (наприклад, стрічкою для автоклаву), після чого пакет можна покласти в контейнер для відходів.

- Деконтамінацію робочих зон необхідно проводити відповідним дезінфекційним засобом наприкінці кожного робочого періоду.

Робота в шафах біологічної безпеки

- Порядок використання і обмеження в застосуванні шаф біологічної безпеки повинні доводитися до відома всіх потенційних користувачів з урахуванням загальнодержавних стандартів і з посиланням на відповідну літературу. Працівникам потрібно видати письмові протоколи, інструкції з техніки безпеки та експлуатації. Зокрема, слід чітко попередити, що шафа біологічної безпеки не захищає оператора у випадку виливу, розбиття або неправильного методу роботи.

- Шафу дозволяється використовувати лише за умови її справного робочого стану і сертифікації протягом останнього року.

- Скляний екран/заслінку забороняється відчиняти в ході користування шафою.

- У шафі слід тримати мінімум предметів і матеріалів. Циркуляцію повітря забороняється блокувати.

- Пальники Бунсена забороняється використовувати всередині шафи. Генероване тепло викривлює повітряний потік і може пошкодити фільтри. Дозволяється користуватися електричною мікропічкою, але краще користуватися одноразовими біологічними петлями.

- Всі роботи повинні виконуватися в середній або задній частині робочої поверхні, яку має бути видно через екран.

- Рух позаду оператора слід звести до мінімуму.

- Оператор не повинен змінювати повітряний потік своїми руками, виймаючи їх із шафи і знову заводячи їх всередину.

- Вентиляційні решітки забороняється блокувати записами, піпетками, іншими матеріалами, оскільки вони змінюють повітряний потік, що може призвести до контамінації матеріалу та ураження оператора.

- Після завершення роботи і наприкінці дня поверхню шафи біологічної безпеки слід обробляти відповідним дезінфекційним засобом.

- Вентилятор шафи повинен вмикатися як мінімум за 5 хвилин до початку роботи і працювати як мінімум 5 хв. після завершення роботи.

- Папір забороняється класти всередину шафи біологічної безпеки.

Недопущення аліментарного зараження, а також контакту зі шкірою та органами зору

- Великі частки і краплі (> 5 мікронів у діаметрі), які вивільнюються в ході роботи в мікробіології, швидко опускаються на робочу поверхню і руки оператора. Працювати слід в одноразових рукавицях. Працівникам лабораторії слід утримуватися від торкання до рота, очей, обличчя.

- В лабораторії забороняється вживати чи зберігати їжу і напої.

- Не тримати під час роботи в лабораторії в роті предмети: ручки, олівці, жувальну гумку.

- Косметику в лабораторії не наносити.

- Обличчя, очі, рот повинні бути захищені щитком або іншим засобом під час будь-якої роботи, в результаті якої можуть виникати бризки інфекційних матеріалів.

Недопущення ін'єкційного ураження інфекційним матеріалом

- Випадкового ураження через ранку від розбитого або сколотого скляного посуду можна не допустити, якщо уважно виконувати всі вимоги і процедури. В усіх можливих випадках скляний посуд слід замінити на пластиковий.

- Випадкове ураження можливе при уколів гострим інструментом (наприклад, гіпотермічною голкою), скляними піпетками Пастера, битим склом.

- Уколів голкою можна не допустити шляхом: (а) зведення до мінімуму користування шприцами та голками (напр., існують прості засоби для відкривання колб, закритих кришкою з гумовою діафрагмою, які дозволяють замість шприців і голок користуватися піпетками); або (б) у разі необхідності користуватися шприцами і голками слід застосовувати гострий інструмент з захисними ковпачками.

- Голки забороняється вставляти повторно в ковпачок. Одноразовий гострий інструмент викидається у спеціальні жорсткі контейнери з герметичними кришками.

- Скляні піпетки слід замінити на пластикові піпетки Пастера.

Сепарація сироватки

- Цю роботу дозволяється виконувати лише відповідно навченому персоналу.

- Робота виконується в рукавицях, засобах захисту органів зору та слизової оболонки.

- Лише відповідна для даної лабораторії методика унеможливить розбризування та утворення аерозолі. Кров і сироватку слід забирати в піпетку обережно і не пролити. Піпетування ротом забороняється.

- Після використання піпетки повністю занурюються у відповідний дезінфекційний розчин. Вони повинні пробути в розчині відповідний час (30-

60 хв.), після чого їх дозволяється утилізувати, мити і стерилізувати для повторного використання.

- Відпрацьовані пробірки від зразків, в яких містяться згустки крові тощо (з кришечками) поміщуються у відповідні герметично закриті контейнери для автоклавування та (або) спалювання.

- Для усунення наслідків розплескування і виливів під рукою потрібно мати відповідний дезінфекційний засіб.

Використання центрифуги

- Задовільний робочий стан є передумовою мікробіологічного захисту при використанні центрифуги в лабораторії.

- Центрифуги слід експлуатувати відповідно до інструкцій виробника.

- Центрифуги повинні встановлюватися на такому рівні, щоб працівники бачили камеру для правильного розміщення гільз і стаканів.

- Пробірки для центрифуги і контейнери для зразків повинні бути виготовлені із товстостінного скла або краще з пластику і перевірятися на предмет наявності дефектів перед використанням.

- Пробірки для центрифуги і контейнери для зразків повинні бути наглухо закриті кришечкою (закручуватися в усіх можливих випадках) для поміщення в центрифугу.

- Стакани завантажуються, врівноважуються, герметизуються і відкриваються лише всередині шафи біологічної безпеки, яка сертифікується раз на рік.

- Стакани та гільзи розміщуються і врівноважуються після встановлення.

- Інформація про те, скільки залишити вільного місця між рівнем рідини і краєм пробірки, надається в інструкціях виробника.

- Для врівноваження порожніх стаканів використовується дистильована вода або спирт (70 %). Не застосовувати фізрозчин або гіпохлорити, оскільки вони призводять до корозії металу.

- Для мікроорганізмів третьої і четвертої групи ризику застосовуються герметичні стакани для центрифуги (запобіжні ковпачки).

- При використанні кутових роторів пробірка не повинна бути переповнена, щоб не допустити витікання.

- Внутрішню частину ротора центрифуги слід перевіряти щодня на предмет наявності плям або забруднень на рівні ротора. При наявності плям або забруднень слід провести повторну оцінку протоколів центрифугування.

- Ротори і стакани в центрифугах перевіряються щодня на предмет ознак корозії і мікротріщин.

- Стакани, ротори і барабани центрифуг повинні деконтамінуватися після кожного використання.

- Після використання стакани зберігаються догори дном для витікання залишків рідини.

- Під час роботи центрифуги можуть виділятися частинки аерозолі. Ці частинки мають високу швидкість, щоб утримуватися повітряним потоком всередині шафи, якщо центрифуга знаходиться в традиційній шафі біологічної безпеки першого або другого класу з відкритою фронтальною частиною. Якщо

центрифугу помістити в шафу третього класу, це убезпечить від розсіювання аерозолу, що виділяється. Водночас, належна техніка роботи з центрифугою і надійно закриті кришечкою пробірки забезпечать надійний захист від інфекційних аерозолів і дисперсних часток.

Правила безпеки і використання холодильників і морозильних камер

- Холодильники, рефрижератори глибокого заморожування, морозильні камери на сухому льоді (двоокис вуглецю) повинні періодично разморозуватися і митися, а всі биті у ході зберігання ампули, пробірки тощо видаляються. Мити це обладнання потрібно з засобами для захисту обличчя в надміцних товстих гумових рукавицях. Після миття дезінфікуються внутрішні поверхні шафи.

- Всі контейнери, що зберігаються в холодильнику, повинні мати ярлик із розбірливо написаною назвою вмісту, датою покладення на зберігання та прізвищем працівника, який поставив на зберігання. Матеріали без ярлика і прострочені матеріали автоклавуються та утилізуються.

- Повинен вестися журнал того, що зберігається в морозильнику.

- Займисті розчини дозволяється зберігати в холодильнику лише в тому випадку, якщо вони не належать до вибухонебезпечних. На дверях холодильника повинна знаходитися відповідна табличка з інструкцією.

1.5. ДЕКОНТАМІНАЦІЯ

Деконтамінацію рекомендується проводити з використанням гіпохлоритів і дезінфекційних засобів високого рівня. Свіжоприготовлені розчини гіпохлориту повинні містити 1 г/дм³ хлору для загального користування і 5 г/дм³ для виливів крові. Поверхні можна знезаражувати глютаральдегідом.

Порядок дій у екстрених ситуаціях

Для екстрених ситуацій в загальній лабораторії і лабораторії, де працюють з тваринами, повинен існувати план дій у екстрених ситуаціях. Працівники лабораторій повинні ознайомитися з планом дій у екстрених ситуаціях і пройти відповідну підготовку.

Локальна деконтамінація

Деконтамінація лабораторії, меблів, техніки вимагає застосування рідких і газоподібних дезінфекційних засобів разом. Поверхні можна деконтамінувати розчином гіпохлориду натрію (NaOCl); загальну санацію приміщення можна провести розчином 1 г/дм³ активного хлору, але в ситуаціях з високим рівнем ризику рекомендується розчин (5 г/дм³). Для загальної деконтамінації приміщення замість розчину білизни можна застосувати 3%-ий розчин перекису водню (H₂O₂).

Приміщення і обладнання можна деконтамінувати методом фумігації газоподібним формальдегідом, який утворюється при нагріванні параформальдегіду (або кип'ятінні формаліну), або парами перекису водню. Цей процес є дуже небезпечним і вимагає спеціально навченого персоналу. Всі

отвори в кімнаті (вікна, двері тощо) заклеюються скотчем або аналогічним матеріалом перед нагнітанням газу. Фумігація проводиться при температурі зовнішнього середовища від 21 °С та відносній вологості 70 %.

Після фумігації приміщення потрібно провітрити, і лише після цього працівникам дозволяється заходити. Всі, хто заходить до приміщення до вентиляції, повинні мати на собі респіратори. Для нейтралізації формальдегіду можна застосувати газоподібний бікарбонат амонію. Фумігація менших за площею зон парами перекису водню є також ефективною, але вимагає спеціального обладнання для утворення пару.

Деконтамінація шаф біологічної безпеки

Для деконтамінації шаф першого і другого класу існує обладнання, яке самостійно забезпечує утворення, циркуляцію і нейтралізацію газоподібного формальдегіду. В іншому варіанті відповідна кількість параформальдегіду (щоб отримати концентрацію 0,8 % параформальдегіду у повітрі) на сковороді ставиться на електроплиту. Ще одна сковорода з бікарбонатом амонію (в кількості на 10 % більшій ніж параформальдегіду) ставиться на іншу електроплитку всередині шафи. До електромережі плити підключаються назвні шафи, щоб штепсельну вилку можна було вставляти і виймати з розетки, тримаючи під контролем роботу плитки. Якщо рівень відносної вологості становить менше 70 %, всередині шафи до герметизації фронтального екрану шафи міцним скотчем (наприклад, скотчем для герметизації повітроводів) ставиться контейнер з гарячою водою. Фронтальний екран і вихідний вентиляційний отвір затягуються полімерною плівкою великих розмірів так, щоб газ не виходив до приміщення. Скотчем також потрібно загерметизувати те місце, де з шафи виходить електричний кабель від плитки.

Увімкнути плитку, на якій знаходиться сковорода з параформальдегідом. Після випаровування всього параформальдегіду цю плитку вимикають з розетки. Шафу слід залишити мінімум на шість годин, після чого потрібно увімкнути в розетку другу плитку для випаровування бікарбонату амонію. Після цього плитку вимикають і вмикають вентилятор всередині шафи двічі по 2 секунди для циркуляції газу бікарбонату амонію. До відкриття фронтального екрану (або зняття полімерної плівки) і вентиляційного отвору шафа повинна відстоятися протягом півгодини. Поверхні шафи перед застосуванням протерти з метою видалення осадів на них. Після всіх випадків деконтамінації газом результат перевіряється смужками для контролю ефективності стерилізації.

Для деконтамінації шаф біологічної безпеки також існує обладнання для перетворення пероксиду водню у пари.

Миття/знезараження рук

З біонебезпечними матеріалами вимагається працювати в рукавицях, але це не означає, що працівники лабораторії не повинні регулярно і ретельно мити руки. Руки потрібно обов'язково мити після роботи з біонебезпечними матеріалами, тваринами і перед виходом з лабораторії.

У більшості випадків для знезараження достатньо ретельно вимити руки просто милом і водою, але в ситуаціях високого рівня ризику рекомендується користуватися антибактеріальним милом. Руки потрібно добре намилювати,

втираючи мило, протягом мінімум 10 секунд, змити чистою водою і витерти паперовим або тканинним рушником (або можна скористатися сушкою для рук).

Рекомендується встановлювати кран, який можна закрити ногою або ліктем, або кран з електронним датчиком. Якщо такого немає, закручувати кран слід з паперовим або тканинним рушником, щоб на вимиті руки знову не потрапили бактерії. Як уже зазначалося вище, за відсутності умов для належного миття рук можна скористатися засобом для обробки рук на спиртовій основі.

Дезінфекція і стерилізація жаром

Серед фізичних засобів для знищення патогенних організмів найбільш поширеним є жар. Сухий жар (зовсім не спричиняє корозії) використовується для обробки багатьох пунктів лабораторного посуду, який може витримувати температуру від 160 °C протягом 2–4 годин. Горіння або прожарювання також належать до форм сухого жару. «Вологий» жар найбільш ефективно застосовується у формі автоклавовання.

Кип'ятіння не обов'язково знищує всі мікроорганізми та (або) патогени, але його можна застосовувати для мінімальної дезінфекції за відсутності можливості для застосування інших методів (хімічної дезінфекції або деконтамінації, автоклавовання).

Стерилізовані предмети потрібно переносити і зберігати таким чином, щоб не допустити їхньої контамінації до наступного застосування.

Утилізація

Порядок утилізації лабораторних і медичних відходів повинен відповідати регіональним, національним, міжнародним нормам, а програми поводження, транспортування та утилізації біонебезпечних відходів повинні формуватися і втілюватися з урахуванням вимог усіх відповідних документів таких рівнів. Як правило, попіл з крематоріїв можна утилізувати в такому порядку, як утилізуються звичайні побутові відходи і який визначається місцевими органами влади. Автоклавовані немедичні відходи можуть утилізуватися на офіційних сміттєзвалищах.

2. ВІДБІР ЗРАЗКІВ З ОБ'ЄКТІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА З МЕТОЮ ІЗОЛЯЦІЇ АБО ДЕТЕКЦІЇ *BACILLUS ANTHRACIS*

2.1 ВІДБІР ЗРАЗКІВ ҐРУНТУ

Засоби індивідуального захисту

- Костюм з матеріалу типу Tyvek або зовнішній лабораторний халат;
- Респіратор N-95;
- Захисні окуляри;
- Рукавички з латексу.

Обладнання для взяття зразків

- Невелика лопатка або совок (не можна використовувати обладнання з дерев'яною ручкою). В окремих випадках можна застосовувати бур, здатний занурюватися на глибину до двох метрів.
- Герметичні мішки для автоклавування.

Процедура взяття зразків

- 1) Руками у чистих рукавичках за допомогою лопатки або совка видаліть перший сантиметр ґрунту. Викопайте невелику ямку, приблизно, на глибину совка, і висипте її вміст у мішок для зразків.
- 2) Не заповнюйте мішок до верху, уникайте збору великого каміння, виберіть та викиньте його з совка, перед тим, як висипати у мішок.
- 3) Промаркуйте мішок та помістіть його у вторинний мішок із застібкою, промаркуйте вторинний мішок так само, як і перший.
- 4) Помістіть зразок у прохолодне, сухе місце, доки ви знаходитесь у польових умовах (для цього не потрібен холодильник, але зразки повинні бути охолодженими або замороженими).
- 5) Передайте матеріал персоналу лабораторії.
- 6) Помістіть зразки у холодильник або морозилку після прибуття до лабораторії, щоб не допустити росту грибку.
- 7) Зареєструйте зразки у каталозі діагностичних зразків та проведіть лабораторну діагностику культури або ПЛР для зразків з довкілля.

Процедура знезараження польового обладнання

- 1) Інструменти для копання потрібно знезаражувати після роботи у кожному окремому місці знаходження трупу, з якого бралися зразки ґрунту.
- 2) Інструменти необхідно покласти у 10 % розчин відбілювача і залишити на 30 хвилин (ПРИМІТКА – якщо совок брудний, можна використати спочатку воду для його промивання, уникайте розбризкування води).
- 3) Після цього пінцет та ріжучі інструменти можна промити водою і витерти рушником, або висушити на сонці.
- 4) Рукавички необхідно утилізувати як біологічні відходи.
- 5) Рукавички необхідно перевдягати після кожного випадку збору зразків.

2.2 ВИДІЛЕННЯ СПОР *BACILLUS ANTHRACIS* ЗІ ЗРАЗКІВ ҐРУНТУ

Обладнання

- Пристрій для піпетування Р-1000.
- Пристрій для піпетування Р-200.
- Вортекс з різними швидкостями.
- Центрифуга.
- Ротатор.
- Холодильник (4-10 °С) для зберігання розчинів на середовищ.
- Інкубатор.

Матеріали

- Сахароза (1,22 г/см³)/розчин Triton X-100 (0,5 %).
- Стерильні 10 мл піпетки.
- Свіжий 10 % розчин відбілювача для протирання зовнішньої поверхні контейнерів зі зразками перед тим, як зразки виносяться з лабораторії.
- Спиртові та жиростійкі маркери.
- Підставки для пробірок.
- Свіжий 10 % розчин відбілювача.
- 70% ізопропанол для знезараження.
- Рукавички
- Стійкі до аерозолів наконечники піпеток.
- Наконечники з фільтром для дозаторів.
- Агарові планшети з PLET.
- Серветки.
- Гігроскопічні прокладки.
- Фосфатно-сольовий буферний розчин + 0,05 % Tween 20.
- 50 см³ стерильні конічні пробірки.
- Етанол.

Процедура

- 1) Вистеліть робочу поверхню ШББ гігроскопічними прокладками.
- 2) Візьміть пакети, що містять зразки ґрунту з довкілля з контейнерів, і покладіть їх у ШББ.
- 3) За допомогою свіжого 10 % розчину підбілювача та серветок протріть зовнішню поверхню пакетів, які містять зразки ґрунту з довкілля.
- 4) Помістіть ~10 з кожного зразку ґрунту у 50 см³ пробірки.
- 5) За допомогою стерильної 10 см³ піпетки додайте 30 см³ сахарози/розчину Triton до 10 г зразку ґрунту.
- 6) Змішайте у міксері на максимальній швидкості протягом 15 хвилин.
- 7) Центрифугуйте при 1000 об/хв. протягом 1 хвилини.
- 8) Внесіть надосадову рідину у чисту 50 см³ конічну пробірку.
- 9) Внесіть надосадову рідину у чисту 50 см³ конічну пробірку і перенесіть половину до іншої 50 см³ конічної пробірки.
- 10) Доведіть об'єм у кожній пробірці до 50 см³ за допомогою буферного розчину + 0,05 % Tween 20 і ретельно змішайте у вортексі.

- 11) Центрифугуйте при 5000 об/хв. протягом 10 хвилин при 4 °С.
- 12) Вилийте надосадову рідину та утилізуйте у контейнер для відходів, що знаходиться у ШББ.
- 13) Повторно розчиніть один з двох осадів у 5 см³ 100 % етанолу і помістіть у вортекс. Перенесіть до другого осаду.
- 14) Додайте ще 5 см³ 95 % етанолу до першого осаду і помістіть у вортекс. Перемістіть змив до другого осаду.
- 15) Повторно розчиніть другий осад у вортексі/шляхом піпетування.
- 16) Помістіть на ротор та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 1 години.
- 17) Висійте на планшети з АСТ-SB. Якщо необхідно здійснити розведення, використайте буферний розчин + 0,05 % Tween 20 у якості розчинника. Помістіть планшети у вторинний захист та інкубуйте у інкубаторі з подвійним замком
- 18) Помістіть планшети з АСТ-SB при ~28 °С на 15-16 годин.
- 19) Після інкубації перевірте планшети щодо наявності підозрюваних колоній.
- 20) Заберіть будь-які підозрілі колонії та висійте штрихом на планшеті з решітками.
- 21) Інкубуйте планшети з решітками при ~30°C протягом 18-24 годин.
- 22) Перевірте планшети та запишіть результати.
- 23) Перенесіть 25 мкл суспензії до планшети або чашки з кров'яним агаром.
- 24) Помістіть планшети у вторинний захист та інкубуйте при 30 °С протягом 18-24 годин в інкубаторі з подвійним замком.
- 25) Огляньте планшети на присутність колоній, що виглядають як матове скло, не проявляють гемолізу та, можливо, мають проекції по краям колонії. Такі колонії відповідають морфологічним характеристикам *B. anthracis*.
- 26) Висійте характерні колонії штрихуванням на свіжому агарі з крові вівці для ізоляції. З колонії, яка використовувалася для посіву, приготуйте фарбування за Грамом. У квадрат 1 ізолюваної планшети нанесіть 10 мкл суспензії гамма-фагу.
- 27) Помістіть планшети у вторинний захист та інкубуйте при 30 °С протягом 18-24 годин в інкубаторі з подвійним замком. Примітка: планшети можна перевірити через 6-8 годин на присутність росту і лізису фагу. Якщо ріст не спостерігається, продовжуйте інкубацію.
- 28) Перевірте планшети щодо чистоти та лізису фагу. Запишіть результати.
- 29) З зони чистої культури візьміть одну або декілька колоній та зробіть суспензію з клітин.
- 30) Обробіть клітини і видаліть ДНК.
- 31) Якщо необхідно провести молекулярний аналіз ДНК в іншому місці, проведіть тест на стерильність перед винесенням ДНК з лабораторії. 10 % нерозведених препаратів (наприклад, 10 μл препаратів з об'ємами, приблизно, 100 μл) необхідно розподілити по планшетах з соєвим агаром з 5 % агару з крові вівці (SBA) або іншим збагаченим твердим середовищем, яке підтримує

ріст *B. anthracis* (наприклад, агар з серцево-м'язової витяжки), планшети інкубуються за температури 28 °С, 24-48 год. та перевіряються на присутність бактеріального росту. Зразки ДНК, що містять будь-які життєздатні бактерії, фільтруються (фільтри з розмірами пор 0,22 мкм) та знов перевіряються на бактеріальну стерильність. Усі зразки ДНК перевіряються на відсутність бактеріального забруднення, згідно з вищезазначеною процедурою, перед тим, як їх виносять з закладу 2-го рівня біологічної безпеки.

32) У лабораторії 2-го рівня біологічної безпеки проводиться ПЛР на наявність хромосомного маркеру, маркеру рХ01 (летальний фактор, захисний антиген або фактор набряку) та рХ02 (маркер капсули).

Інтерпретація даних

1) При дослідженні планшетів часто виявляється суміш видів *Bacillus*. *B. anthracis* має шорсткий вигляд, білого, жовто-коричневого або сірого кольору. Колонії не повинні бути гемолітичними. Оберіть колонії з подібним виглядом для додаткового вивчення.

2) Після фарбування за Грамом з'являться великі Грам-позитивні палички, зібрані у довгі ланцюги. Інші бактерії також можуть мати схожу морфологію, але це дуже характерне саме для *B. anthracis*.

3) Лізис фагу виглядає як чиста або частково чиста пляма у першому квадраті висіву. Якщо культури змішані, повторіть лізис фагу з чистою культурою. Використайте відомі *B. anthracis* та *B. thuringiensis* у якості контролів при проведенні повторного аналізу.

4) За допомогою розчину ДНК, доведеного до 1 нг ДНК/мкл, ПЛР у реальному часі буде позитивною для хромосомного маркеру та усіх маркерів рХ01, та може бути або не бути позитивною для рХ02. Вірулентні штами міститимуть обидві плазмідні, та обидва будуть позитивними. Плазмідні можуть загубитися, зазвичай губиться саме рХ02; рХ01 може бути відсутнім, але це трапляється рідко. Також плазмідні можуть горизонтально передаватися іншим видам *Bacillus* (рідко). Наявність усіх маркерів є достатньою для діагностики *B. anthracis*.

Контроль якості

Усі партії виділення повинні включати перевірочну пробу позитивного контролю, яка є аліквотою зараженого стерильного ґрунту з відомою кількістю спор *B. anthracis*, та банк негативного контролю, який є незараженою аліквотою стерильного ґрунту.

Банк контролю якості – стерильний зразок ґрунту, який служить негативним зразком контролю якості. Банк контролю якості є негативним контролем і контролює можливість перехресного зараження зразків.

Перевірочна проба контролю якості – Зразок контролю якості, що складається зі стерильного зразка ґрунту, зараженого спорами *B. anthracis*, приготований мікробіологічною лабораторією та проаналізований разом з невідомими зразками під час проведення перевірки. Перевірочна проба контролю якості перевіряє ізолювання спор *B. anthracis* протягом процесу їх виділення і забезпечує засоби для контролю цього процесу.

Вимоги до документації

1) Дані необхідно записувати у закодований електронний документ відразу після отримання. Крім того, дані необхідно реєструвати у журналі лабораторії як резервну копію у разі втрати електронного документу. Кожен зразок повинен мати свій ідентифікаційний код, що надається зразку при реєстрації у лабораторії.

2) Усі ізоляти повинні бути зареєстровані в інвентаризаційному переліку вибраних збудників, який визначає джерело культури, ідентифікаційний і специфічний номер культури, місце розташування (морозильна камера), полицю, ящик і положення в ящику. Керівники вищої ланки, а також керівник лабораторії або його заступник перевірятимуть інвентаризаційний перелік і проведуть його вибірккову ревізію на предмет його відповідності вимогам. Перелік необхідно поновлювати щоденно та роздруковувати щотижнево, щоб забезпечити його актуальність.

2.3 ЗБІР ЛИСТЯ З МЕТОЮ ІЗОЛЯЦІЇ *BACILLUS ANTHRACIS*

Як вже довгий час вважається, але рідко перевіряється, під час спалахів мухи можуть забруднювати великі площі навколо трупів тварин. В результаті того, що вони живляться на крові і тканинах інфікованих тварин, вони збирають бактерії і переносять їх на прилеглу рослинність внаслідок регургітації і дефекації під час процесу травлення. У цьому протоколі описується процес збору листя для виявлення наявності *B. anthracis* з листового матеріалу. **Листя необхідно збирати лише у разі наявності трупа.**

Засоби індивідуального захисту

- Костюм з матеріалу типу Tyvek або зовнішній лабораторний халат
- Респіратор N-95.
- Захисні окуляри.
- Рукавички з латексу.

Процедура взяття зразків

1) Руками у чистих рукавичках і пінцетом відбирають листя з виділеннями мух (вологі або сухі фекалії або відригування мух) з гілок. Розташовуйте пальці або кінці пінцету на шві листа, уникайте контакту з виділеннями.

2) Помістіть листя, зібрані з гілки або куща, у 50 мл пластикову пробірку з кришкою, що загвинчується, промаркуйте зразок.

3) Помістіть зразок у прохолодне, сухе місце, доки ви знаходитися у польових умовах.

4) Передайте матеріал персоналу лабораторії.

2) Помістіть зразки у холодильник або морозилку після прибуття до лабораторії, щоб не допустити росту грибку або гниття листу.

3) Зареєструйте зразки у каталозі діагностичних зразків і проведіть лабораторну діагностику культури або ПЛР для зразків з довкілля.

Процедура знезараження польового обладнання

- 1) Пінцет потрібно знезаражувати після роботи у кожному окремому місці знаходження трупу, де збирали зразки листя.
- 2) Пінцет необхідно покласти у 10 % розчин відбілювача і залишити там на 30 хвилин.
- 3) Після цього пінцет можна промити водою і витерти рушником, або висушити на сонці.
- 4) Рукавички необхідно утилізувати як біологічні відходи.
- 5) Рукавички необхідно перевдягати після кожного збору зразків листя.

2.4 ЗБІР ЛИЧИНОК КОМАХ З МЕТОЮ ІЗОЛЯЦІЇ *BACILLUS ANTHRACIS*

Личинок комах необхідно збирати у кожному місці, де знаходиться труп, від самого трупу і біля трупу (в межах 2 метрів від нього).

Засоби індивідуального захисту

- Костюм з матеріалу типу Тувек або зовнішній лабораторний халат.
- Респіратор N-95.
- Захисні окуляри.
- Рукавички з латексу.

Процедура взяття зразків

- 1) Руками у чистих рукавичках і пінцетом зберіть личинок комах. Уникайте контакту з виділеннями.
- 2) Помістіть личинки комах у 50 см³ пластикову пробірку з кришкою, що загвинчується, промаркуйте зразок.
- 3) Помістіть зразок у прохолодне, сухе місце, доки ви знаходитися у польових умовах.
- 4) Передайте матеріал персоналу лабораторії.
- 5) Помістіть зразки у холодильник або морозилку після прибуття до лабораторії, щоб не допустити росту грибка або гниття листу.
- 6) Зареєструйте зразки у каталозі діагностичних зразків та проведіть лабораторну діагностику культури

Процедура знезараження польового обладнання

- 1) Пінцет потрібно знезаражувати після роботи у кожному окремому місці личинок комах.
- 2) Пінцет необхідно покласти у 10 % розчин відбілювача і залишити там на 30 хв.
- 3) Після цього пінцет можна промити водою та витерти рушником, або висушити на сонці
- 4) Рукавички необхідно утилізувати як біологічні відходи
- 5) Рукавички необхідно перевдягати після кожного випадку збору личинок мух.

2.5 ЗБІР М'ЯСНИХ МУХ З МЕТОЮ ІЗОЛЯЦІЇ *BACILLUS ANTHRACIS*

М'ясних мух необхідно збирати у кожному місці, де знаходиться труп, від самого трупу та біля трупу (в межах 3 метрів від нього).

Засоби індивідуального захисту

- Костюм з матеріалу типу Tyvek або зовнішній лабораторний халат.
- Респіратор N-95.
- Захисні окуляри.
- Рукавички з латексу.

Процедура взяття зразків

1) Руками у чистих рукавичках і пінцетом зберіть декількох мух з трупу, зверху вниз, не більше, ніж вміщається у 50 мл пробірку. Помістіть у 50 мл пластикову пробірку з кришкою, що загвинчується, промаркуйте зразок.

2) Повторіть попередній крок для мух, які можуть бути на землі, біля трупу, та які можуть житися виділеною кров'ю або тканинами, у межах 2 метрів від трупу. Зберіть зразки у стерильну пластикову пробірку з кришкою, що загвинчується, промаркуйте зразок.

3) Помістіть зразок у прохолодне, сухе місце, доки ви знаходитесь у польових умовах.

4) Передайте матеріал персоналу лабораторії.

5) Помістіть зразки у холодильник або морозилку після прибуття до лабораторії, щоб не допустити росту мух.

6) Зареєструйте зразки у каталозі діагностичних зразків та проведіть лабораторну діагностику культури або ПЛР для біологічних зразків.

Процедура знезараження польового обладнання

1) Пінцет потрібно знезаражувати після роботи у кожному окремому місці, де знаходиться труп, з якого бралися зразки.

2) Пінцет необхідно покласти у 10% розчин відбілювача і залишити на 30 хвилин.

3) Після цього пінцет можна промити водою і витерти рушником, або висушити на сонці.

4) Рукавички необхідно утилізувати як біологічні відходи.

5) Рукавички необхідно перевдягати після кожного випадку збору зразків мух.

2.6 ЗБІР НАЗАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ З МЕТОЮ ІЗОЛЯЦІЇ *BACILLUS ANTHRACIS*

При багатьох сценаріях спалахів часто беруться зразки з трупів тварин, що загинули три і більше тижнів тому. У таких ситуаціях збір зразків може бути важливим для успішного виділення *B. anthracis*. Під час збору зразків від давно померлих тварин, від них часто залишається лише череп. У багатьох випадках на черепі залишається мінімальна кількість тканини. Носові раковини

знаходяться у носовій порожнині, до них можна дістатися за допомогою довгого пінцету. Вони дуже крихкі та часто речовина в них висихає через декілька днів після спалаху. Невелику кількість речовини можна легко отримати та зберігати у пробірках з кришкою, що загвинчується. При обробці черепу треба бути дуже обережними, тому що деякі краї можуть бути гострими. Рекомендується одягати подвійні рукавички.

Засоби індивідуального захисту

- Костюм з матеріалу типу Tyvek або зовнішній лабораторний халат.
- Респіратор N-95.
- Захисні окуляри.
- Рукавички з латексу.

Обладнання для взяття зразків

- Довгий пінцет.
- Чистий скальпель або філейний ніж з пластиковою ручкою (не використовуйте ніж з дерев'яною ручкою).
- 50 см³ пластикова пробірка з кришкою, що загвинчується.

Процедура взяття зразків

1) Руками у чистих рукавичках тримайте череп. Визначте, чи потрібно з нього видаляти шкіру. Якщо потрібно, то використовуючи скальпель або філейний ніж, розріжте та зніміть шкіру за допомогою скальпелю або філейного ножа.

2) За допомогою довгого пінцету через носову порожнину дістаньтеся до раковин і відламайте невеликі шматочки у них, кожен такий шматочок помістіть у пробірку з кришкою, що загвинчується.

3) Помістіть зразок у прохолодне, сухе місце, доки ви знаходитесь у польових умовах (для цього не потрібен холодильник, але зразки повинні бути охолодженими або замороженими).

4) Передайте матеріал персоналу лабораторії.

5) Помістіть зразки у холодильник або морозилку після прибуття до лабораторії, щоб не допустити росту грибка.

6) Зареєструйте зразки у каталозі діагностичних зразків та проведіть лабораторну діагностику культури або ПЛР для зразків з довкілля.

Процедура знезараження польового обладнання

1) Пінцет та ріжучі інструменти потрібно знезаражувати після роботи у кожному окремому місці знаходження трупу, з якого бралися зразки.

2) Пінцет та ріжучі інструменти необхідно покласти у 10% розчин відбілювача і залишити на 30 хвилин.

3) Після цього пінцет і ріжучі інструменти можна промити водою та витерти рушником, або висушити на сонці.

4) Рукавички необхідно утилізувати як біологічні відходи.

5) Рукавички необхідно перевдягати після кожного випадку збору зразків.

3. ПІДГОТОВКА СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS ANTHRACIS*

У даному розділі описуються загальні методи приготування середовища а також рецепти індивідуальних середовищ, які використовуються для культивування видів *Bacillus*, в тому числі, *B. anthracis*.

Перелік обладнання

- Інкубатор (37 ± 3 °C).
- Холодильник з холодильною камерою (5 ± 3 °C), морозильною камерою (-20 ± 3 °C).
- Автоклав.
- Водяна баня.
- Ваги.
- Міксер-вортекс.
- рН-метр.
- Поршневі піпетки, лабораторні газові горілки.

Матеріали

- Стерильні піпетки з фільтром на кінці.
- Стерильні пластикові шприці.
- Пробірки з кришками, що загвинчуються. Стерильні скляні пляшки з пробками, різні хімічні склянки.
- Стерильні мікро- та кріо-пробірки різних розмірів.
- Стерильні трубки з кришками, що загвинчуються.
- Стерильні пластикові або скляні чашки Петрі.
- Пластикові пакети для чашок Петрі з середовищем.
- Магнітні палички різного розміру, стерильні металеві лопатки, совки і щипці.

Зберігайте екстракти крові у морозильнику (5 ± 3 °C), заморозьте сироватку і зберігайте при (-20 ± 3 °C).

Сухе середовище зберігається герметично у місці захищеному від світла.

Процедура

Етап підготовки

Основне середовище готується з відповідного середовища. Його необхідно зберігати порціями при 5 ± 3 °C і використовувати по мірі необхідності. Максимальний строк зберігання не повинен перевищувати 2 місяців.

Приготуйте первинний концентрований екстракт крові або розчин антибіотику. Впевніться, що реагенти розчинилися. Приготуйте і зберігайте необхідні порції при 5 ± 3 °C або -20 ± 3 °C.

Приготування середовища

Значення рН розчинів визначається при кімнатній температурі.

Після стерилізації в автоклаві і додавання компонентів продовжуйте контролювати та регулювати рівень рН у стерильних умовах.

Маркування

Усі порції основного середовища, розчинів і рідкого середовища позначаються наступним чином:

- маркування середовищ;
- рН-значення (якщо необхідно);
- дата приготування;
- прізвище та ініціали виконавця;

Комерційні чашки Петрі, які містять агар, позначаються наступним чином:

- назва середовища;
- дата виробництва.

Результат і контроль

Контроль стерильності: перевірте комерційне середовище щодо наявності забруднення. Перевірте 2 % партії щодо стерильності, але не більше 5 планшетів, шляхом культивування планшетів при 37 °С протягом тижня, результати перевіряйте щоденно. Результати перевірки на стерильність необхідно записати у журнал. Повідомте про відсутність стерильності, якщо виявлено, мікробіологічній лабораторії.

Контроль стерильності: культивуйте усі організми, отримані від лабораторного середовища протягом 24 годин при 37 °С .

Контроль якості (бактеріальний ріст) під час кожної інокуляції відповідних довідкових штамів.

Забезпечення стерильності

а). використовуйте піпетки з фільтрами на кінці або інші стерильні диспенсери.

б). використовуйте дистильовану воду для приготування розчинів антибіотиків та екстрактів. Розчиніть увесь вміст пробірки.

в). додайте до середовища розчин етанолу через фільтри зі шприцами.

г). зберіть зразки для вимірювання рівня рН з комерційного середовища, користуючись піпетками з фільтрами на кінці або іншими стерильними диспенсерами.

д). правила приготування чашок Петрі з середовищем:

- використовуйте герметичні пакети для приготування середовища у пластикових чашках Петрі. Перед відкриттям обробіть пакет дезінфектантом (наприклад, Bacillol AF або Pursept A) і протріть паперовим рушником;

- впевніться, що кожна чашка упакована окремо при роботі зі скляними чашками Петрі;

- чашки Петрі, заражені бактеріями, повинні бути негайно утилізованими згідно з відповідною процедурою;

- випадок зараження середовища необхідно зареєструвати у журнал для реєстрації препарату.

е). зберігайте середовище у холодильнику або приміщенні-холодильнику при 5±3 °С.

Перелік поживних середовищ

№	Середовище	Акронім
1	М'ясо-пептонний агар	МПА
2	М'ясо-пептонний бульйон	МПБ
3	Кров'яний агар	КА
4	Напівтвердий агар з тетрафеніл тетразол хлоридом	НТА-ТТХ
5	Поліміксин-лізоцим-ЕДТК-ацетат талію агар	PLET

а. М'ясо-пептонний агар (МПА)

Середовище МПА використовується для первинної ізоляції *B. anthracis* з біологічних зразків або зі зразків з довкілля.

1) Посилання: Наказ міністерства охорони здоров'я України від 21.08.2002 № 321 «Про узгодження процедури лабораторної діагностики сибірки у людини, матеріалах тваринного походження та довкіллі»;

2) Зберігання сухого середовища МПА: зберігати у герметичному пакеті за відповідної вологості максимум 60 % при 5 – 25 °С до кінця строку застосування, що вказаний на пакеті;

3) Реагенти

- Дистильована вода;
- Сухе комерційне середовище МПА.

4) Приготування МПА:

а) розчиніть 25 г комерційного середовища МПА у 1 л дистильованої води на водяній бані, ретельно перемішайте;

б) стерилізуйте речовину в автоклаві при 121 °С протягом 15 хвилин;

в) після автоклава ретельно перемішайте та охолодіть до 50–45 °С;

г) виміряйте рН (7,0±0,2) і відрегулюйте значення рівня рН за допомогою стерильного розчину

д) налийте середовище у стерильні чашки Петрі і залиште до затвердіння та висихання при 37±1°С на 50±10 хвилин;

є) зберігайте чашки з МПА у холодильнику не більше 2–3 днів.

б. М'ясо-пептонний бульйон (МПБ)

Середовище МПБ використовується для первинної ізоляції *Bacillus anthracis* з біологічних зразків або зразків з довкілля.

1) Посилання: Наказ міністерства оборони України від 21.08.2002 № 321 «Про узгодження процедури лабораторної діагностики сибірки у людини, матеріалах тваринного походження та довкіллі»

2) Зберігання сухого середовища МПБ: зберігати у герметичному пакеті за відповідної вологості максимум 60 % при 5 – 25 °С до кінця строку застосування, що вказаний на пакеті.

3) Реагенти

- Дистильована вода;
- Сухе комерційне середовище МПБ.

1.2.4. Керівництво для приготування 1 літру середовища з сухого комерційного середовища МПБ.

- а) розчиніть 15 г комерційного середовища МПБ у 1 л дистильованої води на водяній бані, ретельно перемішайте;
- г) розлийте у стерильні 9,5 мл пробірки;
- д) стерилізуйте у автоклаві при 121 °С протягом 20 хвилин;
- е) після автоклава ретельно перемішайте та охолодіть до 50–45 °С;
- є) виміряйте рН (7,0±0,2) і відрегулюйте значення рівня рН за допомогою стерильного розчину
- ж) зберігайте пробірки з МПБ не більше 2–3 днів.

в. Кров'яний агар (КА)

Середовище КА застосовується з метою диференціації *Bacillus anthracis* від сапрофітних бактерій за допомогою початку процесу гемолізу.

1) Посилання: Наказ міністерства оборони України від 21.08.2002 № 321 «Про узгодження процедури лабораторної діагностики сибірки у людини, матеріалах тваринного походження та довікллі»

2) Зберігання сухого середовища: зберігати при 15–30 °С до закінчення строку придатності, зазначеного на упаковці.

3) Реагенти

-МПА

-Дефібринована кров барана

-Дистильована вода

-Комерційне сухе середовище КА

4) Приготування КА

а) відберіть кров барана з яремної вени і помістіть її у дефібринатор (пляшка зі скляними намистинами) та дефібруйте кров вручну.

б) після формування на намистинах компактного згустку фібрину (15–20 хв.) профільтруйте кров через стерильну марлю. Дефібринована кров може зберігатися у холодильнику протягом 3–5 днів.

в) розчиніть 25 г комерційного сухого середовища МПА у одному літрі дистильованої води на водяній бані, ретельно перемішайте;

г) стерилізуйте середовище в автоклаві при 121 °С протягом 15 хв.

д) після автоклаву ретельно перемішайте та охолодіть до 50–45 °С;

є) додайте 3–5 % дефібринованої крові;

ж) виміряйте рівень рН (7,0±0,2) і доведіть його до потрібного за допомогою стерильного розчину;

з) розлийте середовище у стерильні чашки Петрі і промаркуйте;

і) зберігайте чашки з КА у холодильнику не більше 2–3 днів.

г. Напівтвердий агар з тетрафеніл тетразол хлоридом (НТА-ТТХ)

Середовище НТА-ТТХ використовується для диференціації *Bacillus anthracis* від сапрофітних спор, які формують бактерії, за допомогою перевірки на рухливість.

1) Посилання: Скрипник В.Г. Лабораторна діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сировини

тваринного походження та об'єктів навколишнього середовища / В.Г. Скрипник, І.О. Рубленко, Т.О. Гаркавенко та ін. // ДВФССУ, Київ – 2015. – 78 с.

2) Зберігання сухого середовища: зберігати при 15–30 °С до закінчення строку використання, зазначеного на упаковці.

3) Реагенти

- МПБ

- 2,3,5- тетрафеніл тетразол хлорид (ТТС, тетразолієвий червоний)

- Дистильована вода

- Агар-агар

4) Приготування НРА-ТТХ

а) Розчиніть 15 г зваженої кількості комерційного середовища МПБ та 5 г агар-агару у одному літрі дистильованої води на водяній бані, ретельно перемішуючи;

б) Стерилізуйте середовище у автоклаві при 121 °С протягом 15 хвилин

в) Після автоклава ретельно перемішайте та охолодіть до 50–45 °С;

г) Додайте 2,3,5- тетрафеніл тетразол хлорид;

д) Виміряйте рівень рН (7,0±0,2) і відрегулюйте його за допомогою стерильного розчину;

є) Розлийте середовище у стерильні пробірки і промаркуйте їх;

ж) Зберігайте пробірки з середовищем НТА-ТТХ у холодильнику не більше 2–3 днів.

д. Поліміксин-лізоцим-ЕДТК-ацетат талію агар (PLET)

Середовище PLET призначене для ізоляції *Bacillus anthracis* з клінічних зразків.

1) Посилання: Koehler T. M. (2009). *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Molecular aspects of medicine*, 30(6), 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.004>

2) Зберігання сухої речовини: зберігайте при 15–30 °С до закінчення строку використання, зазначеного на упаковці.

3) Реагенти

- Агар із серцево-мозковою витяжкою

-Етілендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТК)

-Ацетат талію

-Лізоцим

-Поліміксин В

-Дистильована вода

4) Приготування PLET

а) Зважте необхідний об'єм компонентів, додайте їх до 0,5 л води і залиште на 10 хвилин, постійно помішуючи;

Агар з серцевої витяжки	40,0 гр
Етілендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТК)	0,2 гр
Ацетат талію	0,04 гр
Антибіотик та розчин лізоциму	10,0 мл
Дистильована вода	990 мл

- б) Додайте решту об'єму води, постійно помішуючи;
- в) Середовище кип'ятиться протягом кількох хвилин при 100 °С, доки компоненти не розчиняться;
- г) Ретельно перемішайте середовище;
- д) Виміряйте рівень рН (7,0±0,2) і відрегулюйте його відповідним чином;
- е) Стерилізуйте середовище в автоклаві при 121 °С протягом 15 хвилин;
- є) Ретельно перемішайте середовище після автоклавування, охолодіть і зберігайте при 50–45 °С;
- ж) Додайте антибіотик і розчин лізоциму за стерильних умов;

Антибіотик і розчин лізоциму (на 10 мл стерильної дистильованої води):

Лізоцим	300,000 часток (40 мг)
Поліміксин В	30,000 часток

- з) Виміряйте рівень рН (7,0±0,2) і відрегулюйте його відповідним чином за допомогою стерильного розчину;
- і) Налийте середовище у стерильні чашки Петрі і промаркуйте їх;
- и) Зберігайте чашки у холодильнику не більше 2–3 днів.

Згідно з Луна та інш. (2009), до PLET можна додати специфічні концентрації антибіотиків для покращення виділення *Bacillus anthracis*. А саме, "PLET, до якого додали сульфаметоксазол (38 $\mu\text{g ml}^{-1}$), триметоприм (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$), поліміксин В (15 000 одиниць л⁻¹) та лізоцим (150 000 одиниць л⁻¹), може успішно виділяти *B. anthracis*..." (Луна та інш. 2009, стор. 301).

4. *BACILLUS ANTHRACIS*: ВИДІЛЕННЯ КУЛЬТУРИ ВІД ТВАРИН, ДОВКІЛЛЯ ТА З ІНФІКОВАНИХ ЗРАЗКІВ

У цьому розділі описуються етапи проведення інокуляції і посів штрихуванням на середовищі з метою росту та характеристики ізолятів *B. anthracis*. Це стосується підготовки зразків від тварин, з доквілля та інфікованих зразків.

ПРИНЦИПИ

Ріст на неселективному середовищі є важливим для ймовірної ідентифікації *B. anthracis*. Тому, субкультури для неселективного середовища необхідно створювати з підозрілих колоній, ізольованих на селективному середовищі. Крім того, при наданні морфологічних даних щодо колоній, ріст клітин на неселективному середовищі є необхідним для проведення подальших лабораторних тестів.

Зразки від старих або розкладених трупів, тваринні продукти або джерела з доквілля містять багато забруднювачів, в тому числі, види *Bacillus* з доквілля. Виявлення включає пошук порівняно декількох колоній *B. anthracis* серед багатьох колоній забруднювачів. Перед культивуванням зразки можна нагріти, щоб знищити бактерії, які не формують спори, і отримати лише ті бактерії, які їх формують. Зразки не можна нагрівати, якщо присутніми є лише вегетативні форми.

Робота зі зразками

При цьому відбирають:

- Мазки з носових та очних пазух;
- Шматочки шкіри або кістки чи інші частини з розкладених трупів. Для полегшення роботи краще брати невеликі кількості зразків;
- Ґрунт з-під трупу, краще брати з зон біля носу або анусу, чи з інших місць, де ґрунту забруднений кров'ю;
- Ґрунт зі старих захоронень;
- Вовна, шерсть і шкіра;
- Кісткова мука або речовина.

Вищезазначені зразки (зразки від тварин та з доквілля) можна транспортувати і зберігати при температурі доквілля. Усі отримані зразки обробляють.

Про будь-які розбіжності щодо типу зразку, об'єму (наприклад, недостатній для аналізу), пакування (наприклад, ушкоджене) і транспортування (наприклад, були експоновані до несприятливої температури або у разі надто довгого транспортування) необхідно негайно повідомити відповідному керівному персоналу лабораторії.

Реагенти – матеріали – обладнання

БІОБЕЗПЕКА
Реагенти
<ul style="list-style-type: none">- 70% етанол- Дезінфектант (0,5% розчин натрій гіпохлориту або еквівалентний цьому дезінфектант)
Матеріали
<ul style="list-style-type: none">- Мішки/контейнер для біологічно небезпечних відходів- Контейнер для дезінфектанту- Одноразові рукавички- Лабораторний халат- Абсорбуючі рушники- Контейнер для гострих інструментів- Додаткові ЗІЗ (захист для очей, органів дихання тощо) за необхідності, згідно з оцінкою ризику
Обладнання
<ul style="list-style-type: none">- Шафа біологічної безпеки II класу (ШББ)

Матеріали/Обладнання для процедури

ПРОЦЕДУРА
Реагенти
<ul style="list-style-type: none">- 5% кров'яний агар (КА)- PLET-агар- М'ясо-пептонний бульйон (МПБ)- М'ясо-пептонний агар (МПА)- Стерильний сольовий розчин- Стерильна дистильована вода- Позитивний контроль: <i>Bacillus anthracis</i> (штам Sterne)- Негативний контроль: <i>Bacillus cereus</i>
Матеріали
<ul style="list-style-type: none">- Стерильні бактеріологічні петлі для інокуляції- Стерильний пінцет- Стерильні анатомічні ножиці або скальпелі- Стерильні ложки для зразків ґрунту або корму- Одноразові піпетки- Лабораторний маркер- Парафільм- Одноразові спиртові тампони- Тримач для чашок Петрі- Пробірки або пляшки з кришками різного розміру
Обладнання
<ul style="list-style-type: none">- Інкубатор, 35°C ± 2°C- Водяна баня від 50°C до 70°C- Вортекс

Контроль якості

1. Усі середовища, приготовані у лабораторії, необхідно зберігати згідно зі встановленими процедурами. Усі комерційні чашки і планшети необхідно зберігати згідно з інструкціями або рекомендаціями виробника.

2. Строк придатності чашок і планшетів необхідно перевіряти перед застосуванням. Не використовуйте матеріали, строк придатності яких вже закінчився.

3. Не використовуйте чашки з агаром, на яких з'явилися тріщини або пошкодження.

4. Перед використанням усі середовища повинні мати документи, у яких зазначаються проведені перевірки стерильності і контроль якості з контрольними штамми (перераховано нижче), а також те, що середовище готується і застосовується відповідним чином.

Позитивний контроль: *Bacillus anthracis* (штам Sterne)

Негативний контроль: *Bacillus cereus*

ПРОЦЕДУРА

Підготовка обладнання та робочої зони лабораторії

1) Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту (ЗІЗ) згідно з оцінкою ризику.

2) Приготуйте дезінфектант згідно з інструкціями.

3) Обробіть робочу поверхню ШББ дезінфектантом перед використанням та розпочніть роботу.

4) Визначте необхідну кількість чашок та планшетів з середовищем і бульйоном. Тримайте чашки і планшети з культурами та бульйоном при кімнатній температурі.

5) Позначте усі чашки і планшети з культурами та бульйоном відповідною ідентифікаційною інформацією.

6) Організуйте чашки та планшети таким чином, щоб їх можна було легко використовувати при переносі матеріалу з пробірки з колекцією на їх поверхню.

7) Додаткові етапи підготовки при роботі зі зразками з довкілля або з трупів тварин включають таке:

- Нагрійте водяну баню до 65°C.
- Нанесіть на усі чашки і планшети з культурами інформацію, що нанесена на пробірку, а також відповідний фактор розведення.
- Промаркуйте пробірки або пляшки зі зразками.
- Приготуйте пробірки з дистильованою водою для розведення та промаркуйте відповідними факторами ідентифікації та розведення.
- Етапи приготування зразку

ПРИМІТКА — усі етапи підготовки зразку повинні проводитися у шафі біологічної безпеки II класу (ШББ).

1) Підготуйте відповідні аліквоти для інокуляції з великих зразків. Великі шматки шкіри або кісток необхідно розділити на маленькі шматочки, які легко увійдуть до пробірки або пляшки.

ПРИМІТКА — краще мати аліквоти, ряд невеликих шматочків шкіри або кісток, ніж один великий зразок.

2) Оберіть зразок, розмір якого підходить до пробірки. Треба взяти якнайбільший зразок, але не переповнювати пробірку. Якщо ви отримали маленький зразок, використайте його увесь.

3) Змішайте зразки з подвійною кількістю стерильної дистильованої води. Наприклад, 3 см³ ґрунту змішайте з 6 см³ стерильної дистильованої води. Кількість повинна бути приблизною, немає необхідності зважувати. Щільно закрийте пробірку кришкою.

4) Перемішайте вміст пробірок зі зразками та водою у міксері-вортекс.

5) Помістіть пробірки на водяну баню при 65 °С на 30 хв.

6) Розведіть зразок десятикратним об'ємом, за три послідовні прийоми розведення. (першим розведенням початкового зразку повинно бути 1:10; розведення першого розведення призведе до другого – 1:100. Розведення другого розведення призведе до третього – 1:1000.) Проведіть усі етапи розведення. Повинно бути 4 пробірки: перша пробірка містить початковий зразок, друга – 1:10, третя – 1:100 та четверта – 1:1000 розведення.

7) Етапи процедури:

ПРИМІТКА — усі процедури з культивування необхідно проводити у ШББ II класу.

Обробка зразків та висівання первинної культури

Обробіть та висійте зразки згідно з описаним у наступній таблиці

Якщо зразок є:	Слідуйте:
Зразком від трупа тварин і зразком довкілля	<p><i>а. Інокулюйте кожне розведення у нестерильному середовищі, такому як МПА, МПБ, КА та у селективному агарі, такому як PLET. Інокулят повинен бути 10–100 мкл на неселективному середовищі, та 250–300 мкл на селективному середовищі.</i></p> <p><i>б. За допомогою петлі для інокуляції рівномірно розподіліть інокулят по поверхні агару.</i></p> <p><i>в. Утилізуйте петлі у контейнер з дезінфектантом.</i></p> <p><i>г. Поверхня, що покрита інокулятом, повинна висохнути.</i></p> <p><i>д. Закрийте краї планшети або чашки за допомогою парафільму.</i></p> <p><i>е. Переверніть планшету або чашку та помістіть у інкубатор.</i></p>

Інкубація: Помістіть інокульоване середовище в інкубатор при температурі 35°C ± 2°C на щонайменше 48 годин. Якщо на першу добу ріст відсутній, продовжуйте інкубувати протягом 5 днів.

Починайте перевіряти через 8 та 24 годин після початку інкубації, а потім щоденно.

Перевірте середовище селективного росту, таке як PLET, щодо *B. anthracis*: Колонії мають, приблизно, круглу форму, вони вершково-білого кольору і мають 1-3 мм у діаметрі, з текстурою матового скла.

7.3. Процедура створення аліквот

Підозрілі колонії необхідно субкультивувати для ізоляції і використання у додаткових тестових процедурах:

1) Відповідно позначені планшети або чашки з МПА або КА використовуються для субкультивування.

2) З планшетів, на яких більше ніж один тип бактеріальної колонії, за допомогою петлі для інокуляції, відберіть з планшети з первинним середовищем одну добре ізольовану бактеріальну колонію, яка вас зацікавила.

3) З планшетів, які містять чисту культуру, за допомогою стерильної петлі для інокуляції, відберіть цілу петлю з планшети з первинним середовищем добре ізольованої бактеріальної колонії.

4) Інокулюйте субкультури за допомогою петлі і висійте штрихуванням на планшеті для ізоляції мікрорганізму, використовуючи метод чотирьох квадратів.

5) Інкубуйте інокульовані планшети при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом 18-24 годин.

6) Проведіть прибирання та знезараження матеріалів, обладнання, робочого місця та ШББ.

7) Утилізуйте матеріали у мішок для біологічно небезпечних відходів або у контейнер для гострих інструментів, згідно з політиками біологічної безпеки.

Інтерпретація результатів

Характеристики колонії *B. anthracis*:

- Після інкубації чашок з МРА і SBA протягом 15-24 годин при $35 \pm 2^\circ\text{C}$, добре ізольовані колонії *B. anthracis* виростають до 2-5 мм у діаметрі. Плоскі або злегка випуклі колонії мають неправильну округлу форму, їх краї злегка хвилясті (R-форма, неправильні, хвилясті краї) і виглядають вони як матове скло; центр колоній іноді може бути темним. На краях колоній часто виникають комоподібні проекції, що створюють вигляд “голови Медузи” (рис 1); однак, колонії можуть бути майже круглої форми без завитків. Колонії *B. anthracis* на МРА та SBA, зазвичай, мають в’язку консистенцію. При перемішуванні за допомогою петлі, колонії виглядають як збиті яєчні білки (рис 2).

- Через 24 години росту патогену МРВ залишається чистим з рихлим осадом на дні, який нагадує вату, що прилипла. При обробці пробірки у вортексі бульйон не стає мутним, а осад розпадається на пластівці. У деяких випадках після струшування спостерігається дифузний ріст культури у МРВ (злегка мутний) з муаровою мутністю.

- На SBA колонії *B. anthracis* не є бета-гемолітичними, у порівнянні з колоніями *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Однак, слабкий гемоліз спостерігається у

зонах суцільного росту у старіючих культурах, його не треба плутати з бета-гемолізом.

- Через 24 години, якщо на МРА або SBA ріст не спостерігається, характеристики *B. anthracis* і збагачений бульйон мутні, висійте нову чашку з SBA зі збагаченим бульйоном.

- У разі отримання змішаних культур чисту культуру патогену сибірки ізолюють шляхом роздільної інокуляції на щільне середовище на чашках Петрі, в тому числі, відокремлення специфічних колоній.

-



Рисунок 1. Чашка з SBA після інокуляції – колонії у вигляді “голови Медузи”.

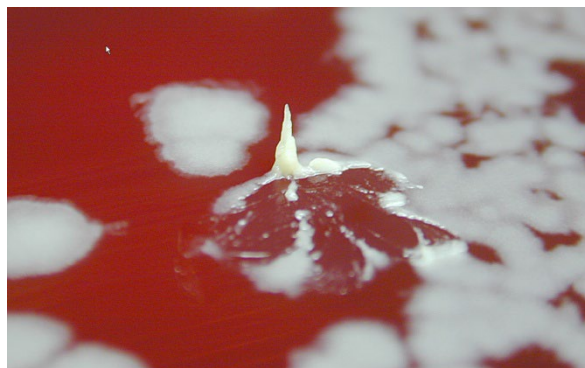


Рисунок 2: Чашка з SBA після інокуляції – колонія з в'язкою консистенцією у вигляді “збитого білку”.

Обмеження процедури

Первинна ізоляція з заражених місць/матеріалів завжди важка і забезпечує лише попередню ідентифікацію. Ріст колоній може нагадувати багато інших організмів і завжди існує біологічна варіація серед різноманітних організмів.

Подальше дослідження виділених колоній проводять з метою підтвердження наявності організму.

Основна процедура посіву штрихуванням на чашках Петрі “чотири квадрати”.

Впевніться, що поверхня середовища суха.

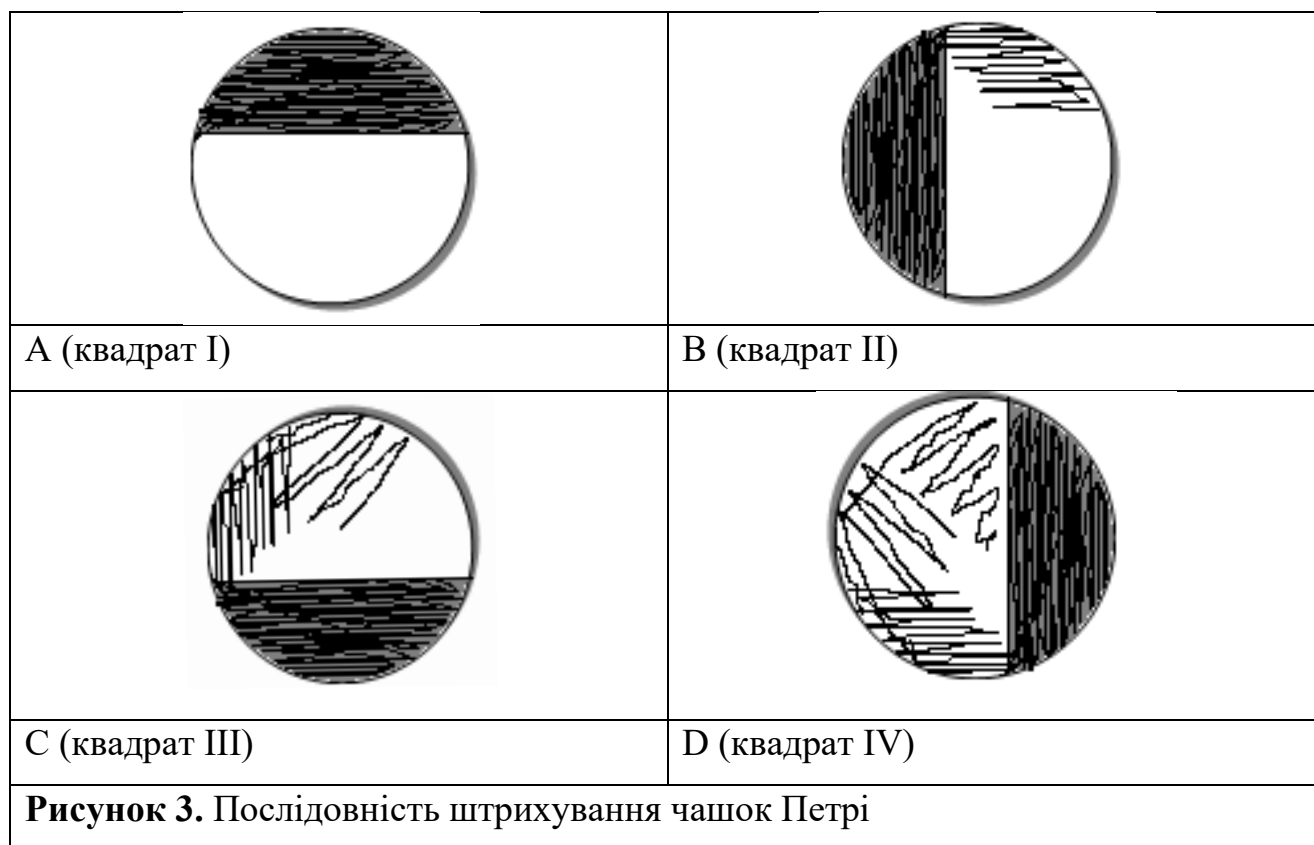
За допомогою стерильної петлі для інокуляції засійте чашки штрихуванням для ізоляції організму, за допомогою методу чотирьох квадратів (рис 3).

Перший квадрат – за допомогою петлі розподіліть інокулят, штрихи повинні розташовуватися поряд один з одним.

Другий квадрат – поверніться до засівання першого квадрату 2-3 рази. Кінці штрихів повинні бути перпендикулярними краю першого квадрату.

Третій квадрат – поверніться до засівання другого квадрату 1-2 рази. Не повертайтеся до першого.

Четвертий квадрат – поверніться до третього квадрату 1-2 рази. Не повертайтеся до першого.



5. ВИЗНАЧЕННЯ РУХЛИВОСТІ

Аналіз рухливості сприяє ідентифікації бактеріальних організмів і часто допомагає відрізнити види шляхом диференціації того, чи є у них бактеріальні джгутики. Наприклад, *Bacillus subtilis* рухливі, а *Bacillus anthracis* – нерухливі організми. Інші нерухливі організми включають *Francisella tularensis*, види *Brucella* та *Yersinia pestis*.

Принцип

При аналізі рухливості визначається наявність бактеріальних джгутиків. Джгутики дозволяють бактерії пересуватися у водному полі мікроскопу або за межами їх початкової точки інокуляції у агаровому середовищі. У пробірках інокулюється напівтверде середовище руху прямими лініями у напрямку вниз через центр пробірки. Рухливі організми мігрують з ліній інокуляції, що призводить до утворення видимої мутності у пробірці. Нерухливі організми лише ростуть вздовж ліній інокуляції.

Матеріали/Обладнання для біобезпеки

БІОБЕЗПЕКА
Реагенти
- 70% етанол - Дезінфектант (0,5 % розчин натрій гіпохлориту або еквівалентний йому дезінфектант)
Матеріали
- Мішки/контейнер для біологічно небезпечних відходів - Контейнери для гострих інструментів - Контейнер для дезінфектанту - Одноразові рукавички - Лабораторний халат - Абсорбуючі рушники - Додаткові ЗІЗ (тобто, захист для очей, органів дихання) за необхідності, згідно з оцінкою ризику
Обладнання
- Шафа біологічної безпеки II класу (ШББ)

Матеріали/Обладнання для процедури

ПРОЦЕДУРА
Реагенти
- Середовище для аналізу рухливості у пробірці з тетразолієвий червоний-2,3,5 тетрафеніл тетразол хлорид (ТТХ) - Штам позитивного контролю - Штам негативного контролю
Матеріали
- Стерильний тампон - Стерильна голка для інокуляції

Обладнання

- Інкубатор
- Стерилізатор петель (якщо використовується неодноразова голка для інокуляції)

Забезпечення якості/контроль якості

Кожного разу при використанні середовища для рухливості, інокулюйте перевірений лабораторією штам контролю якості відомих позитивно та негативно реагуючих організмів. Оберіть контрольний організм з прикладів, наведених нижче.

Позитивний контроль:

Escherichia coli (ATCC 25922 або еквівалент); або *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 або еквівалент)

Негативний контроль:

Staphylococcus aureus (ATCC 29213 або еквівалент); або *Acinetobacter spp.* (ATCC 49139 або еквівалент)

Якщо контрольні організми не поведуться, як очікувалося, тест необхідно повторити. Суперечливі контрольні результати можуть включати помилку процедури. Необхідно визначити причину проблеми та здійснити коригувальні дії. Не повідомляйте про результати тесту, доки проблема не буде вирішеною.

Процедура

Підготовка обладнання та робочої зони лабораторії

- 1) Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту (ЗІЗ), згідно з оцінкою ризику.
- 2) Приготуйте дезінфектант згідно з інструкціями.
- 3) Обробіть робочу поверхню шафу біологічної безпеки дезінфектантом перед використанням та слідуйте усім іншим процедурам запуску.
- 4) Розташуйте усі матеріали у ШББ.
- 5) Необхідна пробірка з середовищем для кожного ізоляту контролю якості та зразку, який перевіряється. Пробірки повинні триматися при кімнатній температурі (18-25° C).
- 6) Позначте кожну пробірку з середовищем руху ідентифікаційною інформацією про зразок.

Етапи процедури

Примітка: процедура повинна проводитися у ШББ.

- 1) За допомогою стерильної голки для інокуляції візьміть зразок речовини з ізолюваної підозрюваної колонії.
- 2) Інокулюйте середовище шляхом обережного проколювання голкою 3-4 см³ середовища та просування голки назад, щоб було видно суцільну лінію інокуляту. Інокулюйте середовище росту для кожного організму контролю якості за допомогою цього методу.
- 3) Помістіть пробірки з інокульованим середовищем руху у підставку для пробірок та інкубуйте згідно з умовами, що перераховані у таблиці нижче, вони визначаються для кожного специфічного організму. Якщо використовуються

пробірки з кришкою, що загвинчується, впевніться, що ці кришки відкриваються при одній чверті повороту після інокуляції.

При визначенні:	Умови інкубації
<i>Enterobacteriaceae</i>	35±2 °C протягом 24 годин
Види <i>Bacillus</i>	35±2 °C протягом 24 годин
Неферментативні грам-негативні палички та ентерококки	30 °C протягом 24 годин
Види <i>Yersinia</i>	Інкубуйте дві пробірки, одну при 35±2°C, а другу при 25 ° C (кімнатна температура) протягом 48 годин

4) Під кінець інкубаційного періоду видаліть пробірки з середовищем з інкубатору.

5) Перевірте наявність рухливості, запишіть результати у журнал.

6) Проведіть прибирання та знезараження матеріалів, обладнання, робочого місця та ШББ.

7) Утилізуйте матеріали у пакет для біологічно небезпечних відходів або у контейнер для гострих інструментів, згідно з політиками біологічної безпеки.

Інтерпретація результатів

Позитивний щодо рухливості = дифузний ріст за межі проведеної лінії або мутність середовища. Див. рис. 4

Негативний щодо рухливості = чиста пробірка з ростом лише вздовж лінії інокуляції вказує, що організми є нерухливими.

У середовищі з ТТХ у зонах матеріального росту з'являється червоний колір.

Рухливі організми виробляють червоно-рожевий пігмент, який дифундує від проведеної лінії.

Нерухливі організми виробляють червоно-рожевий пігмент, який залишається у межах проведеної лінії.

Рухливість наступних організмів:

Bacillus anthracis: Нерухлива.

Види *Brucella*: Нерухливі.

Francisella tularensis: Нерухлива.

Yersinia pestis: Нерухлива.

Обмеження процедури

Хибні позитивні або негативні результати можуть бути отриманими внаслідок того, що для інокуляції середовища руху використовуються змішані культури. Усі зазначені культури повинні бути висіяні для ізоляції з метою демонстрації того, що культура є фенотипово гомогенною.

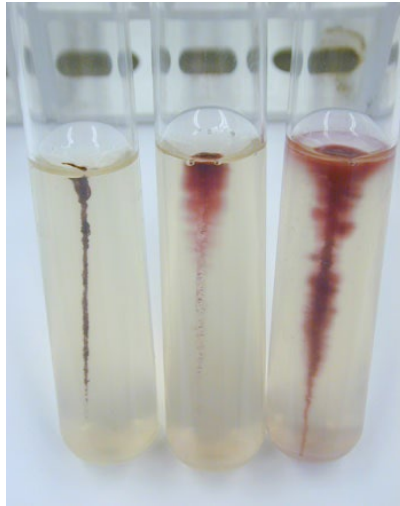


Рисунок 4. Культура зліва є нерухливою; культури посередині та справа – рухливі. Ці реакції виникають у середовищі, яке містить ТТХ.

6. ІДЕНТИФІКАЦІЯ *BACILLUS ANTHRACIS*

У цьому розділі описано швидке посилення на мікробіологічні та серологічні тести, що використовуються для ідентифікації і підтвердження наявності *B. anthracis*. Інструкція не є загальним документом але її можна використовувати як «пам'ятку», що прикріплена на стіні або знаходиться у зручному місці для звернення до неї у будь-який час.

1. Інтерпретація результатів

Ідентифікаційні процедури	Очікувані реакції: <i>Bacillus anthracis</i>
Морфологія колоній	<p>На кров'яному агарі (КА):</p> <p>а. Після інкубації у чашках з SBA протягом 15-24 годин при 35-37 °C з'являються добре ізольовані колонії <i>B. anthracis</i>, 2-5 мм у діаметрі. Плоскі або трохи опуклі колонії мають неправильну круглу форму, з трохи хвилястими краями (неправильна форма, хвилясті краї), та виглядають як матове скло. Вони часто можуть мати комоподібні проекції по краям колонії, такі колонії називаються "головою Медузи".</p>  <p>б. Колонії <i>B. anthracis</i> на SBA зазвичай мають в'язку консистенцію. При перемішуванні петлею колонії виглядають як збитий яєчний білок. На відміну від колоній <i>B. cereus</i> та <i>B. thuringiensis</i>, колонії <i>B. anthracis</i> не є бета-гемолітичними. Однак слабкий гемоліз може спостерігатися під зонами суцільного росту у старіючих колоніях, але це не треба плутати з бета-гемолізом.</p> 

Ідентифікаційні процедури

Очікувані реакції: *Bacillus anthracis*

в. *B. anthracis* росте швидко; на густо засіяних площах ріст може відбутися протягом 6-8 годин, а окремі колонії можна спостерігати протягом 12-15 годин. Ця характеристика може бути використаною для ізоляції *B. anthracis* від змішаних культур, які містять більш повільно ростучі організми.

На PLET (поліміксин, лізоцим, ЕДТК, ацетат талію) агарі:

При вивченні селективного середовища росту, такого як PLET, колонії *B. anthracis* схожі на колонії на SBA агарі, але зазвичай менші, гемоліз не спостерігається.

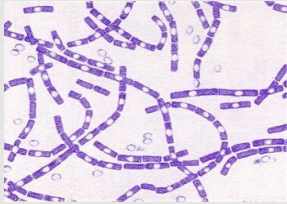
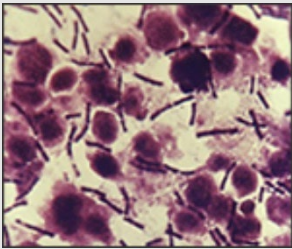
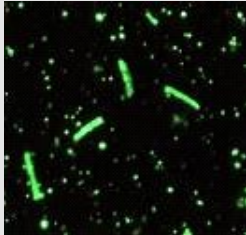
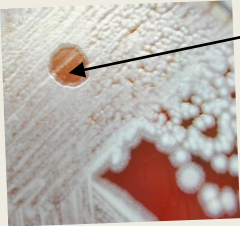


Ріст *B. anthracis* на PLET агарі

Фарбування за Грамом

B. anthracis формує овальні, центральні та субтермінально розташовані спори (1,5 мкм) без значного набрякання клітини, часто формують довгі бактеріальні ланцюги.

Вегетативні клітини, які можна побачити при фарбуванні за Грамом мазків крові та відтисків тканин, сформовані у короткі ланцюги з 2-4 клітин, які вкриті капсулою, що при фарбуванні за Грамом, виглядає як чисті зони навколо бактерій. Спор у клінічних зразках немає, якщо вони не підлягали впливу низьких рівнів CO₂, які присутні у навколишній атмосфері; більш високі рівні CO₂ у тілі пригнічують процес утворення спор. Присутність великих Грам-позитивних паличок з капсулами у крові є високою вірогідністю ідентифікації *B. anthracis*.

Ідентифікаційні процедури	Очікувані реакції: <i>Bacillus anthracis</i>
	 
Рухомість	Нерухливі
Каталаза	Позитивна Примітка: Інформація стосовно активності каталази додається до протоколів тестування, що перелічені у алгоритмі для <i>B. anthracis</i> .
пРІФ капсули	Позитивна імуофлуоресценція
пРІФ стінки клітини	 Позитивна імуофлуоресценція
Лізис гамма-фагу	Позитивна реакція (зона лізису) 

7. ВИДІЛЕННЯ ДНК З КУЛЬТУРИ *BACILLUS ANTHRACIS*

У цьому розділі представлена процедура для ізоляції геномної і плазмідної ДНК з *B. anthracis* та процедура виносу зразків ДНК з лабораторії.

Матеріали/Обладнання

- Нагрівальний блок
- Планшети з SBA
- Одноразові петлі
- Очищувач ДНК LookOut™ DNA Erase
- Ватні палички
- Міні-набір для ДНК QIAamp®
- Протеїназа К
- Міні-набір QIAprep®

Процедура

Умови культивування

1) Інокулюйте планшети з SBA культурами *B. anthracis* за допомогою одноразової петлі. Помістіть планшети з агаром з крові вівці у контейнер вторинного захисту.

2) Інкубуйте планшети з агаром з крові вівці (у контейнері вторинного захисту) протягом 18-24 годин при 35-37 °С у навколишній атмосфері у інкубаторі з подвійним замком.

3) Інокулюйте 0,4 см³ бульйону Хоттінгера або соєвого у пробірки об'ємом 1,5 см³ для мікроцентрифуги по поставте їх на підставку. Помістіть підставку у контейнер вторинного захисту. Інкубуйте впродовж 2,5 годин.

4) У ШББ додайте 500 одиниць пеніциліну до кожної пробірки для мікроцентрифуги та поверніть підставку до контейнеру вторинного захисту.

5) Інкубуйте при 37 °С протягом 15 хвилин.

6) Закрийте кришками пробірки для мікроцентрифуги та інкубуйте при 100°С на нагрівальному блоці протягом 10 хвилин. Охолодіть при кімнатній температурі та зніміть кришки.

7) Центрифугуйте пробірки при 8000 об/хв. протягом 5 хвилин.

8) Надосадова рідина використовується для очищення ДНК.

Виділення геномної ДНК

Примітка: Необхідно запобігти перехресної контамінації зразків ДНК, для чого обробіть робочу поверхню ШББ, пристрої для піпетування та інше обладнання за допомогою спрею для швидкої деконтамінації ДНК перед початком процедури видалення ДНК. Використовуйте для піпеток лише наконечники з фільтрами та відкривайте лише по одній пробірці.

1) Дотримуючись інструкції до набору для екстракції ДНК (наприклад, QIAamp® DNA Mini Kit або аналог) за допомогою піпетки перенесіть 20 мкл протеїнази К у чисті пробірки об'ємом 1,5 см³ для мікроцентрифуги.

2) У ШББ додайте 200 мкл лізату клітини.

3) Додайте 200 мкл буферу до зразку, змішуйте у пульсовому вортексі протягом 15 сек.

4) Закрийте пробірки кришками та інкубуйте при 56 °C на нагрівальному блоці протягом 10 хв.

5) Зніміть кришки та швидко центрифугуйте на мікроцентрифузі у ШББ пробірки об'ємом 1,5 см³, щоб видалити краплини з внутрішньої частини кришки.

6) Додайте 200 мкл етанолу (96-100%) і знову змішайте пульсовому вортексі протягом 15 сек. Після змішування швидко центрифугуйте пробірки об'ємом 1,5 см³, щоб видалити краплини з внутрішньої частини кришки.

7) Працюючи у ШББ, обережно нанесіть суміш на колонку QIAamp (у 2-мл пробірці), без змочування краю. Закрийте кришкою та центрифугуйте при 8000 об/хв. протягом 1 хвилини. Помістіть колонку QIAamp у чисту пробірку об'ємом 2 см³ та утилізуйте пробірку, що містить фільтрат, в контейнер для відходів у ШББ.

8) Обережно відкрийте колонку QIAamp і додайте 500 мкл буферу AW1, без змочування краю. Закрийте кришкою та центрифугуйте при 8000 об/хв. протягом 1 хвилини. Помістіть колонку QIAamp у чисту 2-мл пробірку та утилізуйте пробірку, що містить фільтрат, в контейнер для відходів у ШББ.

9) Обережно відкрийте колонку QIAamp і додайте 500 мкл буферу AW2, без змочування краю. Закрийте кришкою та центрифугуйте на повній швидкості (14000 об/хв) протягом 3 хв.

10) Помістіть колонку QIAamp у нову пробірку об'ємом 2 см³ та утилізуйте пробірку, що містить фільтрат, у контейнер для відходів у ШББ. Центрифугуйте на повній швидкості протягом 1 хв.

11) Помістіть колонку QIAamp у чисту пробірку об'ємом 1,5 см³ для мікроцентрифуги та утилізуйте пробірку, яка містить фільтрат, у контейнер для відходів у ШББ. Обережно відкрийте колонку QIAamp та додайте 200 мкл буферу AE або дистильованої води. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 5 хв., потім центрифугуйте при 8000 об/хв. протягом 1 хв.

Виділення плазмідної ДНК

Примітка: Необхідно запобігти перехресне зараження зразків ДНК, особливо для діагностичних зразків. Працюючи у ШББ, виконуйте інструкції для міні-набору QIAprep®.

1) Візьміть колонію та інокулюйте культуру на 5 см³ бульйону Хоттінгера або соєвого у конічну пробірку об'ємом 15 см³. Помістіть пробірку на підставку та поставте її у контейнер вторинного захисту. Виростіть культуру при 37 °C без енергійного струшування (~240 об/хв) протягом, приблизно, 4–6 годин, доки OD₆₀₀ = 0,8–1,2. Короткий термін вирощування рекомендується внаслідок двох причин: 1. низька щільність клітин долає неповний лізис внаслідок товстої пептидогліканової стінки клітини Грам-позитивних бактерій, та 2. види *Bacillus* виділяють велику кількість нуклеази у середовище та стійки до лізису спори протягом пост-експотентного росту.

2) Перенесіть пробірки до ротору центрифуги у ШББ. Помістіть ротор у центрифугу. Центрифугуйте клітини при 3000 x g протягом 15 хвилин, згідно з СМР щодо центрифугування.

3) Помістіть ротор у ШББ та почекайте 15 хвилин перед тим, як відкрити його. Вийміть пробірки та злийте надосадовий шар у контейнер для відходів у ШББ. Розведіть осад з бактеріальних клітин у 250 мкл буферу P1, що містить лізоцим, у кінцевій концентрації 1 мг/см³ шляхом змішування у вортексі. Впевніться, що РНаза А була додана до буферу P1. Після розведення осаду не повинно бути видимих згустків клітин.

4) Помістіть пробірки на підставку та поставте їх у контейнер вторинного захисту. Інкубуйте при 37 °С протягом 10 хв. Поверніть захисний контейнер у ШББ.

5) Видаліть пробірки з ШББ та додайте 250 мкл буферу P2, обережно переверніть пробірку 4–6 разів, щоб змішати. Обережно змішайте, перевертаючи пробірку. Не застосовуйте вортекс, це призведе до поділу геномної ДНК. Якщо необхідно, продовжуйте перевертати пробірку, доки вміст не стане в'язким та трохи прозорим. Не дозволяйте реакції лізису відбуватися більше, ніж протягом 5 хвилин.

6) Додайте 350 мкл буферу N3 та негайно але обережно переверніть пробірку 4–6 разів. Щоб уникнути утворення локалізованого осаду, обережно але ретельно змішайте розчин, негайно після додавання буферу N3. Розчин повинен стати мутним.

7) Перемістіть пробірки до ротору центрифуги у ШББ. Помістіть ротор у центрифугу. Центрифугуйте при $\geq 10\ 000 \times g$ протягом 10 хв. згідно з інструкціями СМР щодо центрифугування.

8) Під час центрифугування помістіть колонку QIAprep у 2 см³ пробірку. Нанесіть надосадовий шар, отриманий на етапі 7, на колонку QIAprep шляхом піпетування.

9) Центрифугуйте при $\geq 10000 \times g$ протягом 30–60 сек. у мініфузі. Утилізуйте фільтрат колонки.

10) Промийте колонку QIAprep за допомогою 0,5 см³ буферу PB та центрифугуйте при $\geq 10\ 000 \times g$ протягом 30–60 сек. Утилізуйте фільтрат колонки. Цей етап видаляє сліди активності нуклеази та є необхідним для усіх штамів *B. anthracis*.

11) Промийте колонку QIAprep за допомогою 0,75 см³ буферу PE та центрифугуйте при $\geq 10\ 000 \times g$ протягом 30–60 сек.

12) Утилізуйте фільтрат колонки та центрифугуйте при $\geq 10\ 000 \times g$ ще протягом 1 хвилини, виділять залишки буферу промивання.

ВАЖЛИВО: Залишки буферу промивання не видаляються повністю, доки фільтрат колонки не буде утилізованим перед додатковим центрифугуванням. Залишки етанолу від буферу PE можуть пригнічувати подальшу ензимну реакцію.

13). Помістіть колонку QIAprep у чисту пробірку об'ємом 1,5 см³ для мікроцентрифуги. Щоб вилучити ДНК, додайте 50 мкл буферу EB (10 ммоль Tris·Cl, рН 8,5) або води (рН 7,0) до центру кожної колонки QIAprep, залиште на 1 хвилину та центрифугуйте протягом 1 хвилини.

Винесення препаратів ДНК з лабораторії 2-го рівня біологічної безпеки

14). Розподіліть 10 % кожного нерозчиненого препарату (наприклад, 10 мкл препаратів з об'ємами, приблизно, 100 мкл) на соєвому агарі з 5 % крові вівці (SBA) або на іншому збагаченому твердому середовищі, які підтримує ріст *B. anthracis* (наприклад, агар з ВНІ). Помістіть залишки ДНК у холодильник або морозильну камеру.

15). Помістіть планшети у контейнер вторинного захисту та інкубуйте при 37 °С протягом 24-48 годин, перевірте щодо наявності бактеріального росту. Препарати ДНК, які містять *будь-які* життєздатні бактерії, необхідно профільтрувати (фільтр з розмірами пор 0,22 мкм) та знов перевірити щодо бактеріальної стерильності. Усі препарати ДНК повинні бути перевіреними та бути вільними від бактеріального забруднення, згідно з вищезазначеною процедурою, перед винесенням з лабораторії 2-го рівня біологічної безпеки.

8. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКА СИБІРКИ

Молекулярна діагностика ґрунтується на виявленні специфічних ділянок геному *B. anthracis*. Основними мішенями є:

- хромосомні маркери (наприклад, BA5345, pagA),
- плазміда рХО1 (гени *lef*, *pagA*, *суа*),
- плазміда рХО2 (гени *capA*, *capB*, *capC*).

Використовуються методи:

- класична ПЛР (моно- та мультиплексна),
- ПЛР у реальному часі (qPCR),
- LAMP (петльова ізотермічна ампліфікація) для швидкої діагностики,
- секвенування (Sanger, Oxford Nanopore, Illumina) — як підтверджувальний метод у складних випадках.

Матеріали та обладнання

Виділена ДНК (за методикою, описаною у розділі 7).

Набори для ампліфікації:

ПЛР/мультиплекс-ПЛР (MasterMix із Taq-полімеразою, MgCl₂, dNTP).

qPCR (MasterMix із флуоресцентним барвником SYBR Green або специфічними гідролізними зондами).

LAMP (набір із Bst-полімеразою, специфічні праймери: F3/B3, FIP/BIP, LF/LB).

Позитивні контролю: ДНК із відомого штаму *B. anthracis* (Sterne або атенуйовані варіанти).

Негативні контролю: вода без ДНК (контроль реакційної суміші),

ДНК близькоспоріднених *Bacillus* spp. (*B. cereus*, *B. thuringiensis*).

Обладнання: термоциклер, qPCR-ампліфікатор, ізотермічний ампліфікатор або водяна баня/термостат, електрофорез, транслюмінатор, за потреби — секвенатор.

Процедура

Класична ПЛР

Підготовка реакційної суміші: 25 мкл (1× буфер, 2–3 мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 0,2 мкМ праймери, 1 U Taq, 2 мкл ДНК).

Ампліфікація:

денатурація 95°C — 3 хв,

35 циклів (95°C — 30 с, 55–60°C — 30 с, 72°C — 45 с),

фінальна елонгація 72°C — 5 хв.

Аналіз продуктів — електрофорез у агарозному гелі з візуалізацією етидієвим бромідом чи SYBR Safe.

Мультиплексна ПЛР

Одночасне визначення хромосомного маркера та плазмідних рХО1 і рХО2.

Умови аналогічні, але з використанням кількох пар праймерів.

Очікувані амплікони: 200–600 п.н. залежно від цілі.

ПЛР у реальному часі

Використовується SYBR Green або TaqMan-зонди.

Позитивність визначається за $Ct \leq 35$ (залежить від валідації).
Для відмінності від неспецифічних продуктів використовують:
криву плавлення (SYBR Green),
специфічні зонди (TaqMan).

Ізотермічна ампліфікація (LAMP)

Реакція проходить при 60–65 °С протягом 30–45 хв.

Результат оцінюють:

візуально (зміна кольору, турбідиметрія),
флуоресцентним детектором.

Метод зручний для польових умов.

Інтерпретація результатів

Позитивний результат: одночасне виявлення хромосомного маркера + рХО1 + рХО2.

Наявність лише хромосомного маркера = можливий авірулентний штам.

Наявність рХО1 без рХО2 = потенційно вірулентний, але капсули немає.

Наявність рХО2 без рХО1 = не здатний продукувати токсини.

Відсутність усіх маркерів = негативний результат.

Секвенування (сьогодні використовується як додатковий метод для глибокого вивчення патогену, мутаційних змін та філогенетичного аналізу)

Підтвердження діагнозу можливе шляхом повногеномного секвенування (ONT MinION, Illumina) чи таргетного Sanger-аналізу ампліконів.

Отримані дані порівнюються з референсним геномом *B. anthracis* (GenBank).

Отримання повної або часткової геномної послідовності *B. anthracis* для підтвердження видового визначення, виявлення факторів вірулентності (наявність плазмід рХО1 та рХО2), аналізу епізоотичного походження ізолятів та їх філогенетичного порівняння.

Принцип

Секвенування ДНК дає змогу отримати нуклеотидну послідовність цільових ділянок (Sanger-метод) або повних геномів (NGS).

Sanger-секвенування застосовується для підтвердження результатів ПЛР по специфічних маркерах.

NGS (Illumina, Oxford Nanopore Technologies, PacBio) дозволяє виконати повногеномний аналіз, включно з виявленням плазмід, SNP-типуюванням та порівнянням штамів.

Матеріали та обладнання

Чисті культури *B. anthracis* (BSL-3 для вирощування; виділена ДНК може передаватися у BSL-2).

Набори для підготовки бібліотек:

для Illumina — Nextera XT, DNA Prep;

для Oxford Nanopore (ONT) — Rapid Barcoding Kit, Native Barcoding Kit;

для Sanger — набір для PCR-послідовностей з праймерами.

Прилади:

термоциклер для ампліфікації;

секвенатор (ABI 3500, MiSeq/NextSeq, MinION/GridION);

комп'ютер з програмами для біоінформатики (Geneious, MEGA, Galaxy, Epi2Me, Kraken2).

Процедура

Sanger-секвенування

Ампліфікувати специфічні ділянки (наприклад, pagA, capB, BA5345).

Очистити продукти ампліфікації (ферментативно або колонками).

Провести реакцію з використанням BigDye Terminator Kit.

Запустити на капілярному секвенаторі (ABI 3500).

Отримані послідовності вирівняти та порівняти з базами GenBank (BLAST).

Illumina-секвенування

Виконати підготовку бібліотеки (Nextera XT).

Перевірити концентрацію та розмір бібліотеки (Qubit, Bioanalyzer).

Запустити секвенування на MiSeq/NextSeq.

Первинний аналіз: якість (FastQC), обрізка адаптерів (Trimmomatic), асембля (SPAdes).

Подальший аналіз:

пошук генів вірулентності (pXO1/pXO2),

MLVA або cgMLST-типування,

філогенетичне дерево.

Oxford Nanopore (MinION/GridION)

Виконати екстракцію високоякісної ДНК (мінімум 400–1000 нг).

Приготувати бібліотеку (Rapid Barcoding Kit або Native Barcoding Kit).

Завантажити на Flow Cell (R9.4.1 або R10.4).

Виконати секвенування у реальному часі з базовим трекінгом (MinKNOW).

Первинний аналіз:

basecalling (Guppy),

демультиплексування,

фільтрація рідів.

Подальший аналіз:

гібридна збірка геному (Flye + Pilon/Unicycler),

підтвердження наявності плазмід pXO1 і pXO2,

виявлення SNP та філогенетичне порівняння.

Інтерпретація результатів

Наявність послідовностей, ідентичних *B. anthracis* у базі даних ($\geq 99,5\%$ ідентичності) підтверджує вид.

Виявлення плазмідних послідовностей pXO1 та pXO2 свідчить про вірулентний штам.

Відсутність однієї з плазмід вказує на авірулентність.

SNP-аналіз дозволяє визначати спорідненість ізолятів у межах спалаху.

Обмеження

Sanger має обмежену інформативність (аналіз лише окремих генів).

Illumina дає фрагментовані асемблії (складно зібрати плазмідні повністю без довгих рідів).

ONT може мати більший рівень помилок, але добре підходить для збору плазмід і повногеномного аналізу.

Для високої точності рекомендується гібридний підхід (Illumina + ONT).

Обмеження методів молекулярно-генетичного аналізу

Можливі хибнопозитивні результати через споріднені види (*B. cereus*, *B. thuringiensis*).

Втрата плазмід (особливо pXO2) може призвести до хибнонегативних результатів.

Якість ДНК (наявність інгібіторів у ґрунті/біоматеріалі) впливає на чутливість.

LAMP має обмежену специфічність без підтверджувального тесту.

9. ВАЛІДАЦІЯ ТА КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Забезпечення достовірності та відтворюваності результатів індикації та ідентифікації *Bacillus anthracis* за допомогою бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів.

Кожна серія дослідів має супроводжуватися системою внутрішніх і зовнішніх контролів. Результати вважаються прийнятними лише за умови відповідності контролів встановленим критеріям. Валідація методів проводиться на етапі впровадження та регулярно повторюється для підтвердження їхньої ефективності.

Контроль якості при класичній та мультиплексній ПЛР

Позитивний контроль ампліфікації (ПК): ДНК референтного штаму *B. anthracis* (наприклад, Sterne). Має давати специфічний амплікон встановленої довжини.

Негативний контроль реакції (НК): стерильна вода без ДНК. Повинен залишатися без ампліфікації.

Негативний контроль екстракції (НКЕ): проба реагентів, що проходить увесь процес виділення ДНК разом зі зразками. Виключає контамінацію при екстракції.

Перехресний контроль: ДНК близькоспоріднених видів (*B. cereus*, *B. thuringiensis*). Не повинні давати позитивної реакції.

Критерії прийнятності:

ПК = позитивний сигнал у правильній позиції.

НК, НКЕ = відсутність сигналу.

Будь-яке відхилення → серія вважається недійсною.

Контроль якості при qPCR

Включають ті ж самі ПК, НК, НКЕ.

Додатково:

Внутрішній позитивний контроль (IPC): штучна мішень або ген «господаря» для перевірки наявності інгібіторів.

Критерії прийнятності:

$Ct\ ПК \leq 35$ (точний поріг визначається при валідації).

В IPC має бути ампліфікація у всіх пробах.

НК і НКЕ = відсутність ампліфікації.

7.3. Контроль якості при LAMP

ПК: дає чітку позитивну реакцію (зміна кольору/флуоресценції).

НК: відсутність реакції.

Додатково: рекомендовано використовувати флуоресцентні барвники (SYTO 9, EvaGreen) для виявлення неспецифічних продуктів.

Критерії прийнятності: позитивність визначається лише при узгоджених результатах двох незалежних повторів.

Контроль якості при секвенуванні

Sanger:

Чистий спектр хроматограми без накладання піків.

Мінімум 500 нуклеотидів доброї якості.

Illumina:

≥80% рідів із Q30.

Середнє покриття ≥30×.

Oxford Nanopore:

Ріди з середньою якістю $Q \geq 9$.

Загальне покриття геному ≥40×.

Контрольні штами використовуються як еталон для перевірки коректності зборки (наявність rXO1/rXO2, хромосомного маркеру).

Валідація методів

Внутрішньолабораторна валідація:

перевірка чутливості (LOD, кількість копій ДНК, яку метод виявляє з 95% вірогідністю),

перевірка специфічності (відсутність перехресних реакцій з іншими *Bacillus spp.*),

відтворюваність (3 незалежні серії у різних виконавців).

Міжлабораторна валідація:

участь у раундах міжлабораторних порівнянь (PT, EQA).

Документація

Кожна серія досліджень ПЛР/qPCR/LAMP/NGS реєструється у журналі лабораторії.

Обов'язкові дані: дата, виконавець, зразки, контрольні проби, результати, інтерпретація.

Електронні результати (файли .ab1, .fastq, .bam) архівуються у захищеній базі даних.

Обмеження

Недостатній контроль може призвести до хибнопозитивних або хибнонегативних результатів.

Якість виділеної ДНК є ключовим чинником достовірності.

Виконання лише одного тесту (без підтвердження іншим методом) не є достатнім для остаточного висновку.

Перелік етапів для проведення молекулярно-генетичної ідентифікації *Bacillus anthracis*

1. Підготовка

1.1 Одягнути ЗІЗ: халат/комбінезон, респіратор, окуляри, подвійні рукавички.

1.2 Перевірити роботу шафи біобезпеки (ШББ).

1.3 Підготувати позитивний, негативний і внутрішній контрольі.

1.4 Перевірити термін придатності реагентів, умови зберігання.

2. Виділення ДНК

2.1 Виконати екстракцію згідно зі стандартною операційною процедурою.

2.2 Додати негативний контроль екстракції (НКЕ).

2.3 Оцінити якість ДНК (концентрація, чистота).

3. Постановка реакції

3.1 Підготувати реакційну суміш для ПЛР/qPCR/LAMP.

3.2 Додати зразки та контрольі в окремі пробірки/лунки.

- 3.3 Герметично закрити пробірки, уникати аерозолізації.
4. Ампліфікація
- 4.1 Завантажити програму (коректні температурні режими).
- 4.2 Запустити цикл.
- 4.3 Після завершення — відкрити пробірки лише в зоні пост-ПЛР (щоб уникнути контамінації).
5. Аналіз результатів
- 5.1 Для ПЛР: провести електрофорез, звірити розмір ампліконів із маркером.
- 5.2 Для qPCR: перевірити криві ампліфікації та Ct.
- 5.3 Для LAMP: оцінити візуально/флуоресцентно.
- 5.4 Записати всі дані у журнал + зберегти електронні файли.
6. Контроль
- 6.1 Позитивний контроль повинен бути позитивним.
- 6.2 Негативні контролю (реакції, екстракції) — чисті.
- Якщо контроль не відповідає — результати дослідження сумнівні, повторити.

Схема інтерпретації результатів молекулярно –генетичного дослідження

Хромосомний маркер	pXO1	pXO2	Інтерпретація
+	+	+	Високовірулентний ізолят (повноцінний патоген)
+	+	–	Потенційно вірулентний, без капсули (обмежена патогенність)
+	–	+	Наявна капсула, але без токсинопродукування (авірулентний)
+	–	–	Авірулентний штам або такий, що втратив плазмід
–	+ або –	+ або –	Не <i>B. anthracis</i> або хибнопозитивний результат

Примітки:

Для остаточного підтвердження завжди рекомендується комбінація **фенотипових тестів + молекулярних маркерів.**

Сумнівні результати → повторне дослідження, бажано іншим методом (наприклад, qPCR та LAMP паралельно).

БІБЛІОГРАФІЯ ТА НОРМАТИВНІ ПОСИЛАННЯ

1. Luna, V.A., Gullledge, J., Cannons, A.C., Amuso, P.T., 2009. Improvement of a selective media for the isolation of *B. anthracis* from soils. *Journal of microbiological methods* 79, 301-306.
2. American Society for Microbiology. Basic diagnostic testing protocols for level A laboratories - For the presumptive Identification of *Bacillus anthracis*. [online]. CDC, ASM, APHL. Available from URL: <http://www.asm.org/images/pdf/bacillusanthracisprotocol.pdf>.
3. Brachman PS, Friedlander AM. Anthrax. In: Plotkin SA, Mortimer EA, editors. *Vaccines*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994. pp. 729–739.
4. Cieslak TJ, Eitzen EM Jr. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg Infect Dis* 1999; Jul-Aug;5(4):552-5.
5. Dutz W, Kohout E. Anthrax. *Pathol Annu*. 1971;6:209–248.
6. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed. St. Louis, MO: Mosby; 2002.
7. Gilchrist MJR, McKinney WP, Miller JM, Weissfeld AS. *Cumitech 33: Laboratory safety, management and diagnosis of biological agents associated with bioterrorism*. Snyder JW, coordinating editor. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press; 2000.
8. Koehler T. M. (2009). *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Molecular aspects of medicine*, 30(6), 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.004>
9. Lew DP. *Bacillus anthracis* (anthrax). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 2000:2215-2220.
10. Logan NA, Turnbull PC. *Bacillus* and recently derived genera. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press; 1999:357-369.
11. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press; 2003. Vol 1:p. 451.
12. U.S. Dep't. Health Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BMBL)*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; 2007. Available from URL: <http://cdc.gov/od/ohs>.
13. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*, 3rd Edition. Geneva: World Health Organization (WHO); 2004. Available from URL: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>.
14. World Health Organization. *Manual for laboratory diagnosis of anthrax* [online]. Available from URL: <http://www.searo.who.int/en/Section10/Section17/Section58/Section909.htm>
15. World organisation for animal health (OIE). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.1.1. Anthrax. – 2010. – P.135-144.

16. Order of MOH Ukraine of 21.08.2002 No. 321 «On approval of procedure for laboratory diagnostics of anthrax in humans, products of animal origin and the environment»

17. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 21.08.2002 № 321 «Про узгодження процедури лабораторної діагностики сибірської виразки у людини, матеріалах тваринного походження та у навколишньому середовищі».

18. Скрипник В.Г. Лабораторна діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сировини тваринного походження та об'єктів навколишнього середовища / В.Г. Скрипник, І.О. Рубленко, Т.О. Гаркавенко та ін. // ДВФССУ, Київ – 2015. – 78 с.



Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 3.49. Тир. 100 прим. Зам. 898.
Підписано до друку 11.09.25. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника ПП «Стиль-Іздат»
61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2. Т. (066) 822-71-30
Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру
виготовників видавничої продукції серія ХК 240 від 02.09.2009 р.