

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА
КАНДИДАМІКОЗУ**



КИЇВ – 2022

Методичні рекомендації розглянуті та схвалені на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 2 від 06 липня 2022 р.).

Методичні рекомендації розглянуті, затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 6 від 23 вересня 2024 р.).

Розробники: Чечет О. М., Шуляк С. В., Піщанський О. В., Пількевич Н. Я., Марченко Т. В., Куприч О. М., Лінійчук Н. В.

Рецензенти:

Доброжан Ю. В. – кандидат ветеринарних наук, начальник лабораторії атомно-абсорбційної спектрометрії науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Бабкін М. В. – кандидат ветеринарних наук, заступник директора з наукового супроводу виробництва та обігу ВІЗ ДНКІБШМ.

Лабораторна діагностики кандидамікозу : метод. рекомендації; Чечет О.М., Шуляк С.В., Піщанський О. В., Пількевич Н.Я., Марченко Т.В., Куприч О.М., Лінійчук Н.В.; К: ДНДІЛДВСЕ, 2022; 20 с.

Методичні рекомендації включають опис відбирання та підготовки патологічного матеріалу, посів на поживні середовища, ідентифікацію за допомогою світлової мікроскопії грибів роду *Candida* та підтвердження патогенності штамів гриба на лабораторних тваринах.

Рекомендації призначені для спеціалістів державних лабораторій Держпродспоживслужби, виробничих лабораторій підприємств, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності 8.130501 – «Ветеринарна медицина».

ЗМІСТ

ВВЕДЕННЯ	4
1. Вимоги до кваліфікації спеціалістів	6
2. Умови виконання вимірювань	6
3. Засоби вимірювальної техніки, допоміжне обладнання, пристрої, реактиви і матеріали	6
3.1. Засоби вимірювальної техніки	6
3.2. Допоміжне обладнання	6
3.3. Лабораторний посуд	7
3.4. Реактиви	7
3.5. Матеріали	7
3.6. Інструменти	7
4. Порядок відбору проб і підготовка до проведення досліджень	8
4.1. Відбір і доставка зразків	8
4.2. Підготовка скляного посуду	8
4.3. Приготування середовища	8
5. Хід дослідження	9
5.1. Мікроскопічні дослідження	10
5.2. Культуральний метод виділення чистої культури збудника	12
5.3. Визначення, ідентифікація та диференціація збудника кандидамікозу	13
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	18
ДОДАТОК А	19
ДОДАТОК В	20

ВВЕДЕННЯ

Кандидамікоз (лат., англ. – Candidamycosis, Candidosis; кандидоз, кандідіаз, молочниця) – грибкове захворювання тварин, що характеризується утворенням нашарувань на слизових оболонках травного тракту, ураженням паренхіматозних органів з утворенням гранульом, ураженням шкіри (вологий дерматит). Хвороба поширена в усіх країнах світу. Хворіють всі види сільськогосподарських тварин. Особливо великий економічний збиток захворювання наносить птахівничим господарствам.

Збудники хвороби. Збудники кандидамікозів – дріжджоподібні гриби роду *Candida*, найчастіше *C. albicans*, а також інші представники даного роду (*C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*).

Діагноз на кандидамікози встановлюється на підставі епізоотичних даних, клінічних ознак, патологоанатомічних ознак, результатів лабораторних досліджень (мікроскопічних, мікологічних, біологічних).

Для встановлення діагнозу на кандидамікоз до лабораторії направляють патологічний матеріал від хворих тварин: зіскріби з слизової оболонки ротової порожнини, та порожнини носа взяті в місцях, де є сіро-білі нашарування, лусочки шкіри, ексудати з носа, піхви, молока (секрету) з уражених часток вимені, зразки сперми, у разі загибелі – трупи тварин.

Лабораторні дослідження проводяться шляхом мікроскопії та культивування матеріалу на спеціальні поживні середовища, постановки біопроби. Дослідження в середньому тривають від 7 до 15 днів.

Симптоми. З урахуванням клінічного розмаїття проявів хвороби розрізняють кишкову, вісцеральну (легеневу) та шкірну форми кандидамікозу. Кишкова форма частіше реєструється у птахів, рідше у свиней, телят, а легенева – у молодняка великої рогатої худоби та овець, шкірна – у свиней та собак.

Інкубаційний період триває від 3 до 15 діб в залежності від ступеню резистентності організму та вірулентності збудника. У індичат та курчат хвороба перебігає гостро. Хвора птиця втрачає апетит, пригнічена, тримається скупченою, нерідко розвивається пронос. Найбільш характерною ознакою є

ураження зоба, важке дихання та ковтання. При пальпації зоба відмічають сильне потовщення його стінок та болючість. Хвора птиця часто витягує шию та ковтає повітря. В результаті загального септичного процесу птиця гине на (3 – 8)-му добу.

У великої рогатої худоби та овець вражаються легені з ущільненням та утворенням великої кількості вузликів казеозного типу. Захворювання супроводжується пригніченням, зниженням апетиту, появою сильного сухого кашлю, бронхіальних шумів та хрипів. Температура тіла підвищується до 40 – 41°C. Із носових отворів виділяються слизово-гнійні виділення, іноді з домішками крові. Розвивається профузний пронос. Дихання погіршується, та хвороба часто закінчується загибеллю тварини. Нерідко кандидамікоз легень розвивається, як вторинне захворювання, при захворюванні тварин туберкульозом, пастерельозом та іншими хворобами заразної етіології.

У корів спостерігається кандидамікозне ураження вимені та розвиток маститу з усіма його характерними симптомами. Вим'я набрякає, стає болючим, припиняється молоковіддача, а із діжок виділяється серозний або гнійний ексудат. Можливе ураження слизових оболонок піхви з утворенням білих рихлих плівок. Вагініти кандидамікозної етіології призводять до абортів з ураженням плода або до безпліддя тварин.

Кандидамікоз у овець, частіше у ягнят зимового окоту, перебігає з симптомами ураження легень.

У свиней захворювання характеризується афтозним стоматитом з утворенням сірувато-білих нашарувань на слизових язика, ясен, мигдалин, глотки та п'ятачка. Після відторгнення плівки утворюються виразки різного розміру, підслизова запалена та набрякла. Ковтання у поросят утруднене, спостерігається виснаження та загибель тварин.

У собак кандидамікозне ураження частіше перебігає за типом вологих дерматитів. Спочатку розвивається гіперемія шкіри, потім з'являються папули, пустули, які лопаються та утворюють вологу поверхню. Завершується процес десквамацією епітелія та розвитком гіперкератозу.

1. ВИМОГИ ДО КВАЛІФІКАЦІЇ СПЕЦІАЛІСТІВ

Для виконання дослідження й обробки результатів, постановки діагнозу допускаються особи, що мають вищу освіту з кваліфікацією лікаря ветеринарної медицини, пройшли навчання з охорони праці, та мають допуск до виконання цієї методики.

2. УМОВИ ВИКОНАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Виконуючи ці дослідження необхідно дотримуватися:

- Загальні санітарно-гігієнічні вимоги до повітря робочої зони;
- Правил роботи в лабораторіях ветеринарної медицини;
- ДСТУ ISO 7218:2014 Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень.

3. ЗАСОБИ ВИМІРЮВАЛЬНОЇ ТЕХНІКИ, ДОПОМІЖНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ПРИСТРОЇ, РЕАКТИВИ ТА ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА, РОЗХІДНІ МАТЕРІАЛИ

3.1. Засоби вимірювальної техніки

3.1.1. Ваги лабораторні з точністю 0,1 г;

3.2. Допоміжне обладнання

3.2.1. Мікроскоп біологічний, із збільшенням 40х до 1600х;

3.2.2. Ламінарна шафа біологічної безпеки, клас II;

3.2.3. Термостат-інкубатор з температурним режимом 10–50 °С;

3.2.4. Холодильник;

3.2.5. Пальник спиртовий, газовий;

3.2.6. Автоклав з температурним режимом 121 °С, 132°С;

3.2.7. Сушильна шафа з температурним режимом 120 – 160 °С.

3.3. Лабораторний посуд

3.3.1. Чашки Петрі;

3.3.2. Колби скляні об'ємом 250 см³;

3.3.3. Предметні скельця;

3.3.4. Покривні скельця;

- 3.3.5. Пастерівські піпетки;
- 3.3.6. Мірні циліндри 100 см³ та 1000 см³.

3.4. Реактиви, поживні середовища

- 3.4.1. Агар Сабуро з глюкозою;
- 3.4.2. Основа агару для дерматофітів з селективною добавкою;
- 3.4.3. Натрій хлористий, хч.;
- 3.4.4. Агар-агар;
- 3.4.5. Спирт етиловий;
- 3.4.6. Вода бідистильована;
- 3.4.7. Гліцерин;
- 3.4.8. Ацетон;
- 3.4.9. 96% етанол;
- 3.4.10. Глюкоза;
- 3.4.11. Пептон;
- 3.4.12. Метиленовий синій;
- 3.4.13. Натрій гідроксид;

3.5. Матеріали

- 3.5.1. Рукавички нітрилові;
- 3.5.2. Індикатори хімічні стерилізації на 121–132°C.

3.6. Інструменти

- 3.6.1. Ножиці;
- 3.6.2. Пінцет;
- 3.6.3. Бактеріологічна петля;
- 3.6.4. Бактеріологічна голка;
- 3.6.5. Камера Горяєва

Допускається застосування інших засобів вимірювальної техніки, допоміжних пристроїв, реактивів і матеріалів, з метрологічними характеристиками та показниками якості не нижчими за наведені.

Всі засоби вимірювальної техніки мають бути калібровані у встановленому порядку.

4. ПОРЯДОК ВІДБОРУ ПРОБ І ПІДГОТОВКА ДО ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.

4.1. Відбір і доставка зразків.

Для прижиттєвої діагностики кандидомікозу в лабораторії направляють у стерильних пробірках зіскриби з слизової оболонки ротової порожнини, взяті в місцях, де є сіро-білі нашарування, лусочки шкіри, ексудати з носа, піхви. При підозрі на мастити, відбираються проби (по 10–20 см³) молока (секрету) з уражених часток вимені, дотримуючись правил асептики. Зразки сперми надсилаються в лабораторії, як мінімум у двох стерильних паєтках по 0,5 см³. Для посмертної діагностики в лабораторії надсилають частини уражених органів або свіжі трупи тварин (птиці).

Проби доставляють у лабораторії одразу після їхнього відбору. Аналіз необхідно розпочинати в день доставки проби в лабораторії.

4.2. Підготовка скляного посуду.

Новий скляний посуд миють гарячою водою з миючим засобом, ретельно промивають бідистильованою водою та просушують за температури 120 °С. Після охолодження зберігають у шафі для лабораторного посуду.

Стерилізацію чашок, а також піпеток, попередньо завернутих у папір, проводять в сушильній шафі за температури 140 –160 °С протягом двох годин. Якість стерилізації контролюють індикаторами температурного режиму.

4.3. Приготування поживних середовищ.

4.3.1. Приготування середовища Сабуро.

В колбу вносять 40 г глюкози, 10 г пептону, 18 г агар-агару, ретельно розмішують, нагріваючи в 1000 см³ бідистильованої води до повного розплавлення агару, фільтрують через ватно- марлевий фільтр, розливають у колби та стерилізують за 1 атм при температурі 121 °С протягом 15 хв. Якість стерилізації контролюють індикаторами температурного режиму. Поживне середовище зберігається 1 місяць при температурі 2 – 8°С.

4.3.2. Приготування середовища Сабуро із комерційного сухого Агара

Сабуро з глюкозою проводять згідно інструкції виробника.

Якість стерилізації контролюють індикаторами температурного режиму.

Поживне середовище зберігається 1 місяць при температурі 2 – 8°C.

4.3.3. Приготування основи агару для дерматофітів проводять згідно інструкції виробника. Стерилізують за 1 атм. (121°) 15 хв.

Якість стерилізації контролюють індикаторами температурного режиму.

Поживне середовище зберігається 1 місяць при температурі 2 – 8°C.

4.3.4. Приготування кукурудзяного агару.

На 1000,0 см³ води необхідно: кукурудзяне борошно – 40,0 г ; агар-агар – 25,0 г.

В колбу вносять 40,0 г кукурудзяного борошна поступово додаючи воду (300 – 500 см³) невеликими порціями, рівномірно змішуючи суміш, та кип'ятять протягом 1 год. Охолоджену суміш фільтрують через марлю. Змішують фільтрат кукурудзяного борошна з агаром у мірній колбі і доводять об'єм водою до 1000,0 см³. Розливають у колби та стерилізують за 1 атм. (121°) 15 хв.

Кінцеве значення рН (при 25 С) $6,0 \pm 0,2$

Поживне середовище зберігається 1 місяць при температурі 2 – 8°C.

Примітка: Розплавлене середовище (п.5.3.1-5.3.4) розливають у чашки Петрі по 20 см³, завтовшки 0,5 см³ і охолоджують до 40 – 30 °С, коли середовище набуває твердого стану.

4.3.5. Приготування фіксуючої рідини.

В однаковій пропорції , за об'ємом, змішують гліцерин : вода : етиловий спирт (1:1:1).

4.3.6. 1% спиртовий розчин метиленового синього.

В колбу місткістю 100 см³ вносять 1 г метиленового синього додають 60 см³ 96% етанолу і доводять до мітки дистильованою водою.

4.3.7. Приготування розчину 0,1М натрію гідроксиду

У мірний стакан місткістю 100см³ вносять 0,4 г натрію гідроксиду та доводять до мітки бідистильованою водою. Ретельно перемішують. Термін зберігання 2 місяці за кімнатної температури.

5. ХІД ДОСЛІДЖЕННЯ

5.1. Мікроскопічні дослідження

Мікроскопія мазків – відбитків із патологічного матеріалу дозволяє лише орієнтовно ознайомитись із наявною мікрофлорою та виявити гриби.

Мікроскопують пофарбовані та не пофарбовані препарати. Для виявлення грибів у нефарбованому стані, бактеріологічною петлею або гачком (прожареними над полум'ям пальника, та охолодженими) набирають невелику кількість патологічного матеріалу, наносять краплю фіксуючої рідини (п. 5.3.5), накривають покривним скельцем та мікроскопують за малого збільшення, а також при збільшенні 400x та 600x.

Для виявлення грибів у фарбованих мазках готують тонкий, рівномірний мазок округлої чи овальної форми діаметром 1 – 1,5 см. Мазок перед забарвленням висушують на повітрі або над полум'ям пальника і фіксують після повного висихання. Фіксацію проводять у полум'ї пальника, тричі проносячи скельце через полум'я стороною, на якій немає мазка. Необхідно стежити, щоб загальний час перебування препарату в полум'ї не перевищував 5 – 6 сек. Достатність фіксації можна перевірити, торкнувшись тильною стороною скельця шкіри кисті: скло повинно бути гарячим, але не створювати відчуття опіку. Після чого фарбування препарату проводять 1% спиртовим розчином метиленового синього, який витримують, 1– 3 хв. Препарат мікроскопують за малого збільшення, а також при збільшенні 400^x та 600^x.

При мікроскопічному дослідженні препаратів за наявності грибів виявляють клітини роду *Candida*, типової морфології (овальні, круглі), в деяких випадках з брунькою (лише однією), псевдоміцелій, іноді хламідоспори, визначають типи філамінтації (росту) (табл.2).

5.2. Культуральний метод виділення чистої культури збудника

Гриби роду *Candida* ростуть та розвиваються на багатьох поживних середовищах. Найбільш вживаними є: агар Сабуро, основа агару для дерматофітів, кукурудзяний агар та ін. Для виділення із біологічного та

патологічного матеріалу грибів роду *Candida* використовують одне із запропонованих поживних середовищ (п. 5.3).

Таблиця 2

Морфологічні та культуральні характеристики грибів роду *Candida*

Вид гриба	Мікроморфологія			Макроморфологія
	Форма клітин	Типи росту	Особливі ознаки	Характер росту колоній на агаризованих середовищах на агарі Сабуро з глюкозою за температури 25°-30° С
1	2	3	4	5
<i>C. Albicans</i>	Круглі або злегка овальні	Мycotorula (Шаровидний тип) Мycotoruloides (Криловидний тип) (додаток В)	Хламідоспори	Колонії від білих до кремових, випуклі, гладенькі або злегка зморшкуваті, які глибоко проростають в субстрат, 2-3 см в діаметрі (додаток А).
<i>C. Tropicalis</i>	Овальні	Мycotorula (Шаровидний тип) Мycotoruloides (Криловидний тип) Мycocandida (Рудиментарний тип) (додаток В)	Псевдоконідії	Колонії дрібні, гладенькі або зморшкуваті (з зубчастими краями), тьмяні вростають в субстрат, 3,5-4,5 см в діаметрі.
<i>C. Kefyr</i>	Овальні	Мycocandida (Рудиментарний тип) Мycocandida (Рудиментарний тип) (додаток В)	-	Колонії від білих до кремових, є постійно кілька сухих на вигляд, плоскі, з куполоподібним центром (трохи підняті над субстратом), 2-3,5 см в діаметрі.
<i>C. Krusei</i>	Злегка продовговаті	Мycotorula (Шаровидний тип) Мycotoruloides (Криловидний тип) Мycocandida (Рудиментарний тип) (додаток В)	Псевдоконідії	Колонії сухі й тьмяні, часто лінзовидні (у формі ока), плоскі, гладкі, вростання в субстрат відсутнє.
<i>C. Guilliermondii</i>	Овальні	Мycocandida (Рудиментарний тип) Blastodendrion (Деревовидний тип) (додаток В)	Немає бластоспор або їх мало, псевдоконідії	Випуклі, гладкі, блискучі, білувато-кремового кольору з короткими відростками в субстрат, дрібні і вологі.

1	2	3	4	5
<i>C. lusitaniae</i>	Овальні	Рідкісні псевдогіфи, що нагадують ланцюжки бластоконідій, у деяких штамів рідко розгалужені, іноді вигнуті псевдогіфи. (додаток В)	-	Колонії дрібні, білі, при старінні стають вологими.
<i>C. glabrata</i>	Овальні	Дуже дрібні дріжджові клітини, що скупчуються і не формують гіф або псевдогіф	-	Колонії білі, блискучі, при старінні зберігаються вологими.
<i>C. parapsilosis</i>	-	Скупчення бластоконідій уздовж гіф, псевдогіфи з багаторазовими розгалуженнями	Псевдоконідії	Колонії дрібні, від білих до кремових і жовтих, гладкі і зморшкуваті.

5.2.1. Внутрішньо – лабораторний контроль

5.2.2. Контроль боксів

Підготовку та посів матеріалу проводять у стерильних умовах – біля полум'я пальника в боксі. Розплавлене середовище розливають у чашки Петрі по 20 см³ і охолоджують до температури 40-30 °С.

5.2.3 Контроль поживного середовища

Перед посівом даного матеріалу проводять контроль забруднення повітря в боксі спорами грибів седиментаційним методом. З цією метою 1 – 2 чашки з середовищем залишають відкритими протягом 3 хвилин. Контрольні чашки завертаються у стерильний папір і витримуються за температури 37°С протягом 10 діб.

5.2.4. Посів матеріалу на поживне середовище

Для виділення чистої культури патматеріал (шматочки внутрішніх органів, розміром 0,5 -1 см), лусочки шкіри, біоматеріал, сперму, молоко від хворих корів висівають на агаризоване середовище. Сперму з піпетки та молоко по 0,5 см³ від корів, хворих на мастит, висівають на агаризоване середовище шляхом розливу. Екsudати та зіскріби розмащують по поживному середовищі стерильною ватною

паличкою. Лусочки шкіри та шматочки патматеріалу розкладають пінцетом по всьому об'єму чашки, не торкаючись одна до одної. Чашки Петрі з посівами завертають у стерильний папір і витримують за температури 37°C протягом 7 – 10 діб. Ріст і спороношення більшості грибів стає помітним уже через 2 доби, однак ідентифікація грибів потребує більших термінів культивування 5 – 7 діб, а іноді й більше. У випадку відсутності типових колоній грибів через 2 доби, чашки зберігають 7 днів і лиш тоді, якщо ріст грибів відсутній, видається негативний результат. За наявності типових колоній проводиться перегляд чашок з посівами та ідентифікація грибів на 2, 5, 7 та 10 добу.

Після закінчення культивування проводять макро- та мікроскопічне дослідження колоній. Препарати готують з дотриманням правил асептики. Маленькі частинки міцелію, бажано зі спороношенням, відібрані бактеріологічним гачком, як із молодих, так і старих частин колоній, кладуть на предметне скло в невелику краплю фіксуючої рідини для препаратів. Для цього використовують другу голку, за допомогою якої обережно знімають і розправляють матеріал. Для більш чіткого зображення проводять фарбування препарату, використовуючи 1% спиртовий розчин метиленового синього, який витримують протягом 1– 3 хв. Покривають препарат покривним склом і злегка притискають.

5.3. Визначення, ідентифікація та диференціація збудника

В практикуючих лабораторіях, зазвичай, обмежуються визначенням роду, з науковою метою і для більш точної характеристики грибів визначають їх вид. Належність виділеної чистої культури гриба до роду *Candida* встановлюють на основі морфологічних і культуральних ознак – форми клітин, наявності псевдоміцелію та характерних колоній (табл.2).

Більш розширена ідентифікація виділених грибів з виявленням їх виду проводиться за виявленням хламідоспор та визначенням типу росту (філамінтацією).

При виявленні належності до дріжджоподібних грибів роду *Candida* виникає необхідність диференціації їх із справжніми дріжджами.

Дріжжі утворюють аскоспори, не мають псевдоміцелія, вертицил, хламідоспор, ростуть за температури 20 – 30°C, розмножуються множинним брунькуванням, не патогенні для тварин.

Дріжжоподібні гриби роду *Candida* не мають аскоспор, утворюють псевдоміцелій, вертицили, хламідоспори, ростуть за температури 28 – 43°C (оптимальна температура 37°C), брунькування кінцеве, патогенні для тварин (найбільш патогенним є *C. albicans*). Перші дві ознаки є основними для диференціації (Рис.1, 2).

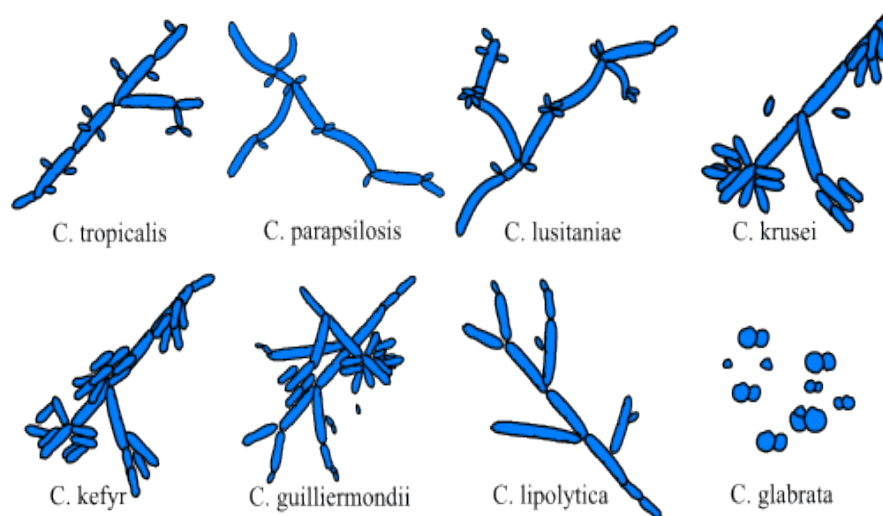


Рис. 1. Мікроморфологія штамів грибів роду *Candida*

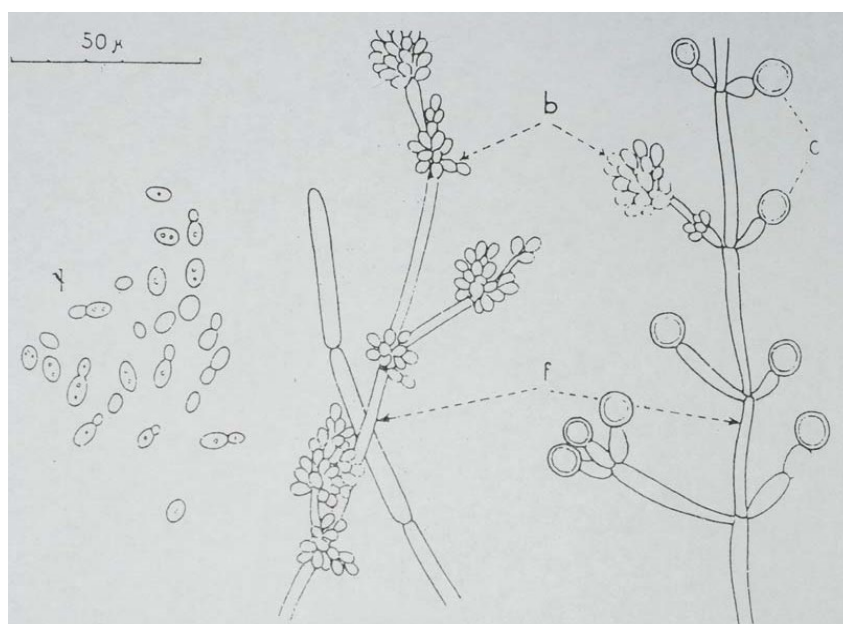


Рис. 2. Мікроморфологія штаму грибів роду *C. albicans*, вирощеного на різних поживних середовищах.

5.3.1. Визначення патогенних властивостей грибів.

Патологічний та біологічний матеріал, який містить гриби: *C. albicans*, *C. tropicalis* не досліджують біологічним методом, оскільки ці види грибів є потенційно патогенні.

Патологічний матеріал, який містить гриби роду *Candida* іншого виду (*C. stellatoidea*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parakrusei*) або за неможливості проведення чіткої видової ідентифікації штаму грибів, підлягає подальшому дослідженню щодо визначення патогенних властивостей грибів на лабораторних тваринах.

5.3.2. Приготування матеріалу для зараження.

Вирощену на агаризованому середовищі культуру гриба, змивають стерильним фізіологічним розчином. Змив центрифугують за 1000 об/хв. протягом 15 хв. Надосадову рідину зливають, осад розводять до 1 см³ стерильним фізіологічним розчином. Кількість клітин гриба в суспензії підраховують в камері Горяєва. Для приготування суспензії, яка необхідна для зараження піддослідних тварин, користуються методом послідовних десятикратних розведень. Для зараження піддослідних тварин використовують 1 см³ суспензії, отриманої з 24 – 48 годинної культури, що містить 300– 500 тис. клітин.

Дріжджові клітини у рідких субстратах підраховують після попереднього розбавлення водою. У мірну колбу ємністю 100 см³ вносять 2, 4 або 10 см³ дріжджової суспензії залежно від передбаченої концентрації клітин. Для забарвлення мертвих дріжджових клітин додають 20 – 30 см³ метиленового синього (1:5000) або 1 – 5 см³ концентрації 1:40.

Камеру та спеціальне шліфоване покривне скло добре промити і висушити. На поверхню сітки нанести по невеликій краплині підготовленого розбавлення і накрити покривним склом. Рідина під покривним склом має розтікатися рівномірно по всій сітці, без пухирців.

Для того щоб об'єм рідини точно відповідав розрахунковому об'єму камери, покривне скло притерти до бічних площадок камери допоки не з'являться так звані кільця Ньютона. Можна спочатку притерти покривне скло, потім за допомогою піпетки заповнити камеру суспензією. Клітини підрахувати через 3 – 5 хв після заповнення камери, щоб клітини осіли і були видними в одній площині. Рухливі форми перед нанесенням на сітку слід знищити нагріванням.

Клітини підрахувати в п'яти (можна в десяти) великих квадратах по діагоналі або по кутках сітки і в центрі. Врахувати всі клітини, які містяться всередині великого квадрата і на суміжних лініях, якщо вони більш як наполовину лежать усередині квадрата. Клітини, які перетинаються суміжною лінією навпіл, слід рахувати на двох з чотирьох сторін квадрата; клітини, розміщені за межами квадрата, не враховувати. Кількість клітин у 1 см³ обчислюється за формулою:

$$x = (a \cdot 4000 \cdot v / c) / 1000,$$

де а – сума клітин, підрахована в п'яти (або в десяти) великих квадратах сітки;

v – розбавлення вихідного субстрату;

c – кількість малих квадратів, у яких проводився підрахунок.

5.3.3. Зараження піддослідних тварин.

Для зараження варто брати не менше двох кролів вагою 2 – 3 кг, або 5-ти білих мишей, вагою 14 – 16 г. Суспензію грибів вводять: кролям – внутрішньовенно в кількості 1 см³, мишам – внутрішньоочеревно по 0,5 см³. Захворювання в залежності від вірулентності гриба, розвивається на 2 – 4 день. У всіх тварин спостерігається пригнічення, підвищення температури, парези, паралічі. Паралельно із піддослідними тваринами ставлять клітку із контрольними. Всіх піддослідних тварин не обмежують в годівлі та напуванні.

При розтині тварин, що загинули, виявляють множинні вузлики – гранульоми в паренхіматозних органах.

Якщо через 10 днів тварини не гинуть, то незалежно від наявності або відсутності клінічних ознак захворювання, їх усипляють хлороформом (вату змочують 5,0 см³ хлороформу) і піддають патологоанатомічному розтину. На розтині виявляють, насамперед, ураження нирок у вигляді множинних сірувато-білих гранульом у корковому шарі, а також наявність гранульом в печінці, селезінці, серці та легенях.

5.3.4. Оцінювання результатів

Патогенність грибів встановлюється на основі виявлення при розтині характерних патологоанатомічних змін у внутрішніх органах (гранульом); з подальшим мікологічним дослідженням гранульом, виявленні в них чистої культури гриба. Інколи проводять гістологічне дослідження гранульом.

При загибелі піддослідних тварин, відібрані внутрішні органи з гранульомами підлягають повторному мікробіологічному дослідженню, шляхом посіву на поживне середовище.

При виявленні гранульом у нирках тварин, що вимушено забиті, штам вважають слабо-вірулентним. Такі штами можуть викликати загибель у тварин лише через 20-30 днів після зараження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Ариевич, А.М. Поверхневі дріжжеві ураження шкіри і слизових оболонок. М.: Медгіз, 1949. С. 67-70.

Методика мікологічного дослідження замороженої сперми бугаїв-плідників, яка застосовується при штучному осіменінні. К.,2002. С.16

Правила відбору зразків паталогічного матеріалу, крові, кормів, води та пересилання їх для лабораторного дослідження. К.,1997. С.35

ДНАОП 2.1.20 – 1.03-99 «Правил охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини».

ДСП 9.9.5.03599 «Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності».

Саттон Д, Фотергілл А, Ринальди М. Визначення патогенних та умовнопатогенних грибів. М., 2001. С. 468.

Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol. 2005 Feb;43 Spec No:65-84. PMID: 15765060.

JEFFREY M. JONES. Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Jan. 1990, p. 32-45 Vol. 3, No. 10893-8512/90/010032

Amy L Leber. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th Edition (2016). ASM Press, Washington, DC.

Procop, G. W., & Koneman, E. W. (2016). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (Seventh, International edition). Lippincott Williams and Wilkins.

Tille, P. (2017). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology (14 edition). Mosby.

ДОДАТОК А



Рис. 1. Макроморфологія колоній культури грибів *Candida albicans* на середовищі Сабуро (7 діб). Ріст за температури 30°C .

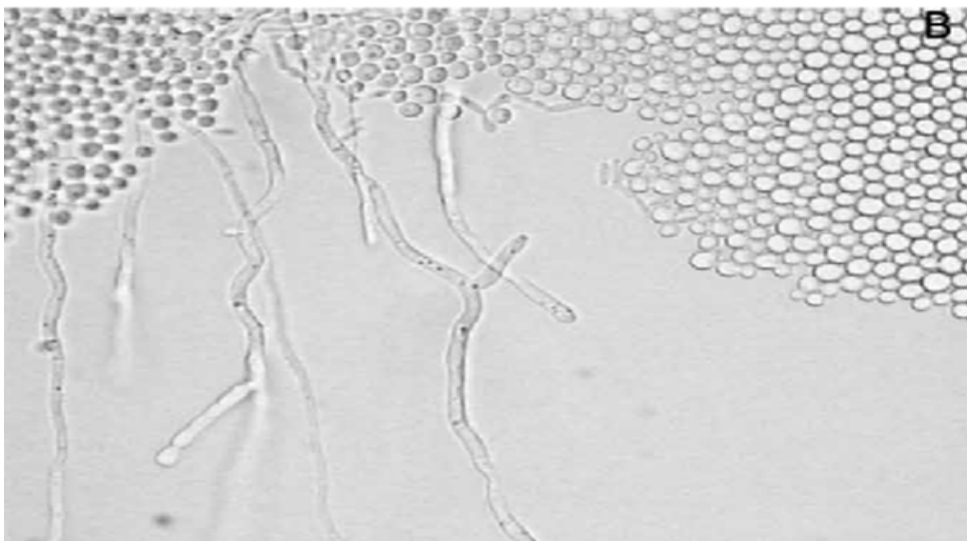


Рис. 2. Мікроморфологія *Candida albicans* (B) на кукурудзяному агарі (400).

ДОДАТОК В

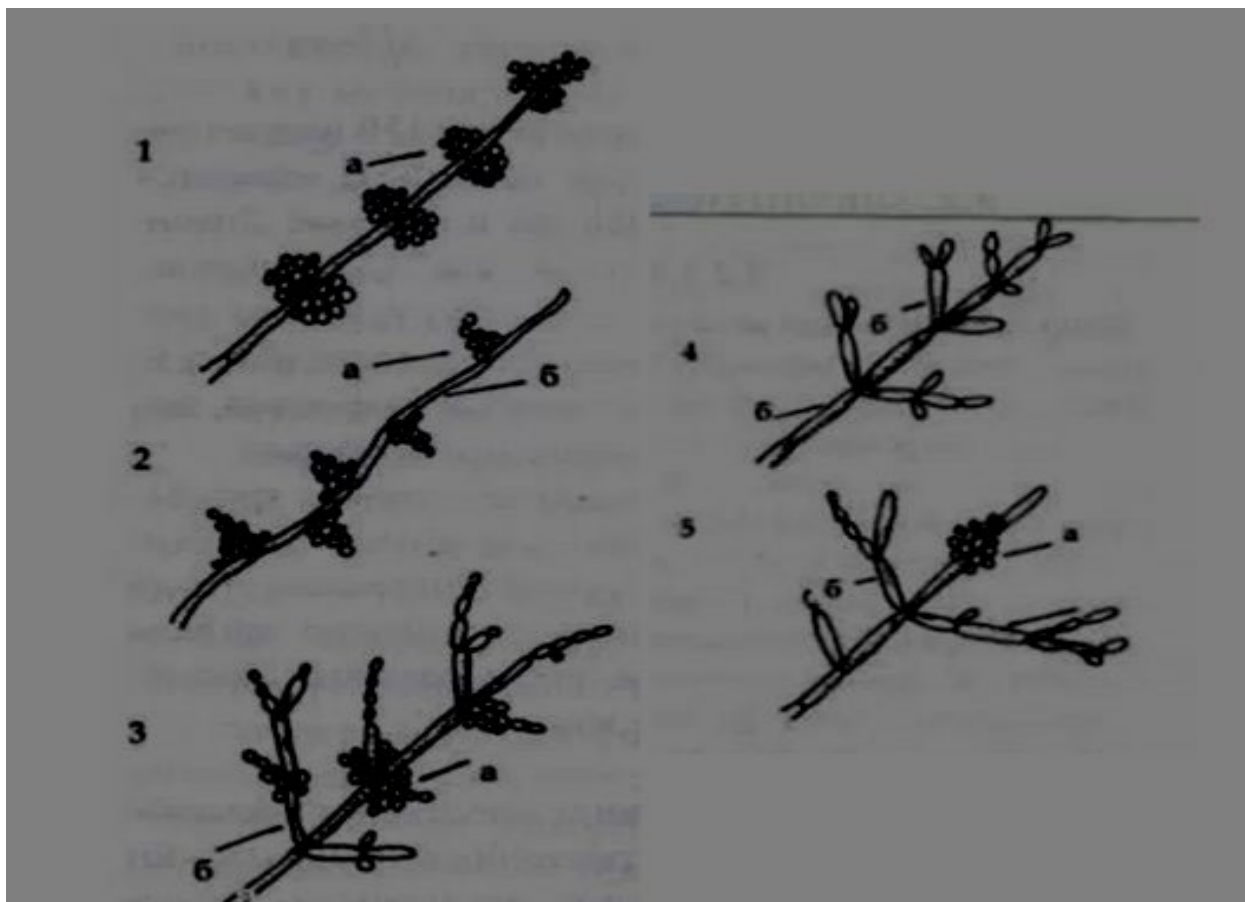


Рис. 1. Типи росту грибів роду *Candida spp.* на поживних середовищах.

1. *Mycotorula*. (*Шаровидний тип*) Круглі вертицили утворені шаровидними бластоконідіями;
2. *Mycotoruloides* (*Криловидний тип*) Криловидні вертицили, утворені бластоконідіями і розміщені на перетяжках псевдоміцелію з різних боків;.
3. *Candida* (*Ланцюжковий тип*) Гілки псевдоміцелію закінчуються ланцюжками бластоконідій
4. *Mycocandida* (*Рудиментарний тип*) Гілки псевдоміцелію утворюють фігуру у вигляді «ялинки». Поява бластоконідій затримується
5. *Blastodendrion* (*Деревовидний тип*) Псевдоміцелій, утворений поліморфними клітинами, утворює «деревце». Шаровидні

вертицили можуть бути відсутні.

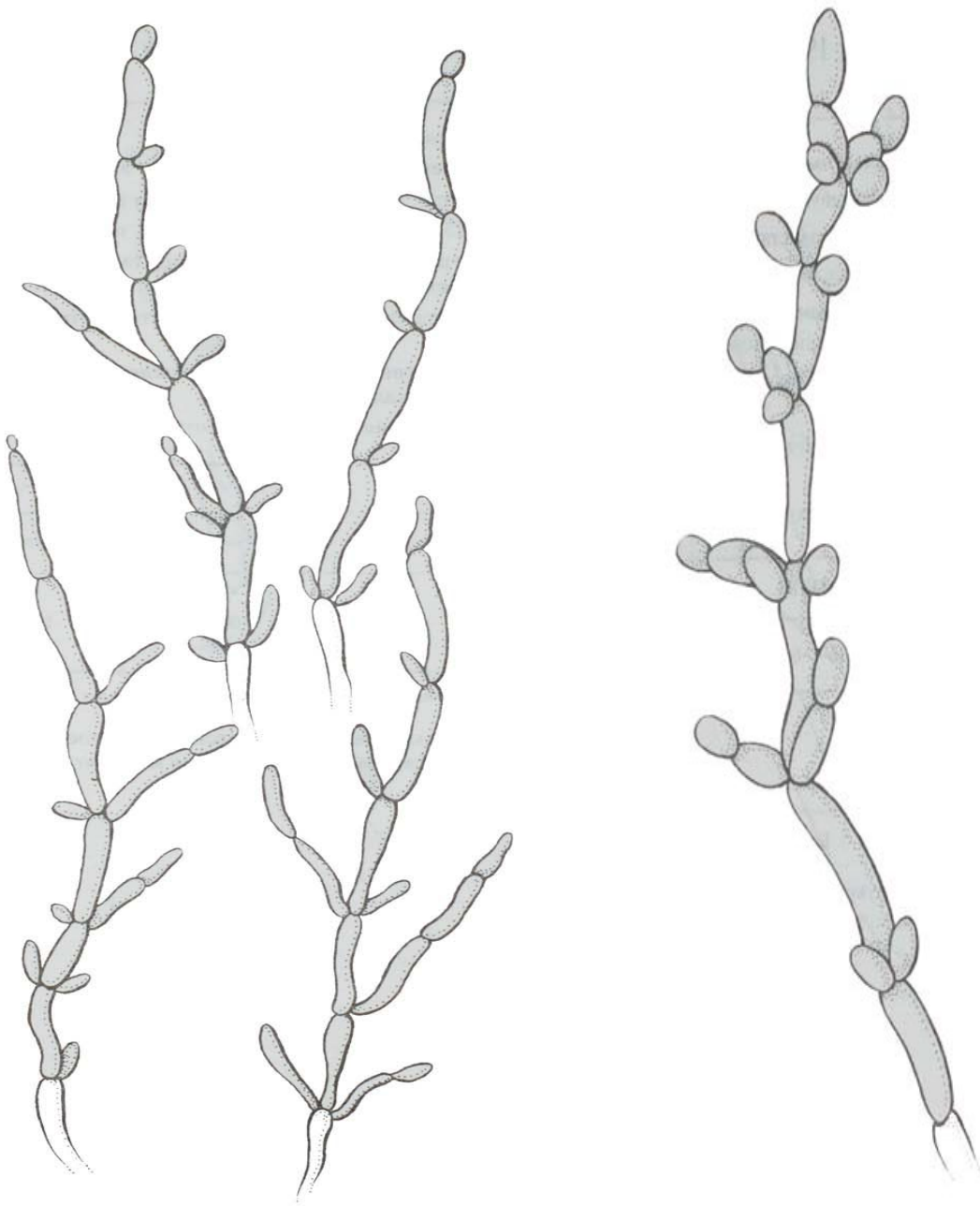


Рис.2. Мікроморфологія штамів на кукурудзяному середовищі (*C.kefyri* Псевдогіф; *C.guilliermondii* Псевдогіфи (шкала 10 мкм)

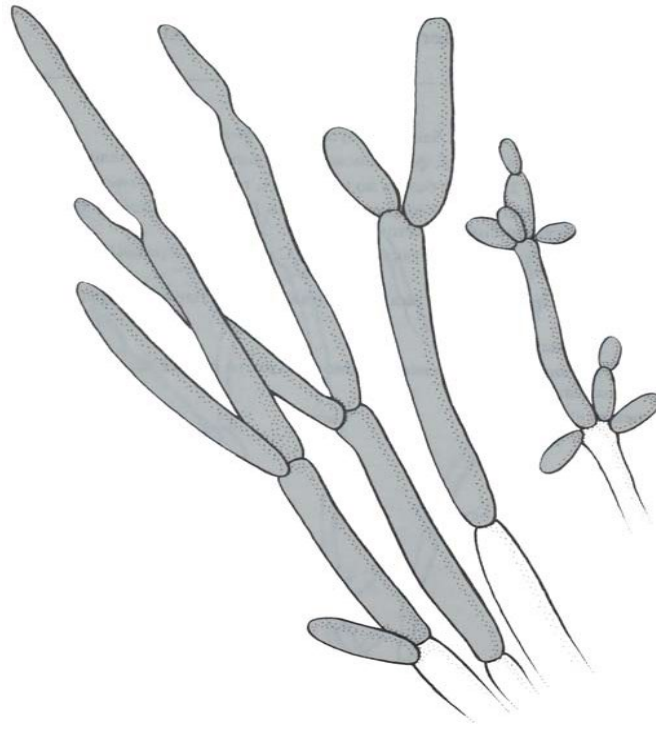


Рис.3. *S.krusei* Псевдогіф (шкала 10 мкм)

ЧЕЧЕТ Ольга Миколаївна
кандидат ветеринарних наук, директор ДНДІЛДВСЕ,

ШУЛЯК Світлана Валеріївна,
кандидат ветеринарних наук, завідувач науково-дослідного хіміко-
токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ,

ПІЛЬКЕВИЧ Наталія Ярославівна,
провідний лікар ветеринарної медицини лабораторії визначення мікотоксинів
науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ,

МАРЧЕНКО Таїсія Володимирівна,
молодший науковий співробітник лабораторії ELISA тест та визначення
мікотоксинів науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ,

КУПРИЧ Ольга Миколаївна,
провідний лікар ветеринарної медицини лабораторії визначення мікотоксинів
науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ,

ЛІНІЙЧУК Наталія Василівна,
Начальник лабораторії рідинної хроматографії науково-дослідного хіміко-
токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ.

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА КАНДИДАМІКОЗІВ

В авторській редакції

Підписано до друку __.__.____ р. Формат _____
Папір друк. № 2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ____
Тираж _____ прим. Зам. №__

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видавця)