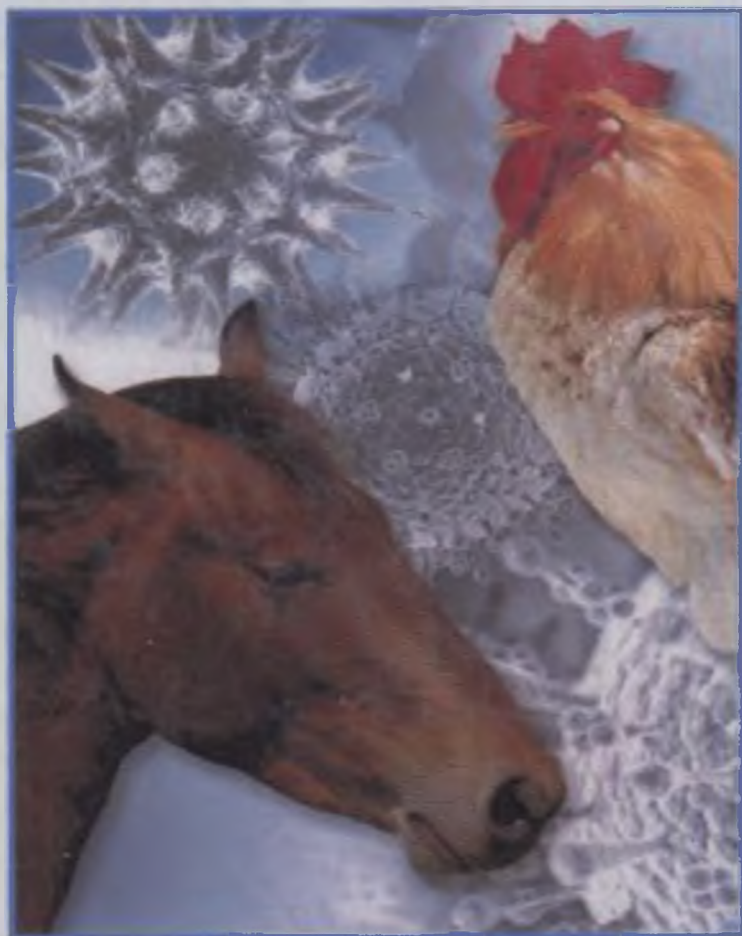


ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

ВЕТЕРИНАРНАЯ
МЕДИЦИНА



П. И. Барышников, В. В. Разумовская



616.9
Λ 12

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Составители:

П. И. Барышников,

В. В. Разумовская

Издание второе, исправленное

ДОПУЩЕНО

Министерством сельского хозяйства РФ в качестве учебного пособия
для студентов вузов, обучающихся по направлению подготовки
(специальности) «Ветеринария»

ДОПУЩЕНО

УМО вузов РФ по образованию в области ветеринарии и ветеринарии
в качестве учебного пособия для студентов вузов, обучающихся
по направлению подготовки (специальности) «Ветеринария»
(квалификация (степень) «Ветеринарный врач»)



СПЕЦИАЛЬНЫЙ ЦЕНТР - МОСКВА - КРАСНОДАР - 2016

SDVU Arboret-
resurs markazi
INV № 17/980

ББК 48.7я73

Л 12

Л 12 Лабораторная диагностика вирусных болезней животных / Сост. П. И. Барышников, В. В. Разумовская: Учебное пособие. — 2-е изд., испр. — СПб.: Издательство «Лань», 2015. — 672 с.: ил. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-1882-4

Учебное издание содержит действующие методические указания, наставления и инструкции по лабораторной диагностике вирусных болезней животных, утвержденные Министерством сельского хозяйства СССР, РФ и Россельхознадзором РФ. Документы систематизированы по видам животных, в большинстве прошли многолетнюю апробацию в Алтайской краевой ветеринарной лаборатории и включены в «Перечень нормативной документации, разрешенной для использования в государственных ветеринарных лабораториях при диагностике болезней животных, рыб, пчел, а также контроля безопасности сырья животного и растительного происхождения» (по состоянию на июль 2011 г.). Приводятся предметный указатель и библиографический список.

Предназначено для студентов, обучающихся по специальности «Ветеринария» и направлению «Ветеринарно-санитарная экспертиза», ветеринарных врачей и лаборантов ветеринарных лабораторий.

ББК 48.7я73

Рецензенты:

И. И. ГУСЛАВСКИЙ — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры микробиологии, эпизоотологии, паразитологии и ВСЭ Алтайского государственного аграрного университета;

В. И. ПЛЕШАКОВА — доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой ветеринарной микробиологии, вирусологии и иммунологии Омского государственного аграрного университета им. П. А. Столыпина;

В. А. СИНИЦЫН — доктор ветеринарных наук, зав. отделом ФГБУ «Новосибирская межрегиональная ветеринарная лаборатория».

Обложка
Е. А. ВЛАСОВА

© Издательство «Лань», 2015

© Коллектив авторов, 2015

© Издательство «Лань»,
художественное оформление, 2015

Общая часть
Особенности морфологии и строения микроорганизмов

Микробы — это в основном одноклеточные бесхлорофилльные организмы прокариотического типа. По форме различают шаровидные, палочковидные и извитые микробы (рис. 1).

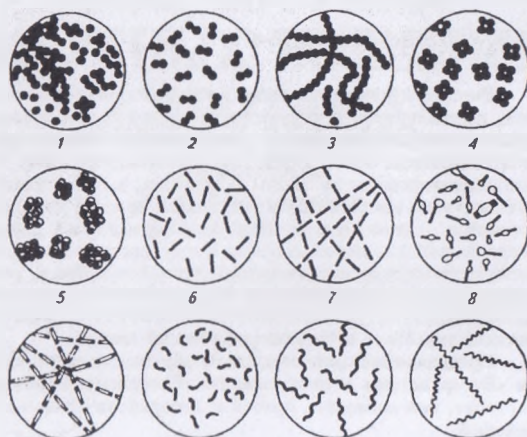


Рис. 1. Основные формы микроорганизмов (схема): шаровидные: 1 - стафилококки, 2 - диплококки, 3 - стрептококки, 4 - тетракокки, 5 - сарцины; палочковидные: 6 - бактерии, 7 - стрептобактерии, 8 - бациллы, 9 - стрептобациллы; извитые: 10 - вибрионы, 11 - спириллы, 12 - спирохеты.

Палочковидные, или цилиндрические, формы принято делить на бактерии и бациллы. *Бактерии* — палочковидные формы, не образующие спор (пишут *Bact*, например *Bact. acetii*). *Бациллы* — палочковидные формы, образующие споры (пишут *Bac*, например *Bac. subtilis*). Бактерии и бациллы бывают разными по форме и размерам. Концы палочек чаще закруглены, но могут быть срезаны под прямым углом (возбудитель сибирской язвы), иногда сужены. У мелких бактерий разница между длиной и шириной невелика; но внешнему виду они напоминают кокки, в связи с чем такие формы получили название *коккобактерии* (возбудитель бруцеллеза).

Спорообразующие микроорганизмы окрашиваются в основном по Граму положительно. Большинство из них имеют палочковидную форму и лишь *Sporosarcina* — шаровидную.

Среди палочковидных форм, образующих споры, различают бациллы и кластридии. Бациллы, за исключением *Bac. anthracis*, подвижны. Бациллы — аэробы. У бацилл споры не превышают толщины вегетативной клетки. Кластридии — анаэробы. Споры толще вегетативной клетки. Такие формы напоминают веретено, ракетку, лимон, барабанную палочку. Кластридии принимают участие во многих процессах в природе. Являются возбудителями анаэробных инфекций. Вызывают аммонификацию белковых веществ, мочевины. Разлагают фосфорорганические соединения. Фиксируют молекулярный азот и др.

Палочки, как и кокки, могут располагаться попарно или цепочкой. При соединении бактерий попарно образуются *диплобактерии*, при таком же соединении бацилл — *диплобациллы*. Соответственно образуются *стрептобактерии* и *стрептобациллы*, если клетки располагаются цепочкой. Тетрад и пакетов палочковидные формы не образуют, так как они делятся в одной плоскости, перпендикулярной продольной оси. Термин «бактерии» применяют для обозначения палочковидных форм, не образующих спор, и это правильно, в то время как многие авторы используют его как собирательное название разных микроорганизмов. Мы считаем, что вместо «бактерии» следует применять слово «микроорганизмы», или кратко «микробы».

Извитые формы микробов определяют не только по длине и диаметру, но и по количеству завитков. *Вибрионы* напоминают по форме запяту. *Спириллы* — извитые формы, образующие до 3-5 завитков. *Спирохеты* — тонкие длинные извитые формы с множеством завитков. Они занимают промежуточное положение между бактериями и простейшими. *Микобактерии* — палочки с боковыми выростами (возбудители туберкулеза, паратуберкулеза). *Коринебактерии* напоминают микобактерии, но отличаются от них образующимися на концах утолщениями и включениями зерен в цитоплазме (дифтерийная палочка). *Нитчатые* бактерии — многоклеточные организмы, имеющие форму нити. *Миксобактерии* — скользкие микробы, по форме напоминающие палочки или веретено. *Простекобактерии* могут быть треугольной или иной формы. У некоторых из них лучевая симметрия. Свое название такие организмы получили по наличию остроконечных выростов — простек. Размножаются они делением, или почкованием. Так, у треугольных форм на одной из вершин образуется почка, которая при достижении размеров материнской клетки отделяется. С помощью простек, расположенных на двух других вершинах, происходит улавливание пищи. Простекобактерии обычно неподвижны; подвижные формы образуют круговые движения. Спор не обра-

зуют, по Граму не окрашиваются. Растут на картофельной среде (агаре) при температуре 28 °С.

Размеры микробов. Микробы — микроскопические организмы. Их размеры определяются в микрометрах (мкм) (10^{-6} м по системе СИ). Диаметр шаровидных форм 0,7-1,2 мкм; длина палочковидных 1,6-10 мкм, ширина 0,3-1 мкм. Вирусы — еще более мелкие существа. Их размеры определяются в нанометрах ($1 \text{ нм} = 10^{-9}$ м).

Примерные размеры некоторых микробов, мкм

Микробы	Длина	Ширина
Сибиряквенная бацилла	4,0-8,0	1,0-1,5
Картофельная бацилла	3,0-10,0	0,7-1,0
Ацидофильная бактерия	4,0-9,0	0,6-0,9
Эшерихии	1,5-4,0	0,5-0,8
Туберкулезные бактерии	2,4-4,0	0,3-0,5
Бруцеллы	2,0-4,0	0,3-0,4
Стафилококки	0,9	0,9

Актиномицеты (лучистые грибы) – Actinomycetes, одноклеточные грам (+) бактерии. Тело (мицелий) состоит из тонких длинных гиф (нитей), которые бывают прямыми или спиралевидными. На плотных питательных средах актиномицеты образуют субстрат, врастающий в среду и воздушный мицелий. Встречаются палочковидные и кокковидные формы. Строение их аналогично грам (+) бактериям.

Размножаются при помощи спор (конидий), которые при благоприятных условиях прорастают в вегетативные клетки. Отдельные виды синтезируют пигменты: розовый, желтый, синий и др. Обитают везде. Играть важную роль в круговороте веществ в природе, образовании почвы и её плодородии, разлагают органические субстраты.

Актиномицеты служат продуцентами антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов. Большинство их сапрофиты, есть патогенные: возбудитель актиномикоза КРС (*Actinomyces bovis*).

Микоплазмы (Mycoplasmatales) самые мелкие бактерии, спор не образуют, неподвижны, грам (-), без клеточной стенки, её роль выполняет трёхслойная цитоплазматическая мембрана. В цитоплазме располагаются рибосомы, нуклеоид, стеринны. Они полиморфны, отмечают шаровидную, зернистую, нитевидную, кольцевидную формы. Микоплазмы проходят через бактериальные фильтры и растут на сложных средах (Эдварда) не содержащих живые клетки, они занимают промежуточное положение между бактериями и вирусами. На плотных средах растут в виде "яичницы-глазуньи". Встречаются патогенные: *M. bovis* (КПП КРС, КПП коз и овец, респираторный микоплазмоз птиц), а также сапрофиты.

Риккетсии (Rickettsiae), **хламидии** (Chlamydia) - облигатные внутриклеточные паразиты, плеоморфные грам (-) бактерии, имеют форму коротких палочек с закруглёнными концами и кокков, размером 0,2-0,6×0,4-2 мкм и более. Клеточная стенка содержит пептидогликан, цитоплазматическая мембрана высоко проницаема. Имеют рибосомы, нуклеоид, размножаются в цитоплазме хозяина поперечным делением, нитевидные формы - дроблением. К патогенным для животных относятся возбудители Ку-лихорадки, гидроперикардита крупного рогатого скота и вызывают хламидиозы у животных и человека.

Вирусы. В 1892 г. русским ботаником Д. И. Ивановским был открыт возбудитель табачной мозаики. Им оказался организм, проходящий через бактериальные фильтры и способный заражать здоровые растения. Ученый назвал возбудителя вирусом, что означает яд. На самом деле это была не инфекционная жидкость, а плотная частица (корпускула), как отмечал Д. И. Ивановский. Ф. Леффлер и П. Фрош случайно обнаружили, что вирус ящура проходит через фильтры С. Китасато. При исследовании фильтрата было обнаружено, что он так же заразителен, как и исходный материал. В дальнейшем Ф. Леффлер и П. Фрош установили, что заразное начало не только обладает контагиозностью, но и способно размножаться. Таким образом, еще в конце прошлого столетия были открыты вирусы растений и животных, что и положило начало науке вирусологии.

По типу нуклеиновой кислоты, а также биологическим, химическим, физическим свойствам и некоторым другим признакам вирусы разделяют на две большие группы: РНК-содержащие и ДНК-содержащие. В настоящее время вирусы животных объединены в 19 семейств, из них 12 содержат РНК-геномные и 7 — ДНК-геномные вирусы. Односпиральные РНК содержат геномы вирусов следующих 11 семейств: ретровирусов, парамиксовирусов, ортомиксовирусов, рабдовирусов, тогавирусов, буньявирусов, пикорнавирусов, коронавирусов, аренавирусов, калицивирусов, флавивирусов; двуспиральную РНК — семейство реовирусов. Двуспиральные ДНК содержат геномы вирусов 6 семейств: поксвирусов, герпесвирусов, аденовирусов, паповавирусов, иридовирусов, гепаднавирусов; односпиральную ДНК — семейство парвовирусов.

В последние годы обнаружены возбудители, вызывающие новые болезни у человека, животных и растений. Наибольшую известность получили вирусы СПИДа ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусы иммунодефицита обезьян, кошек, крупного рогатого скота и других животных. *Вирус иммунодефицита крупного рогатого скота.* Болезнь была известна в США еще в 1969 г. Возбудитель - вирус - изолирован от коровы с персистентным лимфоцитозом, прогрессирующей слабостью и истощением.

Кроме того, имеются неклассифицированные возбудители, вызывающие медленные инфекции у человека: куру и др. При таких инфекциях патологоанатомические изменения обнаружены в клетках центральной нервной системы. Клинически болезни проявляются нарушением координации движения и слабоумием.

Прионы - новые агенты инфекционных болезней. Открыты нейробиологом Калифорнийского университета в Сан-Франциско (США) Стэили Прузинером. В 1982 г. из пораженного мозга был выделен инфекционный белок с молекулярной массой около 30 кДа. Он представляет собой цепочки аминокислот без оболочки и нуклеиновых кислот. По размерам биологический агент меньше вируса. Выделенный белок не вызывал иммунной реакции, не инактивировался при действии средств, разрушающих нуклеиновую кислоту, не обнаружен под электронным микроскопом. Выделенным белком из мозга больных животных не удалось заразить других особей. Оппоненты отмечают, что не исключена возможность существования трудноуловимого вируса. Такой белок был назван при оном (prio protein).

По предположению С. Прузинера, в зависимости от среды обитания белок подвергается генетической мутации, изменяется его стереоструктура. Он приобретает инфекционные свойства, вызывает гибель нейронов, на их месте образуются ячейки, губчатость, и как результат нарушается нервная система, отсюда и название: губчатая энцефалопатия, или губчатый энцефалит. Структурно измененный белок может заражать нервные клетки, медленно разрушать и нарушать их функцию. Гипотеза С. Прузинера окончательно не доказана. Его оппоненты полагают, что в очищенном белке от больных животных мог сохраниться неуловимый вирус.

За изучение болезнетворного агента, вызывающего губчатую энцефалопатию, или «коровье бешенство», у крупного рогатого скота С. Прузинеру в 1997г. была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Дегенеративные изменения мозга при «куру» на Новой Гвинее, болезни Крейцфельда-Якоби у людей, губчатой энцефалопатии у крупного рогатого скота, известной как «коровье бешенство», скрейпи у овец и коз, трансмиссивной энцефалопатии у норок, а также сходные болезни у лосей, оленей и других животных были известны и раньше. Скрейпи описана в Англии еще в XVIII в. Энцефалопатия норок впервые (1947) установлена на звероводческой ферме в США. Таким животным скармливали субпродукты, полученные от овец, больных скрейпи.

В нашей стране медленные инфекции установлены сотрудниками ВИЭВ в 1981-1982гг. В последующее десятилетие проведено более детальное изучение скрейпи у овец. Установлено, что инкубационный период не менее 9 месяцев. Болеют взрослые животные (от 1 до 4 лет). Течение болезни длительное (от 4-6 нед до нескольких месяцев). Клиника болезни: беспокойство, зуд, скрежет зубами, дрожь. Температура тела в пределах нормы. Летальность 100%-ная. Поражается головной, реже спинной мозг — дистрофия нервных клеток. Диагноз ставится на основании гистологических и клинико-эпизоотологических данных.

Вириды (открыты Т. О. Дайнером, 1971) представляют собой молекулы короткой суперспирализованной РНК без белковой оболочки с молекулярной массой 100-130кДа. Вызывают болезни картофеля, цитрусовых, огурцов, томатов, хризантем и других растений.

Примером вирусов, содержащих РНК, могут быть возбудители гриппа, бешенства, стоматита, энцефалита, ящура, саркомы Роуса (Рауса) и т. д. ДНК содержат возбудители натуральной оспы, фаги и др.

Американский ученый У. Стэнли в 1935 г. выделил вирус табачной мозаики в чистом кристаллическом виде. Чтобы получить столовую ложку микроскопических кристаллов вируса, ученому пришлось пропустить через мясорубку тонну пораженных растений.

Характеристика вирусов. Вирусы — простейшие объекты живой природы, неклеточные формы жизни, проникают в клетки высокоорганизованных существ, где производят себе подобных. Вирусы очень малы и измеряются в нанометрах (нм). Размеры вирусов определяют по величине пор фильтров, через которые проходит материал, суперцентрифугированием и в электронном микроскопе. Наиболее хорошо изучен вирус табачной мозаики (ВТМ). Он имеет форму шестигранной призмы длиной 300 нм, размер его в поперечнике 15-18 нм, т.е. длина вируса в 20-16,7 раза больше ширины. Внутри зрелого вируса (вириона) находится односпиральная нуклеиновая кислота (РНК), а на поверхности - белковая оболочка (капсид), и все это заключено в мембрану. Капсид состоит из субъединиц, называемых капсомерами. У ВТМ капсомеры располагаются как ступени винтовой лестницы (спиральная симметрия). Содержание белка достигает 95 % (по массе), нуклеиновой кислоты -5%. Несмотря на то, что нуклеиновой кислоты сравнительно немного, в ней заключены основные свойства вируса.

Нуклеиновая кислота в вирусе расположена в виде спирали. Двуспиральное строение соли ДНК было установлено в Кавендишской лаборатории Кембриджского университета в 1953 г. Д. Уотсоном (США) и Ф. Криком (Великобритания). В середине 1974 г. с разницей в две недели

опубликованы данные А. Рича (США) и А. Клуга (Великобритания) о трехмерном строении тРНК (фенилаланиновой), которые были получены также на основании рентгеноструктурного анализа.

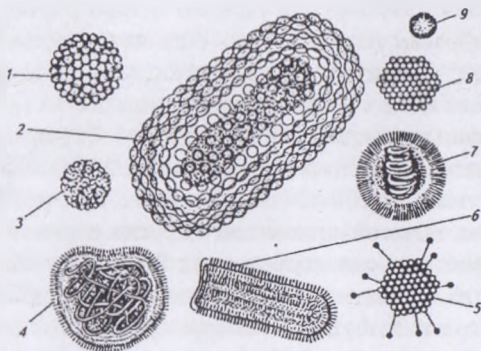


Рис. 2. Формы и относительные размеры некоторых вирусов:
1 - лейкемии кур; 2 - оспы; 3 - вызывающий борадавки; 4 - кори; 5 - аденовирус;
6 - бешенства; 7 - гриппа; 8 - герпеса; 9 - полиомиелита

Вирусы не растут на искусственных питательных средах, способны размножаться только внутри клеток восприимчивого организма или в культуре тканей. Вне организма живой клетки вирус инертен, в таком состоянии он сохраняется длительное время. Жизнь вируса начинается лишь после проникновения в живую клетку. У него отсутствуют способы размножения, свойственные другим микробам (деление, почкование). В клетке в течение короткого времени производится (репродуцируется) большое количество копий. Для этого клетка мобилизует все свои ресурсы и ферментативный аппарат (полимеразы), после чего погибает.

Следовательно, вирусы — это такие биологические образования, у которых отсутствуют клеточное строение и собственный обмен веществ. Они совмещают в себе признаки существа и вещества: неактивны (метаболически) вне живых клеток и в то же время проявляют признаки жизни (репродуцируются) внутри их. Содержат одну нуклеиновую кислоту (РНК или ДНК), где сосредоточена генетическая информация. Обладают наследственностью и изменчивостью, благодаря чему сохраняются в биосфере Земли.

Бактериофагами называют вирусы бактерий. Впервые в 1898г. Н.Ф. Гамалея описал лизис (растворение) бактерий под действием агента, вы-

деленного из этих бактерий. В 1917г. Ф.Д. Эррель из кала больного дизентерией человека выделил фильтрующийся агент, который лизировал культуру возбудителя дизентерии и назвал его бактериофагом (греч. phagos – пожирающий), а сам феномен лизиса культуры – бактериофагией. Бактериофаги широко распространены в почве, воде, экскрементах больных и здоровых животных, человека и обнаружены у 100 видов бактерий. Хозяевами бактериофагов являются эшерихии, сальмонеллы, стафилококки, стрептококки, микобактерии, листерии, коринебактерии и др.

Детально изучена структура фагов *E. coli*, состоит из головки и отростка, по форме напоминает головастиков. Головка фага состоит из оболочки и нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). Фаги обладают выраженной специфичностью. По характеру взаимодействия с бактерией фаги бывают вирулентные при проникновении в клетку бактерий размножаются в ней и вызывают лизис, умеренные фаги не вызывают лизиса, а остаются в состоянии лизогении.

По степени специфичности фаги разделяют на 3 группы: 1) полифаги – лизируют родственные бактерии; 2) монофаги – бактерии одного вида; 3) фаговары – только определенные варианты данного вида бактерий. Взаимодействие фага с клеткой протекает в 5 стадий: 1 ст. Адсорбция фага и закрепление его на бактериальной клетке (стенке), в которой имеются специфические рецепторы. 2 ст. Проникновение ДНК фага через дистальный конец отростка. 3 ст. Биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты РНК и белков капсида, которые участвуют в биосинтезе фаговой ДНК. 4 ст. Морфогенез фага – формирование зрелых частей фага. 5 ст. Выход фаговых частиц из клетки. Он происходит путем лизиса зараженных бактерий фаговым лизоцимом. При контакте умеренного бактериофага с микробной клеткой последняя не лизируется и становится носителем бактериофага. Это явление называется лизогенией, а бактериальные культуры, обладающие этим свойством, называются лизигенными. Бактериальная культура, образующая один вид фага, является монолизогенной, несколько видов фагов – полилизогенной. Фаг, лизирующий клетку-хозяина, называется умеренным.

Применение. Бактериофаги нашли широкое и разнообразное применение в ветеринарной практике. Применяют их для терапии и профилактики различных инфекционных болезней: гнойные и анаэробные, сальмонеллез, колибактериоз молодняка сельскохозяйственных животных, пуллороз цыплят и др. Высокая специфичность фагов позволяет использовать их для индикации и идентификации бактерий, для фаготипирования. С этой целью используют реакцию нарастания титра фагов, так же применяют для дифференциации бактериальных культур: сибиреязвенных,

стафилококковых, рожистых, сальмонеллёзных и др. Биологическая промышленность выпускает в жидком виде коли-гертерфаг против сальмонеллеза и колибактериоза телят, сибиреязвенные бактериофаги, фаг-ВНИИВВиМ.

Плесневые и другие микромицеты. Микромицеты (микрोगрибы) — низшие эвкариоты — представляют собой большую группу организмов, совмещающих в себе признаки животных и растений. Как и животные, они лишены зеленых пигментов — хлорофиллов, с помощью которых осуществляется фотосинтез; содержат цитохромы — железосодержащие белки, окисляющиеся и восстанавливающиеся в процессе дыхания. Гетеротрофы в качестве источника углерода используют готовые органические вещества. В клеточных стенках содержат характерный для насекомых хитин. Вместо крахмала накапливают гликоген. В процессе превращения азотистых соединений они образуют мочевины.

Как и растения, обладают способностью к неограниченному верхушечному росту, имеют ригидную клеточную стенку, высшие грибы — поперечные перегородки (септы) и др. Для большинства микромицетов характерно наличие грибницы, или мицелия. Низшие грибы имеют одноклеточный мицелий, высшие — многоклеточный. Размножаются спорами, почкованием, фрагментами мицелия, а также путем слияния половых клеток — гамет.

Многие исследователи считают, что грибы представляют собой самостоятельную группу (царство) организмов. В последнее время на основании генетического анализа мутаций 22 видов ДНК установлено, что грибы ближе к животному миру. В связи с этим определение грибов «как растение без цветов и хлорофилла», возможно, придется заменить определением «животное без гемоглобина».

Микромицеты — аэробы, нетребовательны к питательным веществам, растут преимущественно на поверхности различных субстратов, выдерживают низкие температуры — встречаются в холодильных камерах и других местах. Они принимают участие в превращении веществ в природе. Являются продуцентами антибиотиков, ферментов, органических кислот и других соединений. Среди них встречаются как сапрофиты, так и паразиты.

Систематика организмов, в том числе и грибов, периодически совершенствуется. В настоящее время большинство микологов считают, что развитие грибов шло разными эволюционными путями, в результате чего сформировались два отдела. У представителей отдела Oomycota, как и у растений, в стенках клеток содержится целлюлоза. Подвижные стадии имеют один или два жгутика. У настоящих грибов (отдел Eumycota) в

стенках клеток содержится хитин. Они составляют более 95 % всех грибов и объединены в пять классов: 1) *хитридиемицеты* (Chytridiomycetes); мицелий слабо развитый, одноклеточный; подвижные стадии имеют один бичевидный жгутик; 2) *зигомицеты* (Zygomycetes); мицелий несептированный, хорошо развитый; размножение осуществляется чаще спорангиоспорами (эндоспорами); 3) *аскомицеты*, или сумчатые грибы (Ascomycetes); мейоспоры (споры полового размножения) образуются внутри специальных клеток — сумок, или асков; митоспоры (споры полового размножения) представлены конидиями; 4) *базидиомицеты* (Basidiomycetes); имеют хорошо развитый многоклеточный мицелий; митоспоры представлены конидиями; мейоспоры образуются на специальных клетках — базидиях; к этому классу относится большинство съедобных грибов — макромицетов; 5) *дейтеромицеты* (Deuteromycetes); размножаются бесполовым путем — конидиями; мицелий септированный; они представляют собой «бывшие» аскомицеты, или базидиомицеты, которые в процессе эволюции утратили половые спороношения; многие из дейтеромицетов — паразиты животных, растений и человека.

Рассмотрим представителей некоторых классов. **Зигомицеты** — одноклеточные организмы с сильно развитым мицелием, размножаются половым и бесполовым путем: бесполое размножение происходит с помощью спор, развивающихся на спорангиях; при половом процессе (оогамии) образуются зигоспоры, или ооспоры. Представитель этого класса — род мукор (головчатая плесень), которую можно встретить на хлебе, овощах, навозе, а также в сырых помещениях. Рост гриба напоминает двухсуточную культуру на сусле-агаре. Многие мукоровые сбраживают углеводы с образованием спирта и органических кислот, используются в пищевой промышленности.

У *муко́ра* (семейство Mucoraceae) от одноклеточного мицелия отходят одноклеточные гифы — спорангиеносцы, которые заканчиваются шаровидным утолщением — спорангием (плодовым телом). Внутри его находятся эндоспоры, спорангиоспоры. При разрыве спорангия споры выходят во внешнюю среду и, попадая в благоприятные условия, дают начало новой плесени.

Половая стадия размножения у низших грибов начинается с формирования половых клеток, или гамет, которые образуются в дифференцированных клетках — гаметангиях. Слияние гамет может происходить как в гаметангиях, так и вне их. Если женская клетка неподвижна, то мужская (антеридия) проникает в оогоний (женский гаметангий) и оплодотворяет ее; если подвижны обе гаметы (обычно у водных грибов), то слияние может происходить вне гаметангиев.

Аскомицеты — сумчатые грибы. Представителем этого класса являются **дрожжи** — безмицелиальные, не образующие хлорофилла одноклеточные грибы. Внешне — это довольно крупные (до 10 мкм) овальные или округлые клетки с дифференцированным ядром. В их цитоплазме можно встретить одну-две вакуоли, гликоген, волютин, капли жира, удлиненные тельца — митохондрии. Дрожжи широко распространены в природе, встречаются на плодах и листьях многих растений (виноградная лоза, фруктовые деревья).

Почкование — наиболее распространенный способ размножения дрожжей — характеризуется образованием на поверхности зрелой клетки одного или нескольких бугорков (почек), в которые переходит часть цитоплазмы и ядра. Перетяжка (место сужения) между материнской и дочерней клетками постепенно уменьшается, и затем наступает такой момент, когда дочерняя клетка отделяется и начинает самостоятельную жизнь. На поверхности материнской клетки после отделения почки остается дочерний шрам, который состоит из хитина и представляет собой округлое выпячивание с приподнятым ободком по периферии. Деление у дрожжей происходит так же, как и у других микробов. Клетка (цитоплазма и ядро) делится на две равные части. Посередине клетки от периферии к центру начинает расти клеточная стенка. К концу деления новая клеточная стенка удваивается и расщепляется — образуются две дочерние клетки. При половом размножении после слияния (копуляции) двух дрожжевых клеток оболочка между ними растворяется. Оплодотворенное ядро делится 2 или 3 раза, и образуются четыре или восемь аскоспор; такая клетка превращается в аску (сумку) со спорами. Аскоспоры образуются при неблагоприятных условиях (недостатке питательных веществ, обильном поступлении кислорода) и представляют собой клетки с толстыми оболочками, устойчивыми к неблагоприятным факторам среды. После прорастания споры начинают размножаться бесполовым путем.

Среди дрожжей имеются сапрофиты и паразиты. Сапрофиты используют в бродильной промышленности и в животноводстве как источники белка. Паразиты вызывают болезни у животных — бластомикозы.

Дейтеромицеты (несовершенные грибы) имеют многоклеточный мицелий, размножаются с помощью оидий и конидий. Половой способ размножения не установлен. Грибы этого класса широко распространены в природе: насчитывается около 25 тыс. видов. К дейтеромицетам относят грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*.

Род *аспергилл*, или леечная плесень (семейство *Moniliaceae*). Типичным представителем этого рода является гриб *Aspergillus niger*.

Мицелий септирован — разделен перегородками (септами) с отверстиями, благодаря чему осуществляется связь между клетками. Таким образом, тело гриба представляет собой систему трубочек (гиф), по которым передвигается цитоплазма с множеством ядер. От мицелия отходит одноклеточный конидиеносец с утолщением на конце. На головке конидиеносца веерообразно расположены короткие стеригмы, напоминающие шипы, от которых отшнуровываются конидии, или экзоспоры. Конидии расположены радиально и напоминают струйки воды, выходящие из лейки, отсюда второе название гриба. Конидии леечной плесени бывают окрашены в разные цвета, но чаще встречаются черные (*Aspergillus niger*). Аспергиллы используются для приготовления лимонной, щавелевой и других кислот. Некоторые аспергиллы — продуценты антибиотиков (аспергиллин, фумигации, клавацин). Среди аспергилловых грибов имеются возбудители заразных болезней.

Род *пеницилл*, или кистевик (семейство *Penicillaceae*). Мицелий и конидиеносцы многоклеточные. В верхней части плодоносящее тело разветвлено в виде кисти, откуда и второе название плесени. Последние сегменты кисти — фиалиды (стеригмы) — заканчиваются конидиями, или экзоспорами. Пеницилловых грибов в природе много. Они составляют около половины всех плесневых грибов. В больших количествах они находятся в почве, на кормах, молочных продуктах, фруктах, а также в сырых помещениях. Чаще встречается зеленая плесень, реже — белая и др. Плесени пенициллиум нотатум и крустозум — продуценты антибиотика пенициллина.

Некоторые виды несовершенных грибов вызывают болезни кожи и волос (трихофития, микроспория, парша и др.). Мицелий таких грибов имеет большое количество хламидоспор (концевых или интеркалярных — по ходу мицелия), артроспоры (сегменты мицелия) и алейрии (конидии).

Род *фузариум* (семейство *Tuberulariaceae*) поражает плоды, овощи и шпакли. Мицелий гриба бывает разных цветов (белый, розовый, сиреневый). Для этой плесени характерны серповидные конидии и одноклеточные микроконидии. Могут образовываться и хламидоспоры. Грибы рода *фузариум* ведут сапрофитический и паразитический образ жизни. Поражая растения, они вызывают болезнь фузариоз. Если такие грибы встречаются на перезимовавшем хлебе, они могут вызывать зearаленонтоксикоз (фузариотоксикоз) (народное название «пьяный хлеб»).

Молочная плесень (*Endomyces lactis*) образует белые бархатистые пленки на поверхности молочных продуктов и квашеных овощей. В результате распада септированного мицелия появляются споры оидии. Это

крупные, чаще прямоугольной формы клетки. Развиваясь на молочных продуктах, гриб снижает кислотность, при этом создаются благоприятные условия для развития других микробов, которые и вызывают их порчу.

Цианобактерии (от греч. *Cyano* — синий) — одни из древних фотосинтезирующих прокариот. Полагают, что они появились на заре формирования Земли. По форме это палочки и кокки, располагаются одиночно или цепочками (в виде нитей). В клеточной стенке содержат муреин, в цитоплазме — нуклеоид, 70 S-рибосомы и другие органеллы прокариот. Иногда образуют слизистую капсулу. Для них характерны движения скользящего типа. Грамотрицательные.

Цианобактерии вездесущие и многочисленны: встречаются в морях, пресных водоемах, почве. Среди них бывают гелиофилы и криофилы. Они могут расти в экстремальных условиях: ледниках Антарктиды, в заполярной тундре, на скалах, в жарких пустынях, в нейтральных или щелочных водах горячих источников. Термофилы могут жить при температуре выше 70°C.

Цианобактерии осуществляют одновременно кислородный фотосинтез и фиксацию молекулярного азота. При кислородном фотосинтезе на свету образуют кислород. Донором электронов при этом является вода. Фиксация молекулярного азота осуществляется в анаэробных условиях, поскольку кислород подавляет действие фермента нитрогеназы. В летние месяцы на поверхности мелких водоемов наблюдается массовый рост микроорганизмов в виде сине-зеленой пленки. При их разложении (гниении) в такой среде создаются условия, благоприятные для развития хемогетеротрофов, в результате чего уменьшается количество растворенного кислорода, а вместе с ним и живых организмов.

Цианобактерии содержат до 70 % белка, образуют биологически активные вещества, ферменты. Поглощая большие количества диоксида углерода (CO₂), они предотвращают развитие парникового эффекта на планете.

Формы взаимодействия микро и макро организмов

Симбиоз — длительное сожительство, обычно приносящее взаимную пользу. Так, молочно кислые бактерии желудочно-кишечного тракта образуют молочную кислоту, которая сдерживает развитие гнилостной микрофлоры. В рубце жвачных животных обитает огромное количество микробов, которые активно участвуют в процессах пищеварения. Происходит расщепление клетчатки, крахмала, синтезируется бактериальный белок.

Комменсализм – форма сожительства, при котором один организм живет за счет другого, не причиняя ему какого либо вреда. К комменсалам относится большинство представителей нормальной микрофлоры, но некоторые из них при снижении резистентности хозяина могут вызвать эндогенную инфекцию.

Паразитизм – особый и распространенный тип сожительства, при котором один хозяин (паразит) живет за счет другого (хозяина) и причиняет ему вред, вызывая инфекционную болезнь. Такие микробы называют патогенными (болезнетворными). Входят бактерии, вирусы, грибы, риккетсии, микоплазмы, хламидии. Все микробы – паразиты происходят от свободно живущих сапрофитов, которые используют для питания мертвые органические субстраты.

Антагонизм – продукты жизнедеятельности одних микробов обуславливают гибель других. Антагонизм выражен у актиномицетов, у спорных бацилл (*Bac. Brevis*, *Bac. Subtilis*, *Bac. Mycoides*).

Патогенность, болезнетворность (лат. *Factor pathogenicus*, *factor + pattois* страдание, болезнь + *genesis* рождение, происхождение) – способность микробов паразитировать в организме животного и вызывать инфекционный процесс. По этому признаку все существующие микроорганизмы подразделяют на патогенные, условно-патогенные и сапрофиты. Все возбудители инфекционных болезней являются патогенными, но не все из них способны вызывать инфекционную болезнь, для этого микроб должен обладать вирулентностью. Никто не сомневается в патогенности сибиреязвенной бациллы, между тем, среди культур этого микроба встречаются вирулентные штаммы, не способные вызывать заболевания у овец, кроликов. Бактерии рожи свиней так же относятся к патогенному виду, но есть разновидности этого микроба, когда выделяются из организма здоровых животных свиней, индеек, рыб. Поэтому патогенность индикатор от вирулентности.

Вирулентность – это степень патогенности конкретного микроорганизма. Ее можно измерить. За единицу измерения вирулентности условно приняты летальная и инфицирующая дозы. Минимальная смертельная доза DLM (*Dosis letalis minima*) – это наименьшее количество живых микробов или их токсинов, вызывающее за определенный срок гибель большинства взятых в опыт животных определенного вида. Но поскольку индивидуальная чувствительность животных к патогенному микробу (токсину) различна, то была введена безусловно смертельная доза – DCL (*Dosis certa letalis*), вызывающая гибель 100% зараженных животных. Наиболее точной является средняя летальная доза – LD₅₀, т.е. наименьшая доза микробов (токсинов), убивающая половину 50% животных в опыте.

resurs maxkazi 17

Inv № 371980

Для установления летальной дозы принимают во внимание способ введения возбудителей, массу и возраст подопытных животных и т.д., например: белые мыши 16-18 г., морские свинки 350-400 г., кролики 2 кг. Таким же образом определяют инфицирующую дозу (ID), т.е. количество микробов или токсинов, которые вызывают соответствующую инфекционную болезнь. Высоковирулентные микробы способны вызывать заболевание животного или человека в самых малых дозах. Так 2-3 микобактерии туберкулеза при введении в трахею, вызывают у морской свинки туберкулез со смертельным исходом. Вирулентные штаммы сибиреязвенной палочки, 1-2 клеток могут вызывать смерть у морской свинки, белой мыши и КРС.

Вирулентность зависит от ряда биологических, физических и химических факторов, воздействующих на микробы. Вирулентность можно повысить или понизить искусственными приемами. Длительное выращивание культур вне организма, на обычных питательных средах, при максимальной температуре, добавление антисептических веществ (щелочь, сулема и т.д.) ослабляют вирулентность (опыт Ценковского получил 1 и 2 вакцины сибирской язвы). Пассирование возбудителей инфекционной болезни через определенный вид животного от зараженного к здоровому. Так возбудитель рожи свиней пассируя через организм кролика, ослабляет вирулентность для свиней, но усиливает ее для кроликов. Вирулентность микроорганизмов связана с токсигенностью и инвазивностью.

Токсигенность (гр. *Toxicum* – яд и лат. *Genus* – происхождение) – способность микроба образовывать токсины, которые вредно действуют на макроорганизм, путем изменения его метаболических функций.

Инвазивность (лат. *Invasio* – нападение, нашествие) – способность микроба преодолевать защитные барьеры организма, проникать в органы, ткани и полости, размножаться в них и подавлять защитные силы макроорганизма. Инвазивные свойства патогенных бактерий обеспечиваются за счет микробных ферментов (гиалуронидаза), капсул и других химических компонентов микробов.

Инфекция – (лат. *Infectio* – заражение) это явление, специфической сущностью которого является внедрение и размножение инфекционного агента в макроорганизме с последующим развитием различных форм их взаимодействия – от носительства возбудителя до выраженного проявления болезни.

Инфекционный процесс – комплекс реакций, возникающих в макроорганизме при инфекции и направленных на обеспечение гомеостаза и равновесия с окружающей средой. Инфекционный процесс включает внедрение, размножение и распространение патогенного микроба орга-

низме с одной стороны, и реакцию организма на это действие с другой стороны. Эти реакции выражаются в биохимических, морфологических, функциональных и иммунологических изменениях, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма. Наиболее яркой формой проявления инфекции, инфекционного процесса является **инфекционная болезнь**, которая обусловлена патологическими процессами, вызванными действием возбудителя и характеризуется отдельной клинической картиной.

Характерные особенности инфекционной болезни

Инфекционная болезнь – имеет ряд особенностей, отличающих ее от болезней неинфекционного характера.

Особенности инфекционной болезни:

- I. Инфекционная болезнь вызывается определенным специфическим возбудителем.
- II. Заболевший организм сам становится источником возбудителя инфекции, который выделяется из больного организма и заражает здоровых животных, т.е. инфекционной болезни присущи заразность, микробоносительство.
- III. В больном организме происходят процессы образования специфических антител, в результате этого организм после выздоровления становится в большинстве случаев иммунным, т.е. невосприимчивым к повторному заражению тем же возбудителем.

Инфекционный процесс может протекать бессимптомно, скрытно, латентно (скрытая инфекция). Следствием скрытой инфекции может быть **иммунизирующая субинфекция** – состояние, когда патогенные микробы проникают в организм животного в небольших дозах и неоднократно, вызывают иммунобиологические реакции, выработку антител, но сами при этом погибают. У таких животных не выявляют функциональных расстройств, а после убоя не обнаруживают патологических изменений органов и тканей. **Инфекция бессимптомная** – невидимая, инаппаратная, не проявляющаяся. **Инфекция дремлющая** – латентная, не проявляющаяся клинически. Ее определяют с помощью аллергических, иммунобиологических реакций, микробиологических, вирусологических и патоморфологических исследований. Часто бывает при бруцеллезе, туберкулезе, сальмонеллезе, паратуберкулезе и др.

Инфекционный процесс характеризуется циклическим развитием и включает следующие периоды:

1. Инкубационный.
2. Продромальный.
3. Клинический (разгар болезни).
4. Выздоровление (реконвалесценция).

Инкубационный период – определенный промежуток времени от момента проникновения микроба, до появления первых клинических признаков болезни. При разных инфекционных болезнях он неодинаков: от нескольких дней, месяцев до нескольких лет.

Продромальный период (период предвестников болезни) – характеризуется первыми симптомами: повышением температуры тела, слабостью, угнетением, потерей аппетита. Продолжительность этого периода – от нескольких часов до 4 суток.

Период развития основных клинических признаков (период разгара болезни) – проявляются основные характерные для данной инфекционной болезни признаки (при ящуре – афты, при бешенстве – параличи, при ботулизме – расслабление мышц), угнетение, высокая температура, нарушение дыхания, пищеварения и др.

Этот период сменяется **периодом выздоровления (реконвалесценции)** – постепенно восстанавливаются физиологические функции организма. Клиническое выздоровление при многих инфекционных болезнях не совпадает по времени с освобождением организма от возбудителя. После переболевания инфекционным заболеванием, в одних случаях в результате образования иммунитета организм полностью освобождается от возбудителя, в ряде случаев после выздоровления возбудитель длительное время сохраняется в организме животных. Такое состояние называется микробо или вирусносительством (сальмонеллез, пастереллез, туберкулез и др.). Такие животные представляют опасность, как источник возбудителя инфекции. Бывает микробоносительство, которое не связано с предшествующим переболеванием, оно не сопровождается иммунологической перестройкой и выявляется лишь при бактериологическом исследовании. Это состояние закономерно для условно-патогенной микрофлоры, до момента ее активизации. Например, устойчивые животные могут быть носителями сальмонелл, пастерелл, рожи свиней и др. Возможно кратковременное носительство возбудителя, несвойственного животным данного вида, так вирус ИНАН у свиней, вирус умы свиней у собак. Такие животные могут служить источником возбудителя инфекции.

Течение инфекционной болезни может быть молниеносным, острым подострым, хроническим, abortивным, а форма клинического проявления – типичной и атипичной. Формы проявления болезни характеризуют по

признаку преимущественной локализации патологического процесса (кишечная, легочная и кожная формы сибирской язвы).

Для острого течения болезни, обычно продолжающегося от одного до нескольких дней, характерно бурное проявление типичных клинических признаков. Так могут протекать сибирская язва, ящур, эмкар, бешенство.

Возможно сверхострое (молниеносное) течение, при котором животное погибает через несколько часов, вследствие быстро развивающегося сепсиса или токсемии (сибирская язва, инфекционная энтеротоксемия и браздот овец). Типичные клинические признаки в таких случаях не успевают развиться.

При подостром, более продолжительном течении клинические признаки болезни тоже типичны, но выражены слабее. Однако патологоанатомические изменения характерны. При вспышках рожи или классической чумы свиней, например, отмечают как острое, так подострое течение болезни, что объясняется различиями в резистентности животных и вирулентности возбудителя.

При хроническом течении болезнь может затянуться на месяцы, и даже годы. Клинические признаки слабо выражены, а иногда вообще отсутствуют (при инфекционной анемии лошадей, туберкулезе, бруцеллезе, сапе), что затрудняет диагностику болезни. Такое течение болезнь может принять при снижении вирулентности возбудителя и достаточно высокой резистентности животного.

Не исключаются переходы одного типа болезни в другой. Так, при роже свиней исходом острого или подострого течения болезни может стать хроническая инфекция. Бывают и обострения хронических болезней.

Если комплекс клинических признаков характерен для данной инфекционной болезни, то форму ее проявления характеризуют как типичную. Однако нередки отклонения от типичной картины вследствие легкого переболевания (ангинозная форма сибирской язвы у свиней). Такие формы проявления болезни считают атипичными. В подобных случаях, неполнота клинической картины и стертость клинических признаков затрудняют диагностику. В последние годы случаи атипичного проявления инфекционных болезней (КЧС, ньюкаслской болезни кур, бешенства и многих других) заметно участились. Это связывают с изменениями биологической активности возбудителей, с массовой вакцинопрофилактикой, с широким (частью бессимптомным) применением лекарственных средств и особенно антибиотиков.

Не исключается атипичное проявление болезней у истощенных животных в связи с угнетением их иммунобиологической реактивности. Ес-

ли инфекционный процесс быстро заканчивается выздоровлением животного, то течение болезни называют доброкачественным. Но при сниженной резистентности животного, болезнь может принять злокачественное течение, характеризующееся высокой летальностью. Такую более тяжелую, осложненную форму проявления болезни также следует считать атипичной.

Если типичное развитие болезни внезапно приостанавливается (обрывается) и наступает выздоровление, течение болезни называют абортным. Абортивно протекающая болезнь кратковременная, проявляется в легкой форме при отсутствии некоторых, нередко основных клинических признаков. Причиной такого течения считают высокую резистентность животного. Известно абортивное течение оспы у грубошерстных овец, когда образующиеся на коже папулы (узелки) быстро исчезают, а общее состояние животных остается удовлетворительным. Абортивное течение мыта у лошадей характеризуется кратковременной лихорадкой и незначительным увеличением лимфоузлов без их нагноения. Если после перенесенной инфекционной болезни и освобождения организма животного от ее возбудителя происходит повторное заражение тем же самым видом (серотипом) патогенного микроба, возникает реинфекция. Основное условие ее развития – сохранение восприимчивости к данному возбудителю (отсутствие или недостаточная прочность иммунитета). Возможна и суперинфекция – в результате (повторного) заражения, наступившего на фоне уже развившейся инфекции, вызванной тем же видом патогенного микроба. Новое заражение, произошедшее до освобождения организма животного от возбудителя, обычно отягощает болезнь, обостряет ее течение. Возврат инфекционной болезни, повторное появление ее симптомов после клинического выздоровления называют рецидивом. Он возникает как эндогенная реинфекция при снижении резистентности животного и активизация сохранившегося в организме возбудителя перенесенной болезни. Рецидивы свойственны болезням, при которых формируется недостаточно прочный иммунитет. Инфекционный процесс очень часто протекает бессимптомно, скрыто, латентно (бессимптомная или скрытая инфекция). Своеобразной формой скрытой инфекции следует считать иммунизирующую субинфекцию – это явление, когда патогенные микробы, неоднократно проникающие в организм животного в малых дозах, вызывает иммунобиологические реакции, выработку специфических антител, но сами при этом погибают. Соответственно животное не становится источником возбудителя, патоморфологических изменений не выявляют, функциональных расстройств не обнаруживают. Такое состояние

могут вызвать возбудители эмфизематозного карбункула, лептоспироза и др. инфекционных болезней.

Для возникновения инфекционной болезни необходимы условия: во-первых, микроб должен быть достаточно вирулентным; во-вторых, необходимо внедрение определенного количества микробов; в-третьих, они должны проникнуть в организм через благоприятные для них ворота инфекции и достигнуть восприимчивых тканей; в-четвертых, организм хозяина должен быть восприимчив к данному возбудителю болезни; в-пятых, необходимы определенные условия среды, при которых происходит взаимодействие между микробом и организмом.

Любая инфекция начинается с прикрепления поверхностных антигенных структур возбудителя к рецепторам клеток хозяина. Способность патогенных микроорганизмов проникать во внутреннюю среду хозяина, преодолевать защитные барьеры, распространяться в организме называют инвазивностью. Эта способность связана с выработкой ферментов (гиалуронидазы, фибринолизина, коллагеназы), нарушающих целостность некоторых тканей и наличием агрессивных – веществ, подавляющих фагоцитоз и бактериолиз. Агрессивные входят в состав клеточной стенки и капсулы многих патогенных микробов.

Методы лабораторных исследований

В основе серологических исследований лежит специфическая реакция между антигенами и антителами.

Антигены - генетически чужеродные вещества, при введении в организм животного (и человека) вызывают ответную реакцию (*антигенное свойство*) в виде продуцирования защитных тел - антител, специфических по отношению к антигену. Антигенные вещества представляют собой высокомолекулярные соединения, обладающие определенными свойствами: чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью, коллоидной структурой и определенной молекулярной массой. Антигенами могут быть разнообразные вещества белковой природы, а также белки в соединении с липидами и полисахаридами. Антигенными свойствами обладают клетки животного и растительного происхождения, яды животных (змей, скорпионов, пчел и др.) и яды растительного происхождения (рицин, кортин и др.), сложные комплексы, состоящие из полисахаридов, липидов, белков. Антигенными свойствами обладают вирусы, бактерии, микроскопические грибы, простейшие, экзо- и эндотоксины микроорганизмов. Различают антигены корпускулярные, клеточные (бактерии, эритроциты) и растворимые (молекулярно-дисперсные). Антигены ковалентны - имеют несколько детерминантных рецепторов для связи с

антителами (*антигенная функция*) как в организме животного (*in vivo*), так и вне организма - в пробирке (*in vitro*). Антигенной функцией обладают не только полноценные антигены, но и неполноценные (гаптены), то есть вещества небелковой природы (полисахариды, липидо-полисахаридный комплекс соматического антигена микробной клетки и др. вещества).

Под антигенностью понимают способность антигена вызывать иммунный ответ. Степень иммунного ответа организма на различный антиген будет неодинакова, то есть на каждый антиген будет вырабатываться неодинаковое количество антител.

Иммуногенность – способность создавать иммунитет. Это понятие относится главным образом к вирусным и микробным антигенам, обеспечивающим создание иммунитета к инфекционным болезням. Чтобы быть иммуногенным, антиген должен быть чужеродным в отношении данного реципиента, иметь молекулярную массу не менее 10000. С увеличением молекулярной массы иммуногенность нарастает. Корпускулярные антигены (бактерии, грибы, простейшие, эритроциты) более иммуногенны, чем растворимые, а среди последних большей иммуногенностью обладают высокомолекулярные, например, агрегированные, антигены.

Специфичность – особенность строения веществ, по которой антигены отличаются друг от друга. Она определяется антигенной детерминантой, то есть небольшим участком молекулы антигена, который и соединяется с выработанным на него антителом. Число таких участков (группировок) у каждого антигена различно и определяет число молекул антител, с которыми может соединиться антиген (валентность). От числа детерминант зависит валентность антигена: чем больше молекула, тем выше валентность.

Антигены подразделяют на полноценные и неполноценные. Полноценные антигены вызывают в организме синтез антител или сенсibilизацию (сенсibilизация – приобретение организмом специфической повышенной чувствительности к чужеродным веществам, чаще белковой природы, аллергенам) лимфоцитов, и вступают с ними в реакцию как *in vivo*, так и *in vitro*. Для полноценных антигенов характерна строгая специфичность, т. е. они вызывают в организме выработку только специфических антител, вступающих в реакцию только с данным антигеном.

Неполноценные антигены, или гаптены представляют собой сложные углеводы, липиды и другие вещества, не способные вызвать образование антител, но вступающие с ними в специфическую реакцию. Добавление к гаптенам небольших количеств белка придает им свойства полноценных антигенов. Белок, который укрупняет молекулу гаптена, полу-

чил название «шленнер» (нем. schlepper – проводник). Гаптенами являются и гетерогенные антигены Форсмана, которые были описаны в 1911 г. Форсман показал, что в органах животных разных видов (кошек, собак, лошадей, кур, морских свинок и др.) содержится общий антиген, но отсутствует у человека, обезьян, кроликов, уток и крыс. Это липоидная фракция, которая обладает свойствами гаптена.

Конъюгированные антигены. Этим термином обозначают белки, которые приобрели новую антигенную специфичность благодаря присоединению к ним с помощью химической связи новой химической группировки.

Антигены животного происхождения по специфичности подразделяют на видовые, групповые, органные и стадиоспецифичные.

Видовая специфичность. Животные разных видов имеют антигены, свойственные только данному виду, что используется при определении фальсификации мяса, групп крови путем применения антивидовых сывороток.

Групповая специфичность характеризует антигенные различия животных по полисахаридам эритроцитов, белкам сыворотки крови, поверхностным антигенам ядерных соматических клеток. Антигены, обуславливающие внутривидовые различия индивидуумов или групп особей между собой, называют изоантигенами, например групповые эритроцитарные антигены человека. Органная (тканевая) специфичность характеризуется неодинаковой антигенностью разных органов животного, например, печень, почка, селезенка отличаются между собой антигенами. Стадиоспецифические антигены возникают в процессе эмбриогенеза и характеризуют определенный этап внутриутробного развития животного, его отдельных паренхиматозных органов.

Аутоантигены. В некоторых случаях белки собственных тканей (сердца, печени, почек и др.) при соединении с белком микроорганизмов, токсинами или ферментами бактерий, лекарственными веществами, под влиянием физических факторов (ожог, облучение, обморожение) изменяют свои физико-химические свойства и становятся чужеродными для организма – аутоантигенами. На эти антигены организм вырабатывает антитела, возникают аутоиммунные болезни.

Антигены микроорганизмов. Вирусы, бактерии, грибы и их отдельные структуры, экзо- и эндотоксины обладают свойством полноценных антигенов.

Различают общие для родственных видов антигены, которые обозначаются как видовые и групповые, и антигены типоспецифические, свойственные определенному типу (варианту). Так как вирусы – сложные ан

тигены, часть которых связана с антигенами наружной оболочки вируса, часть – с внутренним нуклеопротеидом, то и противовирусные антитела обладают выраженной гетерогенностью с широким спектром антител.

Антитела – это специфические белки – иммуноглобулины, которые образуются в организме плазматическими клетками под воздействием антигена и обладающие свойством специфичности с ним связываться. Антитела образуются в организме в результате естественного заражения, после введения живых или убитых вакцин, при контакте лимфоидной системы с чужеродными клетками и тканями. Антитела по их функциональным свойствам подразделяются на нейтрализующие, лизирующие и коагулирующие. К нейтрализующим отнесены антитоксины, антиферменты, вируснейтрализующие, антитела лизины; к коагулирующим – агглютинины и преципитины лизирующие – бактериолизины, гемолизины, выделены комплементсвязывающие антитела.

С учетом функциональной способности антител были названы серологические реакции агглютинации, гемолиза, лизиса преципитации и др. Антитела разделены на тепловые (вступают в реакцию при 37°C) и холодные (креофильные) – вступают в реакцию при 4°C . в электрическом поле белки сыворотки крови разделены на альбумины и три глобулиновые фракции: α , β , γ . При электрофорезе установлено, что антитела имеются только в β - и γ -фракциях. При высокоскоростном центрифугировании антитела разделили на две основные группы: 7S (скорость седиментации - осаждения) – небольшие молекулы и 19S – большие молекулы, причем 7S обнаружены в γ -глобулинах, а 19S – в β -глобулинах. Антитела имеют различное количество активных центров в молекуле, это определяет их валентность. Антитела подразделяются на полные и неполные. Полные антитела при взаимодействии с антигеном дают видимые реакции (агглютинации, лизиса, преципитации и др.), неполные антитела после взаимодействия со специфическим антигеном не дают видимого проявления серологических реакций. При введении антигена в организм образуются антитела с различной функциональной активностью (приципитины, агглютинины, лизины и др.). все они идентичны, различно их действие, этих антител не менее 10000.

В соответствии с Международной классификацией антитела называются *иммуноглобулинами* и обозначаются Ig. Иммуноглобулины - белки с четвертичной структурой, то есть их молекулы построены из нескольких полипептидных цепей. Молекула каждого класса состоит из двух идентичных тяжелых (H) и двух идентичных легких (L) цепей, связанных между собой нековалентными взаимодействиями, дисульфидными мостиками и "хвоста". Легкие цепи являются общими для всех классов и

подклассов. Тяжелые цепи имеют характерные особенности строения у каждого класса (подкласса). Легкие цепи подразделены на два типа: К (Каппа) и λ (Лямбда). Тяжелые цепи обозначаются греческими буквами: γ (Гамма), μ (Мю), α (альфа), δ (дельта), ε (эпсилон) - соответственно латинскому обозначению того или иного класса иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. На конце каждой из двух "ветвей" имеются два идентичных антигенсвязывающих участка (в силу этого антитела называют бивалентными), с помощью которых антитела сшивают молекулы антигена в обширную сеть, так как каждая молекула антигена имеет три и более антигенных детерминант. Эффективность реакций связывания и сшивания антигена антителами значительно возрастает благодаря гибкому шарнирному участку в месте соединения обеих "ветвей" с "хвостом".

Антитела выполняют также эффекторные функции, обусловленные структурой Fc-фрагмента, имеющегося на "хвостовых" областях антител различных H-цепей. Так, у IgG "хвостовая" область связывается со специфическими рецепторами фагоцитирующих клеток, таких как макрофаги или полиморфноядерные лейкоциты, и в результате эти клетки более эффективно поглощают и разрушают внедрившиеся вирусы.

Имуноглобулины делят на классы, а также на подклассы. Известно 5 классов: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.

Имуноглобулины – это белки построенные из нескольких полипептидных цепей. Молекула каждого класса состоит из 4 полипептидных цепей – двух тяжелых и двух легких, которые связаны между собой дисульфидными мостиками. Мелкие цепи (I) – общие для всех классов и подклассов. Тяжелые цепи (H) имеют характерные особенности строения у каждого класса и подкласса. Гетерогенность антител при своей специфичности антитела неоднородны и отличаются друг от друга, они гетерогенны. Существует более 100000 антигенов и к каждому из них синтезируется «свое» специфическое антитело. Антитела реагируют с антигенами благодаря наличию у них определенных структур – активных центров. Активный центр представляет собой полость или щель, которая по конфигурации соответствует детерминантной группе антигена.

Рис 68. Схематическое изображение типичной молекулы антитела, состоящей из двух идентичных тяжелых (H) и двух идентичных легких (L) цепей

Молекулы антител различают по валентности, т.е. по количеству у них активных центров. Там IgG и IgA бивалентны (обладают двумя активными центрами), IgM поливалентен, может связать 5-10 молекул антигена. Активность связывания антител с антигеном оценивается такими понятиями, как аффинитет и avidность.

Аффинитет характеризует степень совпадения (комплементарности) конфигураций активного центра антитела и антигенной детерминанты (как ключ входит в замочную скважину). Под авидностью понимают количество (валентность) и расположение активных центров, характеризующие «жадность» связывания с антигеном всей молекулы антитела.

Свойства антител. Специфичность антител – это способность антител отличать один антиген от другого. Серологические реакции более специфичны и чувствительны, чем химические. Антитела, за очень редким исключением, реагируют только с теми антигенами, против которых они выработаны и подходят к ним как отпечаток к пальцу. Это так называемая комплементарность антител – дополнение к детерминанте антигена.

Аффинность (сродство) – активность антител в расчете на активный центр антигена вне зависимости от числа активных центров на молекулу.

Авидитет – способность антител связывать антигены. Он зависит от аффинности и числа активных центров антитела. При равной аффинности авидность IgM больше, чем авидность IgG, поскольку IgM функционально пентавалентен, а IgG двухвалентен.

Антитела различных классов иммуноглобулинов обладают различными физическими, химическими, биологическими и антигенными свойствами. **Имуноглобулин М** первым появляется после заражения или вакцинации животного, обладает выраженной способностью агглютинировать, преципитировать или лизировать антигены, а также связывать комплемент. Находится в плазме крови, у человека 1,0 г/л, при инфекционных заболеваниях количество его значительно повышается. Иммуноглобулин не участвует в аллергических реакциях, не переходит через плаценту. К классу IgM относят антитела группы крови человека – А, В, О.

Имуноглобулин IgG – наиболее изученный класс антител, содержится в сыворотке крови 12 г/л, составляет от 70 до 85 % всех иммуноглобулинов. Ig играет ведущую роль в защите от многих вирусных и бактериальных инфекций (оспа, бешенство, столбняк и др.), обладает выраженным свойством нейтрализации токсинов.

Имуноглобулины класса А делят на два вида: сывороточный и секреторный. Сывороточный IgA масса 170000, содержится в сыворотке крови составляет 15-20 % общего количества иммуноглобулинов, не обладает способностью преципитировать растворимые антигены, не связывает комплемент, принимает участие в реакции нейтрализации токсинов, термоустойчив, синтезируется в селезенке, лимфоузлах и в слизи-

стых оболочках и поступает в секреты – слюну, слезную жидкость, бронхиальный секрет, молозиво.

Секреторный IgA представляет собой полимер, синтезируется в слизистых оболочках. Биологическая функция – в местной защите слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей.

Имуноглобулин D. Молекулярная масса 10000, 7S. В сыворотке крови человека содержится до 1% от общего количества иммуноглобулинов, является одним из основных иммуноглобулинов, входящих в состав рецепторов В-лимфоцитов; термостабилен, обладает антивирусной активностью, не связывается с тканями.

Имуноглобулин E молекулярная масса 19000, 8,5S. Содержится в сыворотке крови 0,25 мг/л, термостабилен, инактивируется при 56°C в течении 1 часа, не связывает комплемента, быстро связывается с клетками тканей. Играет защитную роль при гельминтозах и протозойных заболеваниях, способствует усилению фагоцитарной активности макрофагов и зоинофагов.

Моноклональные антитела. Иммунная система организма вырабатывает специальные антитела на огромном множестве антигенов. В основе этой способности лежит наличие разнообразия клонов лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает антитела одного типа с узкой специфичностью. Общее число клонов у мышей, например, достигает 10^7 - 10^{10} степени. В ответ на данный антиген в реакцию вовлекается множество клонов, что обуславливает высокую гетерогенность получаемых антител. Поэтому при использовании антисывороток для идентификации и количественно определения антигенов большой проблемой является неспецифическое связывание и перекрестная реакция антител. В 1975г. Д. Кохлер и Ц. Мильштейн предложили метод получения гомогенных антител – метод гибридом. С его помощью производят слияние плазматомы (опухоловой клетки, возникшей из антигенообразующих клеток) с клетками селезенки иммунизированного животного. Таким образом получают гибридные клетки (гибридомы), способные неограниченно размножаться и синтезировать антитела узкой специфичности (моноклональные антитела).

Моноклональные антитела, получили широкое распространение при диагностике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных и человека. Например, получены такие антитела против возбудителя сибирской язвы, бруцеллеза, листериоза, ящура, бешенства, классической чумы свиней, болезни Ауески и т.д.

Таким образом, самым надежным при диагностике различных инфекционных болезней является использование лабораторных методов исследований.

Методы лабораторной диагностики инфекционных болезней

При лабораторной диагностике инфекционных болезней, вызываемых бактериями, применяются основные методы исследований:

1. Бактериоскопический - приготовление мазков, окраска по Граму, специальными методами и микроскопирование под иммерсионной системой микроскопа.
2. Бактериологический - посев на обычные, специальные питательные среды для выделения, изучения культуральных и биохимических свойств чистой культуры возбудителя болезни.
3. Биологический - определение патогенности выделенных микроорганизмов (постановка биопробы), заражение лабораторных животных.
4. Серологический - идентифицирование бактерий по сыворотке крови, взятой от больных животных и переболевших животных в различных серологических реакциях: реакция агглютинации (РА), реакция преципитации (РА), реакция гемагглютинации (РГА), реакция диффузной преципитации (РДП), реакция иммунофлюоресценции (РНФ), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция нейтрализации и др.

Для диагностики вирусных болезней животных используют различные методы лабораторных исследований. Все методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных делят на три группы:

1. Экспресс-методы.
2. Вирусологические методы.
3. Методы ретроспективной диагностики.

1. Экспресс-методы основаны главным образом на быстром обнаружении в патматериале гемагглютининов в реакции гемагглютинации, вируса или его антигенов с помощью:

2. Серологических тестов: реакций иммунофлюоресценции (РИФ), связывания комплемента (РСК), иммуноферментного анализа (ИФА), диффузионной преципитации в геле (РДП).

3. Световой микроскопии.
4. Электронной микроскопии.

5. Вирусологические методы основаны на изоляции активных форм вирусов из патматериала и их идентификации в серологических реакциях. Вирусологические методы длительны и трудоемки, но дают точный ответ о возбудителе болезни.

Для выделения вируса приготовленной из патматериала суспензией заражают чувствительные объекты, в качестве которых используют восприимчивых и лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры клеток. Выбор чувствительной системы и методы ее заражения зависят от ее чувствительности к выделяемому вирусу и его тропизма.

Идентификация вируса. Она основывается главным образом на реакциях антиген-антитело. В них используются известные специфические диагностические сыворотки, каждая из которых нейтрализует только определенный вирус.

Выбор серологической реакции для окончательной идентификации вируса определяется в основном свойствами самого вируса. При наличии у вируса гемагглютинирующих свойств его идентифицируют в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), если вирус проявил гемадсорбирующие свойства в культуре клеток – в РТГАд (реакция торможения гемадсорбции). При отсутствии названных свойств у выделенного вируса его надежно идентифицируют в РН (реакция нейтрализации), РСК (реакция связывания комплемента), РДП (реакция диффузионной преципитации в геле).

Результаты вирусологических исследований считают положительными при наличии клинических проявлений у животных того же вида, от которого был взят исследуемый материал. При экспериментах в куриных эмбрионах или культуре клеток проводится доказательство этиологической роли выделенного вируса. Установление нарастания титра антител к выделенному вирусу в парных сыворотках от животных, послуживших источником получения патологического материала, является доказательством этиологической роли выделенного вируса.

Серологические реакции.

Все серологические реакции основаны на взаимодействии антигенов со специфическими им (гомологичными) антителами.

Реакция нейтрализации (РН) – наиболее универсальная высокоспецифичная реакция, поэтому она служит эталоном при оценке других реакций в вирусологии. Принцип ее состоит в том, что при смешивании вируса с сывороткой, содержащей специфические антитела, вирус теряет инфекционные свойства, то есть возможность репродукции в чувствительных клетках. Смесь вируса и сыворотки испытывают на чувствительной к данному вирусу системе (лабораторных животных, куриных эмбрионах, культурах клеток). Биологическую систему и метод ее заражения подбирают с учетом наилучшего культивирования используемого в реакции вируса.

Реакция торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА, РЗГА) основана на нейтрализации антителами при встрече с гомологичным вирусом (антигеном) не только его инфекционной, но и гемагглютинирующей активностью в результате блокирования рецепторов вирионов, ответственных за гемагглютинацию и образования с ними комплекса антиген + антитело.

Принцип РТГА состоит в том, что в пробирке смешивают равные объемы сыворотки крови и суспензии вируса и после экспозиции определяют, сохранился ли в смеси вирус путем добавления суспензии эритроцитов. Агглютинация эритроцитов указывает на наличие, а отсутствие гемагглютинации – на отсутствие вируса в смеси. Исчезновение вируса из смеси вирус + сыворотка – признак взаимодействия антител сыворотки и вируса.

Реакция гемадсорбции и ее задержка (РГА_д и РЗГА_д). Гемадсорбция – соединение эритроцитов с поверхностью пораженных вирусом клеток. В основе этого явления лежит родство рецепторов вируса, находящихся на поверхности пораженной клетки, с рецепторами эритроцита, что приводит к их взаимному сцеплению аналогично реакции гемагглютинации.

Реакция диффузионной преципитации в геле (РДП) (синонимы: реакция геля-преципитации, реакция двойной диффузии в геле) основана на способности к диффузии в гелях антител и растворимых антигенов и отсутствии такой способности у комплекса антиген + антитело. Комплекс антиген + антитело образуется при контакте диффундирующих навстречу друг другу гомологичных антигена и антитела. Он осаждается на месте образования в толще геля в виде беловатой полосы преципитации, хорошо заметной на фоне прозрачного геля.

Реакция связывания комплемента (РСК) – одна из традиционных серологических реакций, применяемых для диагностики многих вирусных болезней: ящура, КЛЮ, АЧЛ, вирусной диареи КРС, аденовирусной инфекции, гриппа. В основе реакции лежит связывание комплемента специфическим комплексом антиген + антитело и выявление этого феномена с помощью индикаторной (гемолитической) системы – смеси баранных эритроцитов и антисыворотки к ним – гемолизина. Если исследуемый антиген гомологичен антителам, то образуется комплекс антиген + антитело и комплемент ими связан. В силу этого лизиса эритроцитов не происходит – положительная РСК (эритроциты находятся во взвеси – жидкость мутная, красного цвета). Если антиген не гомологичен антителам, комплекс не образуется, свободный комплемент лизирует эритроциты – отрицательная РСК (лизис эритроцитов – жидкость прозрачная,

красного цвета). Между этими двумя крайними результатами может быть задержка гемолиза разной степени выраженности.

Метод флуоресцирующих антител (МФА), или реакция иммунофлуоресценции (РИФ). Принцип данного метода заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом (конъюгат), сохраняют способность вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Образующийся комплекс антиген + антитело обнаруживают под люминисцентным микроскопом по характерному свечению благодаря присутствию в нем флуорохрома.

Метод иммуоферментного анализа (ИФА). Для идентификации вирусспецифического антигена иммуоферментный тест применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

Гистохимический вариант ИФА, или иммуопероксидазная реакция

Имуопероксидазная реакция аналогична методу иммуофлуоресценции, но отличается тем, что для постановки реакции используют антитела, меченные не флуорохромом, а ферментом – пероксидазой, и учет результатов реакции проводят не под люминисцентным микроскопом, а под обычным микроскопом.

Имуопероксидазную реакцию ставят в прямом и непрямом вариантах.

Методы твердофазного иммуоферментного анализа.

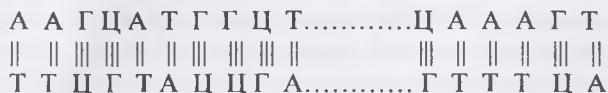
Они основаны на применении антител (антигенов), фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей используют стеклянные или нейлоновые шарики, полистироловые или керамические пробирки или микропанели.

Метод ДНК-зондов позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты, в том числе и вирусные, в любом материале от больных животных: свежем (ткани, смывы, кровь), высушенном, мороженом и даже частично разложившемся. Метод ДНК-зондов основан на способности одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот соединяться в двухцепочечные, если они взаимно комплементарны.

Методика ДНК-зондов включает в себя:

1. Получение одноцепочечного фрагмента ДНК определенного вируса (ДНК-зонда) и его метка радиоактивным фосфором (P^{32}) или биотином.
2. Выделение из патологического материала нуклеиновых кислот и их денатурация (расплетение двухцепочечных молекул на одноцепочечные в результате кипячения ($80^{\circ}C$) или обработки щелочью).
3. Контакт образовавшихся одноцепочечных молекул ДНК (или РНК) с ДНК-зондом при $55^{\circ}C$, приводящий к образованию двухцепочечных мо-

лекул (молекулярная гибридизация) в случаях их взаимной комплементарности



4. Удаление всех негибридизированных одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот.

5. Обнаружение (по метке) образовавшихся двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот, которые и будут указывать на наличие в материале того вируса, на который был получен ДНК-зонд.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) основана на амплификации ДНК, то есть увеличении числа копий строго определенных фрагментов молекулы ДНК *in vitro* с помощью фермента – термостабильной (выдерживающей многократный нагрев до 90°C) ДНК-полимеразы, осуществляющей синтез взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с двух праймеров. Праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область ДНК, и ориентированы 3'-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать.

ПЦР включает в себя три циклически повторяющихся процесса:

1. Плавление ДНК-матрицы – денатурация двухцепочечной ДНК при нагревании реакционной смеси до 90-100°C.
2. Отжиг праймеров – гибридизация (комплементарное связывание) праймера с ДНК-матрицей (55-65°C).
3. Синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы – комплементарное достраивание нитей ДНК-матрицы с помощью ДНК-полимеразы из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (72°C).

Стандартный цикл ПЦР – плавление, отжиг, синтез - воспроизводится многократно и в идеале количество амплификонов (амплифицируемый участок) растет в геометрической прогрессии. Весь цикл длится 3-5 минут и может повторяться до 20-40 раз. Теоретически за 30 циклов количество ДНК должно увеличиться в миллиард раз (20 циклов – в миллион раз).

Индикацию амплифицированных ДНК производят известными методами: электрофорезом с окрашиванием бромистым этидием, гибридизацией с изотопно или неизотопно мечеными генными зондами, непосредственным колориметрическим, флуориметрическим, радиоизотоп-

ным определением при использовании в системе ПЦР меченых предшественников синтеза нуклеиновых кислот.

Более подробно методы лабораторной диагностики описаны при лабораторных исследованиях инфекционных болезней животных в разделе «Специальная часть».

Отбор, консервирование, транспортировка и хранение материала для лабораторного исследования

Отбор материала для лабораторного исследования. Правильный отбор материала и его транспортировка в значительной мере определяют успех исследований.

Материал берут с учетом клинических признаков болезни, которые указывают на поражение той или иной системы, патологоанатомической картины при вскрытии (изменения в различных органах — печени, легких, кишечнике и т.д.), а также основываясь на предполагаемом диагнозе, поскольку для каждой инфекции характерна определенная локализация возбудителя в организме.

Материал для исследования берут прижизненно или посмертно (от павших или убитых с диагностической целью животных). Во всех случаях желательно материал брать от животных, не подвергавшихся лечению антибиотиками, и в максимально короткие после их гибели сроки, так как через 2 - 3 ч после смерти нормальная микрофлора начинает проникать в органы и ткани, что затрудняет выделение возбудителя в виде чистой культуры. Чтобы избежать контаминации посторонней микрофлорой, исследуемый материал берут стерильно, с использованием стерильного инструмента и посуды для транспортировки.

Трупы мелких животных направляют в лабораторию целиком.

Паренхиматозные органы и их фрагменты (у крупных животных) берут, соблюдая требования асептики. Каждый орган (фрагмент) помещают в стерильную посуду, транспортируют в нативном виде или консервируют одним из способов.

Трубчатые кости очищают от мышц, сухожилий, заворачивают в ткань, смоченную 5%-м раствором фенола, или пересыпают поваренной солью и затем заворачивают в ткань.

Гной, пунктаты органов, экссудат берут при помощи стерильного ватного тампона, шприца.

Кровь рекомендуют брать при лихорадочных состояниях стерильным шприцем в количестве 15-20 мл. Кровь, а также другие жидкие материа-

лы можно отбирать стерильной пастеровской пипеткой с последующим запаиванием ее кончика.

Моча: наружные половые органы обмывают, ополаскивают стерильным физиологическим раствором, осушают стерильным марлевым тампоном. Первую порцию мочи не берут, последующую в необходимом количестве набирают в стерильную посуду.

Мокрота: собирают до приема корма. Из трахеи берут при помощи стерильного трахеотубуса и стерильного ватного тампона на проволоке. При глубоком (до бифуркации) введении тампона возникает кашель и удается получить бронхиальную слизь. Тампон с материалом помещают в пробирку со стерильным физиологическим раствором. При взятии материала из носоглотки используют специальные приборы, носоглоточные тампоны на изогнутой проволоке, носовые ватно-марлевые тампоны.

Секрет молочной железы: сосок обмывают водой, обрабатывают этанолом, ополаскивают стерильным физиологическим раствором, сцеживают и удаляют первую порцию секрета, для микробиологического исследования берут последующие порции молока.

Спинальная жидкость: обычно берут при наличии менингоэнцефалитического синдрома путем пункции.

Кишечник: если исследуют содержимое кишечника, то пересылают отдельные отрезки (сегменты) кишечника, перевязанные на концах лигатурами. В остальных случаях интересующие отрезки кишечника освобождают от содержимого, промывают стерильной водой и помещают в банку со стерильным 30%-м водным раствором глицерина или насыщенным раствором хлорида натрия. Кишечник отправляют в лабораторию вместе с регионарными лимфатическими узлами.

Фекалии берут стерильными ватными или ватномарлевыми ректальными тампонами, которые вводят на 8-10 см в прямую кишку, а затем помещают в стерильную пробирку. Если нет возможности сразу сделать посев, используют консервирующие смеси. В противном случае нарушается исходное количественное соотношение микробных видов и размножение некоторых бактерий может привести к инаktivации искомого возбудителя.

Консервирование, транспортировка и хранение материала. Материал помещают в стерильную стеклянную посуду (пробирки, флаконы, банки и т.д.), закупоривают.

При подозрении на особо опасные инфекции сосуды с материалом помещают в герметичный металлический пенал (ящик), который опечатывают.

Транспортировку и хранение материала до исследования проводят таким образом, чтобы предотвратить размножение сопутствующей микрофлоры и инактивацию искомого микроорганизма. С этой целью исследуемый материал (кусочки органов) помещают в стерильную смесь равных объемов глицерина и физиологического раствора или помещают в термос, содержащий: 1) снег или лед и поваренную соль (в соотношении 3:1), температура смеси — 15 минус 20 °С; 2) равные части сухого льда и этанола, температура смеси около —70 °С.

Для консервирования материала, содержащего энтеробактерии, используют смеси, в которых исследуемый материал должен составлять 1/3 общего объема.

Глицериновая смесь: глицерин - 500мл, физиологический раствор - 1000мл, рН смеси доводят до 7,8-8,0 добавлением 20%-го раствора гидрофосфата калия. Смесь стерилизуют дробно, текучим паром.

Фосфатная буферная смесь: дистиллированная вода - 1000мл, дигидрофосфат калия - 0,45г, гидрофосфат калия - 5,34 г. Стерилизуют при 121 °С 20 мин.

Для энтеробактерий используют также накопительные среды (селенитовая, магниевая, желчный бульон), которые должны составлять 4/5 общего объема. Независимо от способа консервирования фекалии транспортируют и сохраняют до посева при 2-6°С.

В сопроводительном документе указывают: название и адрес хозяйства, фамилию ветеринарного работника, направляющего материал, вид животного, от которого материал получен, характер материала, на какую инфекцию необходимо исследовать. Кроме того, прилагают протокол патологоанатомического вскрытия и описание клинико-эпизоотологических данных.

Поступивший в лабораторию неконсервированный материал можно хранить при 4 °С 1-2сут; консервированный в 50%-м растворе глицерина (кусочки органов) — несколько недель; для длительного хранения материал замораживают при —15-20 °С.

Кровь для серологических исследований у крупного рогатого скота, овец, лошадей берут из яремной вены в стерильные бактериологические пробирки в количестве 10-15 мл, у свиней — из хвостовой, передней крапильной вен или глазного синуса, у птиц — из подкрыльцовой вен, у кроликов — из краевой ушной вены. Пробирки с кровью необходимо выдержать до формирования сгустка в тепле (1,5-2 ч), затем для отделения от стенок пробирки обвести сгусток стеклянной чистой палочкой или спицей. Для отстаивания сыворотки пробирки с кровью помещают в холодильник при 4-6 °С на 18-20 ч. После ретракции сгустка сыворотку

крови переливают в серологические пробирки с резиновыми пробками. При необходимости сыворотку крови консервируют, добавляя в пробирку несколько крупинок борной кислоты, тиомерсал (конечное разведение 1:10000), или замораживают.

Принципиальная схема лабораторного исследования

Диагностика инфекционных болезней включает в себя комплекс исследований: эпизоотологические, клинические, патологоанатомические, микробиологические. При важности каждого из них и ценности именно комплексного подхода микробиологическое исследование особенно важно, поскольку с его помощью либо непосредственно обнаруживают этиологический (причинный) агент болезни, либо косвенными специфическими иммунологическими методами доказывают его присутствие.

Микробиологическое исследование состоит из следующих этапов.

1. Обнаружение возбудителя непосредственно в исследуемом материале без изоляции в виде чистой культуры на питательных средах. На этом этапе применяют разные методы.

Неиммунологические методы включают в себя: а) выявление возбудителя путем микроскопического исследования окрашенных (по Граму и т. д.) мазков-отпечатков из органов и тканей; б) обнаружение при помощи генетических методов (генные зонды, ПЦР) нуклеиновых кислот возбудителя.

Иммунологические методы заключаются в выявлении антигенов возбудителя с помощью различных серологических реакций (РП, РДП, МФА, ИФА, РНГА и т. д.).

2. Обнаружение возбудителя (его токсинов) в биопrobe (заражают исследуемым материалом чувствительных лабораторных животных).

3. Выделение культуры возбудителя из исследуемого материала путем посева на питательные среды.

4. Идентификация выделенной культуры микроорганизмов по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных и патогенных свойств. При этом широко используют серологические (РА, РП, РДП, ИФА и т. д.), а в случае необходимости генетические методы идентификации изолированных микроорганизмов.

5. Серологическая (ретроспективная) диагностика заключается в том, что при помощи различных серологических реакций (РА, РСК, ИФА и т. д.) в сыворотке крови исследуемых животных обнаруживают специфические следы пребывания возбудителя — *антитела*. Серологические реакции наиболее широко применяют при диагностике хронически протекающих бактериозов.

6. Аллергическое исследование в отличие от перечисленных выше методов проводят непосредственно на животных в хозяйстве. При помощи диагностических аллергенов у животных выявляют состояние гиперчувствительности замедленного типа. Аллергическую пробу в основном применяют для иммунологической диагностики хронических бактериозов.

Изложенная схема отражает возможные, но не обязательные направления лабораторных исследований. При каждой конкретной инфекции схему исследования определяют особенности биологии возбудителя и инфекционного процесса.

Специальная часть

Лабораторная диагностика стафилококкозов

Возбудителями стафилококкозов животных и человека являются коковидные, грамположительные, неподвижные, неспорообразующие бактерии, относящиеся к роду *Staphylococcus*, семейства *Micrococcaceae*. Стафилококки - обитатели кожи, слизистых оболочек. Как транзитные виды могут присутствовать в кишечном тракте. Род *Staphylococcus* содержит 28 видов. У человека стафилококковые инфекции включают более 100 нозологических форм. Основными возбудителями стафилококкозов с/х животных являются виды *S. aureus* (два подвида), *S. intermedius*, *S. hyicus* и др.

S. aureus вызывает у многих видов животных местные воспалительные гнойные процессы на коже, фурункулы, абсцессы и т.д.; маститы крупного рогатого скота, овец, свиней, лошадей, коз, кроликов; эндомиетриты овец, коз, свиней, собак.

К *S. aureus* наиболее чувствительны цыплята раннего возраста, у взрослых кур обуславливает поражение органов дыхания, суставов.

Подвид *S. aureus anaerobicus* вызывает у овец казеозный лимфаденит, сходный с псевдотуберкулезным.

S. intermedius наиболее обычен как возбудитель пиодермии собак, кошек, может поражать респираторный тракт, суставы и другие ткани.

S. hyicus вызывает экссудативный дерматит свиней, в основном поражаются поросята до 1,5-месячного возраста. У взрослых свиней может

быть причиной метритов, поражений кожи. Иногда этот вид стафилококков изолируют при маститах коров.

S. gallinarum, *S. arlettae* обитают на коже кур; *S. caprae* выделяют из молока коз;

S. equorum выделяют с кожных покровов лошадей, от кошек, *S. delphini* - от дельфинов.

Лабораторная диагностика стафилококкозов основана на выделении культур возбудителей световой микроскопией, изучении их свойств с целью доказательства патогенности по изученным показателям и путем биопробы.

Бактериологическое исследование. Для исследования используют патматериал. Трупы мелких животных и птиц направляют в лабораторию целиком, от трупов крупных животных берут части паренхиматозных органов, кровь из сердца, головной мозг; прижизненно — содержимое абсцессов, истечения из шейки матки, синовиальную жидкость из пораженных суставов, молоко от маститных животных, соскобы с пораженных участков кожи. При подозрении на кормовые отравления стафилококковой этиологии направляют пробы корма. Материал берут от животных, не подвергавшихся в последние 10 дней лечению антибактериальными препаратами.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Клетки стафилококков сферические, размером 0,5-1,0 мкм, грамположительные, располагаются единично, парами, в виде скоплений неправильной формы, некоторое количество клеток в мазках из тканей может быть фагоцитировано. Клетки вирулентных штаммов *S. aureus* имеют небольшую капсулу. Клетки *S. saprophyticus* располагаются в препарате в виде групп неправильной формы, а также тетрадами и пакетами.

Выделение и идентификация культур стафилококков

Культивирование. Подавляющее число стафилококков — факультативные анаэробы. Подвид *S. aureus anaerobicus* в аэробных условиях не растет. С другой стороны, не растут на средах с тиогликолатом *S. arlettae*, *S. equorum*, не растет или слабо растет *S. lentus*. Температурный оптимум — 35-37° С, рН 7,2-7,4. Испытуемый материал обычно высевают на кровяной (овечий) агар, контаминированный — на молочно-солевой агар, среду Baird-Parker, плотные среды с добавлением на литр

среды 15 мг налидиксовой кислоты и 10 мг колистина сульфата, желточно-солевой агар Чистовича и др. Посевы, за исключением случаев выделения анаэробного подвида *S. aureus*, инкубируют в аэробных условиях при 37° С в течение 24-48 часов.

Характер роста стафилококков на питательных средах. Приводим культуральные характеристики основных патогенных видов стафилококков и *S. saprophyticus*. Макроскопически видимые колонии образуются в течение 24 часов инкубирования.

S. aureus на плотных питательных средах формирует круглые, выпуклые, с гладкой, блестящей поверхностью непрозрачные колонии диаметром до 6-7 мм. Может образовывать α - или β -гемолизин. Колонии капсулообразующих штаммов более мелкие. Цвет колоний серый, серо-белый с желто-оранжевым или оранжевым оттенком. Штаммы, выделенные от собак, обычно не пигментированы. Пигментообразование наиболее выражено на средах, содержащих кровь, сыворотку крови, молоко, углеводы. В жидких питательных средах растет с равномерным помутнением, образованием плотного, легко суспендируемого осадка.

S. hyicus и *S. intermedius* на агаровых средах растут в виде круглых выпуклых, блестящих, непрозрачных колоний, достигающих на селективных средах диаметра 4-7 мм, пигмента не образуют.

S. gallinarum на плотных средах формирует непрозрачные, сухие, плоские, с дольчатыми краями колонии диаметром до 10-15 мм, желтые или непигментированные. Некоторые штаммы на кровяном агаре дают слабый гемолиз.

S. caprae растет на агаровых средах в виде круглых, слабовыпуклых, непрозрачных, с блестящей поверхностью непигментированных колоний. На кровяном агаре замедленно, через 48 часов и более, образует узкую зону β -гемолиза с широкой зоной частичного обесцвечивания среды.

S. epidermidis на плотных средах образует круглые, с гладкой, блестящей поверхностью, непрозрачные колонии диаметром 3-6 мм серого или серо-белого цвета. При длительном культивировании липкость колоний возрастает и в центре формируется углубление. Некоторые штаммы образуют небольшое количество гемолизина. При росте в питательном бульоне формируется слизистый осадок.

S. saprophyticus растет на агаровых средах в виде круглых, выпуклых, с гладкой, блестящей поверхностью колоний диаметром до 5-9 мм. Некоторые штаммы образуют желтый или желто-оранжевый пигмент.

При характеристике гемолитической активности стафилококков дифференцируют четыре типа гемолиза: альфа-, бета-, дельта-, гамма.

Идентификация стафилококков на уровне рода. Культуры из подозрительных колоний, после изучения морфологических и тинкториальных свойств клеток, отвивают на простой МПА, выращивают и исследуют у них ряд признаков, позволяющих отличить стафилококки от сходных бактерий: виды родов *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*. Исследуют способность к ферментации глюкозы в ОФ-тесте, наличие каталазы, оксидазы, коагулазы, чувствительность к бацитрацину.

Ориентируясь на критерии, изложенные в табл.1, к стафилококкам относят штаммы, ферментирующие глюкозу в ОФ-тесте (расщепление в аэробных и анаэробных условиях), образующие каталазу, не обладающие оксидазой, чувствительные к бацитрацину.

Четко выраженная коагулазная активность позволяет культуру стафилококка отнести к группе патогенных без выяснения видовой принадлежности штамма.

Таблица 1 - Дифференциация стафилококков от других грамположительных кокков

Признаки	Стафилококки	Микрококки	Энтерококки	Стрептококки
Ферментация глюкозы (ОФ-тест)	+	-	+	+
Каталаза	+	+	-	-
Оксидаза	-	+	-	-
Коагулаза	+	-	-	-
Чувствительность к бацитрацину (0,04 ЕД/диск)	-	+	-	-

Определение патогенных свойств стафилококков, идентификация на уровне вида. Достаточно подробное изучение патогенных свойств стафилококка позволяет отнести выделенную культуру к одному из трех основных патогенных видов (табл.2). Исследование дополнительных ферментативных, культуральных и прочих свойств дает возможность идентифицировать другие виды стафилококков, достаточно часто выделяемые от животных (табл. 3). О присутствии патогенных свойств у вы-

деленных культур судят, кроме того, по результатам биопроб, позволяющих, в том числе, доказать наличие энтеротоксина. Определение факторов патогенности проводят следующими методами.

Коагулаза. Фермент, вызывающий свертывание плазмы, на фибриноген непосредственно не действует. Для этой цели наиболее подходит цитратированная плазма кролика (1 объем 4%-ного раствора натрия цитрата + 9 объемов крови). При исследовании штаммов, выделенных от определенных видов животных, может быть использована их кровь (свиньи, КРС, собаки).

Цитратную кровь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут, плазму отсасывают в стерильные пробирки, закрывают пробками, хранят до 3 недель при 4-5° С. При постановке опыта плазму разводят стерильным физиологическим раствором 1:5 и разливают по 0,5 мл в стерильные пробирки. Испытуемую культуру выращивают на МПА или МПБ 18-24 часа и вносят две капли бульонной или одну петлю агаровой культуры в пробирки с подготовленной плазмой. Параллельно проводят контроль плазмы без культуры бактерий. Пробирки ставят в термостат (37-38° С). Учет проводят через каждый час в течение 5-6 часов, при комнатной температуре 18 часов. Положительный результат — образование сгустка, который при наклоне пробирки удерживается. Стафилококки с выраженной патогенностью свертывают плазму в сроки до 2 часов. Наличие коагулазы наиболее четко коррелирует с патогенностью стафилококка.

Таблица 2 - Свойства основных патогенных видов стафилококков

Признаки	S. aureus *	S. intermedius	S. hyicus
Коагулаза (плазма кролика)	+	d	D
Гемолитиз (эритроциты КРС)	+	-	-
Гиалуронидаза	+	-	+
Лецитиназа	+	Н.Д.	Варьирующий признак (чаще +)
Протейн «А»	+	Варьирующий признак	+
ФНК-аза	+	+	+
Ферментация маннита аэробно-анаэробно	+	+	-
Маннитола	+	(±)	-
Образование пигмента	+	-	-

* — Анаэробный подвид *S. aureus* (*S. subsp. anaerobicus*) образует коагулазу, ДНК-азу, гемолизин, ферментирует мальтозу, не синтезирует пигмент (±) — 90% или более штаммов слабо позитивные d — 11-89% штаммов позитивные.

Фактор сгущивания (Chumping factor-CF). CF-фактор в отличие от коагулазы действует на фибриноген, что приводит к агрегированию стафилококков. Для выявления CF-фактора на предметном стекле в капле неразведенной цитратной плазмы суспендируют бактериальную массу стафилококков из агаровой культуры при помощи бактериологической петли. В положительных случаях агрегирование наступает в течение 1-2 минут. Контролем служит взвесь стафилококков в физиологическом растворе. Результаты CF-теста хорошо коррелируют с результатами пробочной пробы на коагулазу.

Фибринолизин (стрептокиназа). Исследуемую культуру микроорганизма засевают в виде «бляшки» на агар с 12 % цитрированной плазмы. Посевы инкубируют при 37 °С 23-24 ч. **Положительный результат** — появление зоны просветления вокруг колонии.

Лецитиназа. Фермент бактерий, расщепляющий лецитин, выявляют путем посева культуры стафилококков на желточный агар. Готовят **желточный агар**: пептон — 20 г, гидрофосфат натрия — 2,5 г, натрий — 1 г, 0,5%-й раствор сульфата магния — 0,1 мл, глюкоза — 1 г, агар — 12,5 г, вода дистиллированная — 500 мл. Устанавливают рН 7,2-7,4, стерилизуют при 121°С 15 мин, охлаждают до 55 °С, добавляют один стерильный желток на 500 мл среды, компоненты перемешивают и смесь разливают в чашки Петри. Исследуемую культуру засевают мелко на желточный агар, культивируют при 37-38 °С 24-48 ч. **Положительный результат** — появление зоны помутнения вокруг колоний.

Протеин «А». Белковое вещество, которое часто обнаруживают на поверхности клетки *S. aureus* и *S. hyicus*, обладает способностью неспецифически связывать Fc-фрагменты молекул IgG. Обнаружение протеина «А» у стафилококков проводят следующим образом. Отмытые центрифугированием эритроциты барана суспензируют в физиологическом растворе, смешивают с гемолизином, разведенным физиологическим раствором. Компоненты выдерживают при 37°С. Эритроциты отмывают центрифуги-

рованием и ресуспендируют в исходном объеме фгоиологического раствора. Каплю суспензии сенсibilизированных эритроцитов смешивают с бактериальной массой стафилококков при помощи бактериологической петли на предметном стекле. За счет протеина «А» стафилококков происходит агглютинация эритроцитов, содержащих на своей поверхности IgG (гемолизин).

Таблица 3 - Биохимические признаки и другие свойства стафилококков, выделяемых от животных

Вид стафилококка	Признак										
	Коагулаза	ДНК-аза	Гемолизин	Образование пигмента	Щелочная фосфатаза	Уреаза	Манинит	Мальтоза	Гидролиз эскулина	Новобиоцин 5 мкг/диск	Полимиксин В 300 ед/диск
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+	d	+	+	-	Ч	Р
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobicus</i>	+	+	+	-	+	нд	нд	+	-	Ч	нд
<i>S. intermedius</i>	+	+	+	-	+	+	(d)	(±)	-	Ч	Ч
<i>S. hyicus</i>	d	+	-	-	+	d	-	-	-	Ч	Р
<i>S. epidermidis</i>	-	d	(d)	-	d	+	-	+	-	Ч	Р
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	d	-	+	d	+	-	Р	Ч
<i>S. caprae</i>	-	-	(d)	-	(+)	+	d	(d)	-	Ч	Ч
<i>S. gallinarum</i>	-	-	(d)	d	(+)	+	+	+	+	Р	Ч
<i>S. arlettae</i>	-	-	-	+	(+)	-	+	+	-	Р	нд
<i>S. lentus</i>	-	-	-	d	(±)	-	+	d	+	Р	Ч
<i>S. equorum</i>	-	-	(d)	-	(+)	+	+	d	d	Р	нд
<i>S. similans</i>	-	-	(d)	-	(d)	+	+	(±)	-	Ч	Ч
<i>S. delphini</i>	нд	-	+	-	+	+	(+)	+	нд	Ч	нд
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-	+	+	+	d	d	-	Ч	Р

+ - 90% штаммов или более позитивные; ± - 90% штаммов или более слабо позитивные; d - 89% позитивные; - 90% или более штаммов отрицательные; () - замедленная реакция; *- штаммы от собак обычно образуют белый пигмент; Р - устойчивы; Ч - чувствительны (резистентность к новобиоцину - зона 16 мм и меньше; резистентность к полимиксину В - зона менее 10 мм).

Гемолизины. Гемолитическую активность исследуют посевом на кровяной агар. Гемолизины стафилококков отличаются биохимическими, антигенными свойствами и литической активностью по отношению к

эритроцитам различных видов животных. Известны четыре типа гемолизинов стафилококков (табл. 4).

Конкретный штамм стафилококков может синтезировать один тип гемолизина или несколько в различных комбинациях. При тестировании гемолитической активности у штаммов, особенно от КРС, необходимо учитывать наличие β -гемолизина и целесообразность дополнительного выдерживания посевов после инкубирования также при 4-15° С.

S. aureus, *S. intermedius* могут синтезировать одновременно α - и β -гемолизин, что приводит к образованию двойной зоны гемолиза: вблизи колонии — типа α , далее — β .

Таблица 4 - Спектр активности гемолизинов стафилококков

Тип гемолизина	Видовое происхождение эритроцитов	
	лизируются	не лизируются
1	2	3
Альфа-гемолизин (α). Характерен для штаммов, выделенных от людей. Зона лизиса узкая, лизис полный	Овца, кролик, КРС	Лошадь, куры, человек
Бета-гемолизин (β). Обнаруживают чаще у штаммов от КРС. Зона лизиса широкая, лизис после инкубирования при 37° С неполный, полный в результате дополнительного выдерживания посевов в течение 18 часов при 4-15° С	Овца, КРС	Кролик, лошадь, куры
Дельта-гемолизин (δ). Зона гемолиза узкая, четко ограниченная, гемолиз полный	Обладает широким спектром действия	Обладает широким спектром действия
Гамма-гемолизин (γ)	Овца, кролик, морская свинка, человек	

Гиалуронидаза (фактор проникновения). Обнаружение этого фермента у стафилококков практически наиболее легко осуществимо в тесте декапсуляции. Берут штаммы капсулообразующих видов бактерий, имеющих в составе капсулы гиалуроновую кислоту (субстрат для гиалуронидазы): *Str. equi*, *Pasterella multocida* (серовар А). На кровяной МПА в чашке Петри крестообразно засевают штрихом *Str. equi* или *P. multocida* (тип А) и под углом 90° аналогично в виде линии культуру испытуемого стафилококка. Посевы инкубируют при 37° С в течение 24 часов. При наличии гиалуронидазы колонии тест-микроба вблизи штриха стафилококков образуются более мелкие и тусклые за счет разрушения кап-

суши ферментом, который диффундирует в толщу агара (результат положительный).

ДНК-аза. Нуклеаза обычно выявляется у *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*. Исследуемую культуру бактерий засевают на питательный агар с ДНК и культивируют при 37 °С 24 ч. Затем на поверхность среды с бактериальной культурой наливают 1 н. раствор соляной кислоты. Положительный результат — при гидролизе ДНК вокруг выросшей культуры видна светлая зона.

Биопроба. Проводят для выявления патогенных свойств штаммов по летальному эффекту (биопроба на цыплятах), положительной дермонекротической реакции (некротоксин), а также на котятках для обнаружения способности продуцировать энтеротоксин. Известно шесть антигенно-параллельных энтеротоксинов (А, В, С, D, Е, F).

Дермонекротическая проба. У кролика-альбиноса массой 2-2,5 кг за сутки до опыта на боку выстригают два участка размером 2х2 см. 24-часовую бульонную испытуемую культуру вводят внутрикожно в дозе 0,2 мл на обоих участках. Положительный результат: через 24 часа на месте инъекции появляется гиперемия кожи, через 48 часов - некроз. Наблюдение продолжают 4 суток.

Биопроба на цыплятах. Проводят при изучении штаммов, выделенных от птиц. Суточную бульонную культуру в объеме 0,1 мл вводят во внешний угол глазницы двум 1-2-дневным цыплятам. Наблюдение ведут в течение 5 суток. Положительный результат: гибель цыплят на 3-5 сутки при выделении культуры стафилококков из паренхиматозных органов и костного мозга цыплят.

Обнаружение энтеротоксина в биопробе на котятках. Испытуемую культуру стафилококка засевают на среду для получения стафилококкового энтеротоксина. Культуру стафилококка выращивают на специальной питательной среде (пептон, хлорид кальция, хлорид магния, дигидрофосфат калия, 0,8 % агар-агара, рН 7,2), в атмосфере, содержащей 20 % оксида углерода в течение трех суток. Посевы инкубируют в эксикаторе с 20% CO_2 , что достигается смешением на дне сосуда (емк. 2000 мл) 2 г двууглекислой соды с 17 мл 10%-ной серной кислоты, после чего крышку эксикатора сразу закрывают. Посевы инкубируют при 37° С 3 суток, ежедневно дополняя вышеописанным способом CO_2 в эксикаторе. На 4 сутки содержимое колбы фильтруют через мембранные фильтры № 3 или № 4.

Приблизительно 10-15 мл фильтрата смешивают в равной пропорции с теплым молоком и скармливают 4-8-недельным котятам. Положительный результат: через несколько минут котята проявляют беспокойство, через 1-3 часа появляются симптомы гастроэнтерита: понос, рвота. Возможен летальный исход.

В специализированных лабораториях, при наличии соответствующих реактивов, энтеротоксин выявляют серологическими методами. Испытуемый штамм выращивают на подходящей среде, например сердечно-мозговом бульоне, и супернатант исследуют.

Серологически энтеротоксин обнаруживают в РДП или при помощи иммуноферментного метода. Возможно обнаружение токсинообразования следующим способом. К расплавленному и остуженному до 45°C МПА добавляют антитоксическую стафилококковую сыворотку (*S. aureus*) до содержания в 1 мл среды 14-15 АЕ. Агар разливают по чашкам Петри и засевают дробно изучаемую культуру для получения изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37° С 24-48 часов. Вокруг колоний токсигенных стафилококков формируются кольца преципитации.

Фаготипирование стафилококков. Проводят для обнаружения источника возбудителя и установления эпизоотологических (эпидемических) связей. Фаготиповая принадлежность является маркером, позволяющим устанавливать идентичность штаммов, даже если другие характеристики подверглись изменениям. Для фаготипирования *S. aureus* существует международный набор фагов, включающий 21 фаготип, разделенный на 5 фагогрупп (I-V). Для типирования штаммов, выделенных от КРС, предложен свой набор фагов, состоящий из фаготипов 42 Д, 78, 102, 107, 117, 118, 119. Техника фаготипирования сводится к следующему. Исследуемую культуру выращивают на скошенном МПА при 37-38° С в течение 18-24 часов, пересевают в пробирку с 2,5 мл бульона Хоттингера. инкубируют при 37° С 3-4 часа, засевают газоном в чашки Петри на 1,25%-ной МПА (рН 7,2-7,4) с 0,4% глюкозы и 0,02% кальция хлорида. Засеянные чашки подсушивают 30-40 минут в термостате, расчерчивают дно чашки на необходимое количество квадратов и стандартной бактериологической петлей (d=2 мм) в каждый квадратик вносят тот или иной фаг в рабочем титре. Бактериологическую петлю после каждой манипуляции прожигают. Посевы инкубируют 5-6 часов при 37° С или 18-20 ча-

сов при 30° С. Штаммы, не лизированные набором фагов, проверяют повторно, используя более концентрированный фаг (х 100). Степень лизиса оценивают по следующей схеме: «+ + + +» — полный лизис; «+ + +» — наличие в зоне лизиса колоний стафилококка; «+ +» — в зоне капли фага обнаруживают более 50 колоний фага; «+» — от 20 до 50 колоний фага; «» — полное отсутствие лизиса.

Штаммы стафилококков чаще лизируются несколькими фагами. В зависимости от спектра фагочувствительности стафилококк относят к какой-либо одной фагогруппе, например I, II и т. д., или к смешанной группе (I и III и т.д.).

Идентификация стафилококков с использованием СТАФИтеста 16

Набор СТАФИТест 16 предназначен для идентификации широкого ряда стафилококков и родственных грамположительных кокков (*Micrococcus*, *Stomatococcus* и др.).

Система представляет собой планшет, содержащий 6 двухрядных вертикальных стрипов с субстратами для определения 16 тестов: уреазы, аргинин, орнитин, бета-галактозидаза, бета-глюкуронидаза, нитраты, фосфатаза, пирролидонилариламидаза, эскулин, сахароза, трегалоза, маннитол, ксилроза, мальтоза, манноза, глюкоза/новобиоцин. Дополнительно к планшетным рекомендуются бумажные полоски для определения реакции Фогеса-Проскауэра (ВПтест) и определения цитохромоксидазы (ОКСИтест). Набор содержит 10 пластинок и позволяет провести идентификацию 60 культур.

Методика проведения исследования

Пластинки СТАФИТест 16 (один двухрядный стрип на каждую культуру), рамка с крышкой, физиологический раствор, парафиновое масло, диагностические полоски ВПтест и ОКСИтест, реактивы для тестов: фосфатаза, нитраты, ПИРАтест, Фогеса-Проскауэра (ацетонин), оксидаза, стандарт мутности второй степени по шкале McFarland.

Выделение культуры и приготовление бактериальной суспензии. Выделяют чистую культуру с кровяного агара. Окрашивают ее по Граму и проверяют каталазную активность. Для идентификации с помощью данной системы используют культуры грамположительных каталазоположительных кокков. Из чистой 24-часовой культуры готовят в

физиологическом растворе бактериальную суспензию мутностью, соответствующей указанному выше стандарту.

Инокуляция и инкубация. Приготовленную суспензию инокулируют по 0,1 мл во все лунки стрипа, кроме лунки А второго ряда (глюкоза/новобиоцин), в которую вносят 0,1 мл разведенной суспензии. Для этого 0,1 мл исходной суспензии вносят в 2,6 мл физиологического раствора и тщательно гомогенизируют. После инокуляции в лунки Н, G и F (тесты уреаза, аргинин, орнитин) добавляют по две капли парафинового масла.

В пробирку с исходной суспензией (примерно 1 мл) помещают диагностическую полоску с ВПтестом. Инокулированную пластинку инкубируют в течение 24 часов, а пробирку с ВПтестом в течение 1,5 часов при температуре 37 °С.

Учет результатов и идентификация

После 1,5 часов инкубации в пробирку с ВПтестом добавляют по три капли реактивов ВПТ1 и ВПТ2, встряхивают и помещают в термостат на 30-40 минут, после чего учитывают результат реакции. После 24 часов инкубации пластинки добавляют по одной капле реактива в следующие лунки первого ряда стрипа: лунка С - реактив на нитраты, лунка В - реактив на фосфатазу, лунка А - реактив РУР. Учитывают результаты всех тестов. При оценке СТАФИтест 16 ориентируются по таблице 17 «Интерпретация реакций», цветной шкале и/или цветовым реакциям контрольных штаммов. Для более четких положительных реакций тестов бета-галактозидаза и бета-глюкуронидаза в лунки Е и D первого ряда стрипа добавляют по 1 капле реактива на фосфатазу. Как дополнительный тест для группы *S. sciuri/lentus* и *S. caseolyticus* ставят ОКСИтест.

Примечание:

При нечеткой работе теста GLN (глюкоза/новобиоцин) для выяснения чувствительности испытуемых штаммов к новобиоцину на контрольные чашки с высевом бактериальных суспензий накладывают диагностические диски с этим антибиотиком.

Таблица 5 - Интерпретация реакций

Колонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Ряд 1-й				
Н	Уреаза	URE	Красно-фиолетовый, оранжево-красный	Желтый, бледно-оранжевый
G	Аргинин	ARG	Красно-фиолетовый, красный	Желтый, бледно-оранжевый
F	Орнитин	ORN	Красно-фиолетовый, красный	Желтый, бледно-

				оранжевый
В	Бета-галактозидаза	ONP	Желтый, бледно-желтый	Бесцветный
Д	Бета-глюкуронидаза	GLR	Желтый, бледно-желтый	Бесцветный
С	Нитраты	NIT	Темно-красный, красный	Бесцветный, слабо-розовый
П	Фосфатаза	PHS	Красно-фиолетовый	Бесцветный, слабо-розовый
А	Пирролидо-пирамидаза	PYR	Красный, бледно-красный	Желтый, желто-оранжевый
Код-лунка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Ряд 2-й				
В	Эскулин	ESL	Черный, темно-коричневый, темно-серый	Бесцветный, бледно-коричневый, бледно-серый
С	Сахароза	SUC	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
Т	Трсагоза	TRE	Желтый, желто -коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
Д	Маннитол	MAN	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
П	Ксилоза	XYL	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
С	Мальтоза	MLT	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
П	Манноза	MNZ	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
А	Глюкоза/ ново-биоцин	GLN	Желтый, желто-коричневый	Фиолетовый, коричнево-фиолетовый
Панели				
	Тест на оксидузу	окси-тест	Синий	Бесцветный
	Ацетонин	ВПтест	Красный, розовый	Бесцветный

Примечание:

Панели С с отрицательной реакцией на нитраты добавляяют осторожно небольшое количество порошкообразной лунки (приблизительно 5 мг) для подтверждения отрицательной реакции: при отрицательной реакции красный цвет появляется в течение 10 минут.

Четвертый тест бета-галактозидазы и бета-глюкуронидазы (ряд 1-й, лунки Е и Д) проводят на белом фоне.

Идентификацию проводят с помощью идентификационной таблицы или книги кодов для СТАФИтест 16. При окончательной идентификации учитывают всю дополнительную информацию (микроскопию, характер колоний, наличие пигмента, гемолиз и т. д.).

Питательные среды

Желточно-солевой агар Чистович. К МПА (рН 7,2-7,4) добавляют 10% натрия хлорида, к стерильному расплавленному агару с температурой 45- 50° С добавляют 20% желточной взвеси (1 желток куриного яйца на 150 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида), компоненты перемешивают, среду разливают в чашки Петри.

Молочно-солевой агар Петрович. К МПА (рН 7,2-7,4), содержащему 5-7,5% натрия хлорида, добавляют 10% стерильного обезжиренного молока, компоненты перемешивают и среду разливают в чашки Петри.

Среда для накопления стафилококкового энтеротоксина. К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 20 г пептона, 1 г однозамещенного фосфата калия, 5 г натрия хлорида, 0,1 г кальция хлорида, 0,2 г магния хлорида, 0,8 г агара, устанавливают рН 7,0-7,2, кипятят до расплавления агара, разливают по флаконам, стерилизуют при 116° С в течение 20 минут.

Агар Baird - Parker (желточно-теллуриглицин-пируватная среда). К 90 мл основной среды с температурой 45° С добавляют 6,3 мл глицинового раствора, 1 мл раствора теллуриглицина натрия, 5 мл эмульсии желтка, компоненты перемешивают, разливают в чашки Петри. Среда пригодна к использованию в течение 28 дней (хранение при 4° С). Перед посевом на поверхность среды наносят 0,5 мл 20%-ного водного раствора пирувата натрия, стерилизованного фильтрацией, распределяют по поверхности, подсушивают. *Желточная эмульсия.* Свежее куриное яйцо выдерживают в 0,001 N растворе H_2C_{12} . Соблюдая правила асептики, отделяют желток и эмульгируют его в 200 мл физиологического раствора. *Глициновый раствор.* Глицин — 20 г, дистиллированная вода — 100 мл. Стерилизуют при 120° С в течение 15 минут. *Раствор теллуриглицина натрия.* Теллуриглицин натрия — 1 г, дистиллированной воды — 100 мл. Стерилизуют фильтрацией

Среда Чепмен. Пептон — 1%, Д-маннит — 1%, натрия хлорида — 7,5% дрожжевой экстракт — 0,25%, двузамещенный фосфорнокислый

палый — 0,5%, агар-агар — 1,5%, устанавливают pH 7,0. Среду стерилизуют при 110° С в течение 1,5 часов, добавляют 10% стерилизованного обезжиренного молока.

Фенилэтаноловый агар. Панкреатический гидролизат казеина — 15 г пананновый гидролизат соевой муки — 5 г, NaCl — 5 г, фенилэтанол — 2,5 г, агар — 15 г, дистиллированная вода — 1000 мл, pH 7,3, стерилизуют автоклавированием 15 минут при 118° С.

Лабораторная диагностика стрептококкозов

Ранее в род *Streptococcus* включали пиогенные стрептококки, энтерококки и молочнокислые стрептококки, которые в настоящее время отнесены соответственно в самостоятельные роды *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Lactococcus*. В данном разделе рассматриваются вопросы лабораторной диагностики болезней, вызываемых видами родов *Streptococcus* и *Enterococcus*.

Виды рода *Streptococcus* имеют клетки сферические или овальные, диаметром 0,5-2 мкм, при росте в жидкой питательной среде клетки парные или в виде цепочек. Клетки грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, иногда имеют капсулу. Факультативные анаэробы, каталазоотрицательные, растут в диапазоне температур 25-45° С.

Таблица 6 - Экология и патогенные свойства стрептококков

Вид стрептококка	Естественная среда обитания	Вызываемая патология
<i>S. pneumoniae</i>	Верхние дыхательные пути	Септицемия, воспаление суставов, при подостром течении пневмония, воспаление кишечника у телят, ягнят, реже у поросят
<i>S. pyogenes</i>	Верхние дыхательные пути	Иногда маститы у коров, лимфангит жеребят
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	Миндалины лошадей	Лошади - маститы, мыт
<i>S. equi</i> subsp. <i>equicervicinis</i>	Вагина и кожа лошадей	Маститы, эндометриты лошадей
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Слизистые и кожа свинноматок, овец, кур, вагина и кожа лошадей	Крупный рогатый скот - маститы и метриты; свиньи — септицемия и артриты у 1-3-недельных поросят; ягнята- пневмонии; птица — септицемия; лошади - аборт, маститы, пневмонии
<i>S. agalactiae</i>	Молочные каналы	Крупный рогатый скот, овцы, козы - маститы; собаки - септицемия щенков; кошки - маститы

<i>S. dysagalactiae</i>	Гениталии и носовая полость крупного рогатого скота, овец	Крупный рогатый скот - маститы, эндометриты; ягнята - полиартриты
<i>S. dysagalactiae equisimilis</i>	Вагина и кожа лошадей	Лошади - эндометриты, маститы
<i>S. porcinus</i>	Слизистые свиней	Свиньи - лимфадениты поросят
<i>S. suis mun</i>	Носовая полость, миндалины свиней	Свиньи — артриты, менингиты, септицемия молодняка
<i>S. uderis</i> ²	Миндалины, вагина, кожа крупного рогатого скота	Крупный рогатый скот — маститы
<i>S. canis</i>	Слизистые, генитальный тракт плотоядных	Плотоядные - септицемия новорожденных, поражения гениталиев, кожи
<i>S. bovis</i> , <i>S. equines</i> ²	Кишечный тракт многих видов животных	Возбудители оппортунистических инфекционных болезней

Примечание к таблице 6. ¹⁾ *S. pneumoniae* относят к группе «Стрептококки ротовой полости».

²⁾ *S. uderis*, ²⁾ *S. bovis*, *S. equines* ²⁾ отнесены к группе «Другие стрептококки». Все остальные стрептококки классифицируют как «Гноеродные стрептококки».

Виды рода *Enterococcus* сходны со стрептококками по вышеперечисленным признакам, но температурный диапазон составляет 10-45° С, могут расти при рН 9,6, концентрации NaCl 16,5% и желчи 40%, обычно относятся к серологической группе «В».

Патогенные свойства и экология патогенных стрептококков представлены в табл. 6.

Энтерококки (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*) обитают в кишечном тракте многих видов животных, могут быть причиной оппортунистических инфекций и септицемии у кур, маститов коров, инфекций мочевого тракта у собак, эндокардитов у ягнят и крупного рогатого скота.

Лабораторная диагностика стрептококкозов основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование. Для исследования на стрептококковую инфекцию животных в лабораторию направляют кровь сердца, печень, селезенку, головной мозг и трубчатую кость. При пневмониях дополнительно берут кусочки легкого на границе здоровой и пораженной тканей, средостенные лимфатические узлы, при артритах - синовиальную жидкость. Трупы мелких животных доставляют целиком. В случае маститов направляют секрет пораженной доли вымени, эндометритов — содержимое влагалища, взятое при помощи стерильных тампонов.

Учитывая малую устойчивость возбудителя материал должен быть доставлен не позднее 6 часов после гибели или убоя животного при условии транспортировки его в термосе со льдом (4-6°C). При более высокой температуре срок доставки материала не должен превышать 2-3 часа.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят мазки, окрашивают по Граму, при подозрении на наличие капсулообразующих стрептококков препараты окрашивают на капсулы по Романовскому-Гимза, Ольту и др. Мазки из молока можно окрашивать по Граму, используя методы, нивелирующие присутствие жира и белка.

Клетки *S. pneumoniae* в окрашенных препаратах овальные или сферические, размером 0,5-1,25 мкм, обычно парные, причем соприкасающиеся стороны клеток уплощены, а наружные вытянуты и заострены (ланцетовидный диплококк). Также клетки могут располагаться одиночно, короткими цепочками, окружены капсулой.

Клетки *S. equi* сферической или овальной формы, размером 0,6-1,0 мкм, располагаются одиночно, парами, короткими цепочками, в мазках из гноя в виде длинных цепочек, имеют капсулу.

Клетки *S. agalactiae* (*S. dysagalactiae*) сферические, размером 0,6-1,2 мкм, чаще располагаются в виде коротких или средней длины цепочек.

Клетки *S. pyogenes* сферические, размером 0,5-1,0 мкм, в виде коротких или длинных цепочек (в бульоне длинные цепочки). Энтерококки имеют овальную форму, размер 0,6-2,0x0,6-2,5 мкм, располагаются парами или короткими цепочками.

Результаты микроскопического исследования, с учетом полиморфизма бактерий на фоне лекарственной терапии, имеют ориентировочное диагностическое значение.

Выделение и идентификация культур стрептококков

Культивирование. Стрептококки - факультативные анаэробы. Исследуемый материал высевают на кровяной, глюкозо-кровоной агар (кровь барана или крупного рогатого скота), глюкозо-сывороточный МПБ (рН 7,4-7,8). Контаминированный материал засевают на селективные среды агар с антибиотиками, азидом натрия; образцы молока целесообразно посеять на среду Эдварда для выявления гемолиза и гидролиза эскулина.

Для обнаружения энтерококков используют специальные селективные среды: молочно-полимиксиновая среда Калины, желчно-кровоной

агар Беленького и др. Посевы инкубируют при 37-38° С в течение 24-48 часов.

Характер роста стрептококков на питательных средах. На глюкозо-кровяном агаре стрептококки в основном растут в виде мелких, прозрачных или слегка мутноватых колоний с ровными краями, как правило окруженных зоной гемолиза. Различают α - и β -гемолитические стрептококки.

Гемолиз типа α -: неполный гемолиз, часто с зеленоватым оттенком за счет перехода гемоглобина в метгемоглобин, далее обычно находится узкая зона β -гемолиза.

β -гемолиз - полный гемолиз эритроцитов. Отсутствие разрушения эритроцитов и гемоглобина обозначают как γ -гемолиз. Гемолитическая активность различных видов стрептококков представлена в табл. 7.

Таблица 7 – Дифференциация стрептококков по типу гемолиза и серогрупповой принадлежности

Признак		Вид стрептококка
Тип гемолиза	β	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> , <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , <i>S. porcinus</i> , <i>S. canis</i>
	α	<i>S. dysagalactiae</i> , <i>S. dysagalactiae</i> subsp. <i>equisimillis</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Серогрупповая принадлежность по Лансфилл	A	<i>S. pyogenes</i>
	B	<i>S. agalactiae</i>
	C	<i>S. dysagalactiae</i> , <i>S. equi</i> (все подвиды)
	D	<i>S. suis</i> (м.б. R или S), <i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i> , энтерококки
	G	<i>S. canis</i>
	E	<i>S. porcinus</i> , иногда <i>S. uberis</i>
	R	<i>S. suis</i> (м.б. D или S)
	S	<i>S. suis</i> (м.б. R или S)
	P	<i>S. porcinus</i>
	U	<i>S. porcinus</i>
	V	<i>S. porcinus</i>
	нет	<i>S. pneumoniae</i>

S. pneumoniae на глюкозо-кровяном агаре образует круглые диаметром 0,5-1,5 мкм, полупрозрачные, плоские, с приподнятым центром и

пряими колонии. Если культивирование проводится в аэробных условиях, обязательен α -гемолиз с зеленоватым оттенком, при анаэробной инкубации — β -гемолиз. По внешнему виду колонии похожи на колонии других патогенных стрептококков. Могут встречаться мукоидные колонии — более крупные, с блестящей поверхностью, слизистой консистенции. В сыровороточно-глюкозном бульоне растет с равномерным помутнением среды, с образованием пылевидного осадка.

S. equi на кровяном агаре образует мелкие, слизистые, росинчатые колонии с зоной β -гемолиза, которые при дальнейшей инкубации становятся серо-белыми, непрозрачными. В жидкой питательной среде растет с ее помутнением.

S. agalactiae на кровяном МПА образует мелкие, сероватые, просвечивающиеся колонии с зоной β - или двойной α -гемолиза, часть штаммов не выделяет гемолизин. Для выявления скрытой гемолитической активности применяют САМР-тест. В сыровороточно-глюкозном МПБ при росте возбудителя среда остается прозрачной, а формирующие крупинки оседают на дно пробирки. *S. dysagalactiae* на кровяном агаре образует широкую зону α -гемолиза.

S. pyogenes на кровяном агаре формирует β -гемолитические колонии трех типов: крупные, блестящие, вязкие, в виде капли воды — характерны для свежeweделенных капсулообразующих штаммов; серые, матовые, зернистые, с неровным краем — характерны для вирулентных штаммов, имеющих М-протеин; мелкие (0,1-0,3 мм), выпуклые, прозрачные — обычны для авирулентных лабораторных штаммов. На сыровороточно-глюкозном бульоне растет с просветлением среды и выпадением зернистого осадка.

S. uberis на кровяном агаре формирует колонии с зоной β -гемолиза или не дает гемолиз, на оптимальной жидкой питательной среде растет с ее равномерным помутнением.

S. equi subsp. zooepidemicus на кровяном агаре образует мелкие колонии с зоной β -гемолиза, неотличимые от колоний *S. pyogenes*. При посеве материала на среду Эдварда можно установить тип гемолиза стрептококка и способность гидролизовать эскулин. *S. agalactiae* и *S. dysagalactiae* не гидролизуют эскулин, поэтому формируют бесцветные колонии. Колонии гидролизующих эскулин стрептококков (*S. porcinus*, *S. bovis*, *E. faecalis*, *E. avium* и др.) имеют темный цвет.

Использование специальных дифференциально-диагностических сред для выделения энтерококков позволяет подавить рост сопутствующей микрофлоры и ориентироваться при отборе необходимых колоний. На молочном МПА с полимиксином колонии энтерококков округлой формы, с ровными краями, блестящей поверхностью, диаметром 1,5-2 мм, с красноватым оттенком и зоной протеолиза на светло-голубом фоне.

На желчно-цитратном агаре энтерококки образуют колонии розово-красного цвета.

На теллуритовой среде *E. faecalis* растет с образованием колоний черного цвета, *E. faecium* на данной среде не растет.

Для определения скрытой гемолитической способности стрептококков ставят САМР-тест, который обычно используют для идентификации стрептококков серологической группы В (*S. agalactiae*). На кровяной агар бактериологической петлей по диаметру чашки Петри в виде полоски засевают культуру гемолитического штамма *S. aureus*, дающего широкую зону неполного гемолиза. Отступив на 1-1,5 мм, перпендикулярно к штриху стафилококка высевают культуры испытуемых стрептококков в виде горизонтальных полосок (3-4 штамма). САМР-положительные штаммы выделяют диффундирующие метаболиты, которые полностью лизируют клетки эритроцитов в зоне штриха стрептококка, прилегающей к культуре стафилококка, что оценивают как положительный результат. САМР-тест специфичен не только для *S. agalactiae* этот феномен и может быть обнаружен у стрептококков серогрупп и, Е, Р, К, V, G, F.

Идентификация стрептококков и энтерококков на уровне родов

При обнаружении в посевах колоний, сходных с колониями стрептококков, исследуют морфологию и тинкториальные свойства клеток в мазках, окрашенных по Граму. С целью дифференциации от морфологически сходных микрококков и стафилококков проверяют каталазную и оксидазную активность бактерий из подозрительных колоний. Для дальнейшей работы отбирают колонии каталазо- и оксидазоотрицательных культур, отвивают их на оптимальные питательные среды (глюкозо-сывороточный МПБ, кровяной МПА) и подвергают изучению.

С целью дифференциации видов рода *Streptococcus* и *Enterococcus* испытуемые культуры засевают в глюкозо-сывороточный бульон с 40% желчи крупного рогатого скота, 6,5% натрия хлорида, с рН 9,6, а также на бульон обычного состава. Параллельно производят посев на среду Эдвар-

да для выявления гидролиза эскулина. Посевы культивируют при 37-38° С в течение 24 часов, посевы на обычном бульоне выращивают при 45° С. Считается, что для энтерококков и стрептококков серологической группы D характерны рост при 45° С, устойчивость к 40% желчи и гидролиз эскулина, но есть некоторые исключения.

На среде с рН 9,6 растут все энтерококки, из стрептококков только многие штаммы *S. bovis* (D).

При 45° С растут все виды энтерококков, не размножаются гноеродные стрептококки, но могут расти стрептококки группы D.

Среда с 40% желчи. Кроме энтерококков на ней могут расти *S. bovis*, *S. porcinus*, *S. suis*, а также *S. agalactiae* и *S. equinus* (до 90% штаммов) и многие стрептококки ротовой полости.

Среда с 6,5% натрия хлорида. Растут энтерококки. Могут расти до 90% штаммов *S. agalactiae*, *S. porcinus*, из стрептококков ротовой полости — *S. cricetum*, *S. sorbinus*, среди группы «Другие стрептококки» — *S. alactolyticus*.

Принимая во внимание указанные исключения, характер роста на питательных средах и происхождение исследуемого материала, можно с достаточной уверенностью по совокупности признаков отнести выделенные культуры к стрептококкам или энтерококкам.

Идентификация стрептококков и энтерококков на уровне видов и серологических групп. После дифференциации стрептококков от стафилококков и микрококков и разделения на группы стрептококки, энтерококки (плюс стрептококки серологической группы D) приступают к их видовой и серогрупповой идентификации.

Видовую идентификацию стрептококков и энтерококков проводят путем изучения ферментативных характеристик (гидролиз эскулина, гиппурата, расщепление инулина, маннита, раффинозы, салицина, сорбита, лактозы, трегалозы, реакция Фогес—Проскауера), особенностей гемолитической активности (α -, β -гемолиз, САМР-тест), способности к росту на средах с 6,5% натрия хлорида. При этом может быть использован набор тестов, позволяющий дифференцировать основные патогенные виды стрептококков и энтерококков, выделяемых от животных (табл. 8). Либо с учетом видового происхождения материала используют меньшее количество признаков, что дает возможность идентифицировать основные виды стрептококков, выделяемые от данного вида животных.

Таблица 8 - Свойства стрептококков и энтерококков, выделяемых от животных

Вид стрептококка	группа Серологическая	Признаки									
		Образование кислоты							Гидролиз		Рост в средах с 6,2% NaCl
		инулин	лактоза	маннит	раffinоза	салицин	сорбит	третгалоза	эскулин	глицерата	
<i>S. pyogenes</i>	A	-	+	V	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. agalactiae</i>	B	-	+	-	-	(+)	-	+	-	+	-
<i>S. dysagalactiae</i>	C	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. dysagalactiae subsp. equisiniillis</i>	C	-	V	-	-	(+)	-	+	-	-	-
<i>S. equi subsp. equi</i>	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	C	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>		+	+	-	+	V	-	+	(+)	-	-
<i>S. suis mun 1</i>	D(R)	(+)	+	-	(+)	+	-	+	+	-	-
<i>S. suis mun 2</i>	D(S)	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. uberis</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	(+)
<i>S. bovis</i>	D	+	+	+	+	+	-	V	+	-	-
<i>S. quinus</i>	D	+	-	V	+	(+)	-	V	+	-	-
<i>S. porcinus</i>	E (P, U, V)	-	(+)	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>S. canis</i>	G	-	(+)	-	-	+	-	(+)	V	-	-
<i>E. faecalis</i>	D	-	+	+	-	+	+	+	+	V	+
<i>E. avium</i>	Q	-	+	+	-	+	+	+	+	V	(+)

В таблицах 8, 9, 10 представлены критерии дифференциации основных видов патогенных стрептококков, выделяемых от лошадей, крупного рогатого скота, свиней.

Таблица 9 - Дифференциация основных видов стрептококков, выделяемых от крупного рогатого скота

Вид стрептококка	Признаки						Серологическая группа по Лансфилд
	Тип гемолиза	САМР-тест	Гидролиз		Образование кислоты из		
			эскулипа	гиппурата	сорбита	маннита	
<i>S. agalactiae</i>	β	+	-	+	-	-	В
<i>S. dysgalactiae</i>	α	-	-	-	-	-	С
<i>S. pneumoniae</i>	α	-	(+)	-	-	-	-
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	β	-	-	-	+	-	С

Таблица 10 - Дифференциация основных видов стрептококков, выделяемых от свиней

Вид стрептококка	Признаки					Серологическая группа по Лансфилд
	Тип гемолиза	Образование кислоты из				
		иннулина	маннита	сорбита	салицина	
<i>S. porcinus</i>	β (+)	-	+	+	+	Е, Р, U, V
<i>S. suis</i>	β (a)	+	-	-	+	D, R, S
<i>S. pneumoniae</i>	α	d	(-)	-	-	Нет
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	β	-	-	+	+	С

Таблица 11 - Дифференциация стрептококков, выделяемых от лошадей

Вид стрептококка	Признаки				Серологическая группа по Лансфилд
	Тип гемолиза	Образование кислоты из			
		лактозы	сорбита	галактозы	
<i>S. equi subsp. equi</i>	β	-	-	-	C
<i>S. equi subsp. equisimilis</i>	β	-	-	+	C
<i>S. equi subsp. zooepidemicus</i>	β	-	+	-	C

Таблица 12 - Дифференциация энтерококков

Признак	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. seecorum</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hilae</i>
	Рост при 45° С	+	+	+		+	+	+	+
Рост в присутствии 6,5% NaCl	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Тип гемолизина	α	н.д	α	н.	α, β	(β)	(α)	α, β	-
Образование H ₂ S	+	-	н.д	+	-	н.д	н.д	-	н.д
Гидролиз гиппурата	d	-	-	d	d	(+)	+	+	-
Образование кислоты из	Рамнозы	+	(+)	-	н.	-	d	-	-
	Сахарозы	+	+	+	+	-	d	+	+
	Рафинозы	-	+	+	+	-	-	+	d
	Сорбита	+	-	-	-	-	(+)	-	-
	Мяннита	+	+	-	-	(-)	+	(+)	+

При идентификации *S. pneumoniae*, помимо критериев, изложенных в таблице 8, определяют чувствительность к лизису клеток стрептококка желчью (желчными кислотами) и чувствительность к оптохину.

Для проверки на желчеустойчивость 2-3 мл исследуемой культуры, выращенной на сыровоточном бульоне, засевают в 5 мл 10%-ного желчного бульона. Среда становится мутной и ее помещают на час в термостат.

Клетки *S. pneumoniae* растворяются, среда становится прозрачной, зеленящие стрептококки, сходные по типу колоний и гемолиза, не растворяются в желчи. При получении нечетких результатов пробирки оставляют при комнатной температуре на 18-20 часов и затем производят окончательный учет. Можно просто положить крупинку сухой желчи на исследуемую колонию. Колонии *S. pneumoniae* растворяются и исчезают. При наличии натрия таурохолата смешивают равные объемы 10%-ного раствора соли и бульонной культуры, клетки пневмококков растворяются, и смесь становится прозрачной через 10-15 минут.

Чувствительность *S. pneumoniae* к оптохину (этилгидрокупреин HC1) используют для дифференциации от других зеленящих стрептококков. Для этого применяют коммерческие бумажные диски с оптохимом. Исследуемую культуру засевают на кровяной агар, помещают на поверхность среды диски с оптохимом и культивируют 24 часа при 37° С. Как положительный результат расценивают задержку роста от 14 мм и более (при диске 6 мм), что характерно для *S. pneumoniae*. При отсутствии таких дисков может быть использован следующий метод: исследуемую культуру засевают на глюкозо-кровяной агар с оптохином (1:50 000), инкубируют при 37-38° С в течение 20-24 часов. *S. pneumoniae* на этой среде не растет.

Для видовой дифференциации энтерококков используют тесты, представленные в таблице 12, а также тест-систему EN-coccus test.

Серологическая идентификация стрептококков и энтерококков. На клеточной стенке многих стрептококков присутствует термостабильный полисахаридный антиген «С». В соответствии с его антигенными вариантами по системе Лансфилд стрептококки в РП подразделяют на серологические группы, которые обозначают заглавными буквами латинского алфавита.

Известно более 20 серологических групп стрептококков. Серологическая принадлежность патогенных для животных стрептококков представлена в таблице 6. Некоторые виды стрептококков (*S. pneumoniae* и др.) не содержат С-полисахарид и не могут быть классифицированы по систе-

ме Лансфилд. Иммуные серогрупповые стрептококковые сыворотки производит и высылает по заявкам ВГНКИ ветпрепаратов. За рубежом для этих целей имеются коммерческие препараты, позволяющие устанавливать серогрупповую принадлежность в пределах серогрупп А, В, С, D, F и G в тесте латекс-агглютинации или серогрупп А, В, С, F и G в реакции коаггутинации на стекле, ИФА, а также выявлять антигены непосредственно в материале.

Определение серогрупповой принадлежности испытуемой культуры стрептококка в реакции преципитации проводят следующим образом. Стрептококки выращивают в бульоне Хоттингера с 1% глюкозы при 37° С в течение 20 часов. В стеклянные центрифужные пробирки переносят 9 мл выращенной культуры, центрифугируют при 4000 об/мин. 25 минут. Над осадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 0,3-0,4 мл 0,2 N HCl, суспендируют и выщерживают смесь в кипящей водяной бане 10 минут.

Затем пробирки охлаждают водой, добавляют в каждую пробирку каплю 0,04%-ного спиртового раствора фенолфталеина и затем по каплям добавляют 0,2 N раствор NaOH до приобретения раствором бледно-розовой окраски (кислота нейтрализована). Далее смесь вновь центрифугируют (4000 об/мин., 25 минут), над осадочную жидкость используют как растворимый антиген в РП.

Техника постановки реакции преципитации. Берут от пастеровских нинеток капилляры диаметром 0,5-1,0 мм, опускают капилляр концом в флакон с сывороткой и набирают в него сыворотку на длину капилляра 1-1,5 см. Удаляют избыток сыворотки с кончика капилляра, погружают его в пробирку с антигеном и набирают равное количество антигена. Капилляр переворачивают таким образом, чтобы смесь оказалась в середине капилляра, и закрепляют его вертикально в куске пластилина. Через 5 минут учитывают результат. Положительная реакция: образование хлопьев или резкое помутнение в середине столбика.

Биопроба. Используют для определения патогенных свойств культур стрептококков, а также для их выделения из контаминированного материала.

Определение патогенности стрептококков проводят на трех белых мышах массой 14-16 г. Для заражения используют только свежевывеленные 18-20-часовые культуры стрептококков, выращенные на глюкозо-

сынороточном бульоне. Культуру в объеме 0,5 мл вводят внутривентриально. Наблюдение ведут в течение 5 суток, при заражении патогенной культурой мыши погибают в течение 1-2 суток. Из органов павших животных готовят мазки, окрашивают по Граму, на капсулы, микроскопируют. Параллельно производят посевы на глюкозо-кровяной агар и глюкозо-сынороточный бульон.

В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике стрептококков» при диагностике мыта (*S. equisubsp. equi*) рекомендуется исследуемым материалом (гною, истечение из носовой полости, суспензия из лимфатических узлов и органов) заражать подкожно в область спины двух белых мышей массой 12-15 граммов в дозе 0,1 мл (гноя) или 0,5 мл (суспензия тканей). Для выяснения патогенных свойств выделенную бульонную культуру вводят аналогичным способом в объеме 0,1 мл. Наблюдение за животными ведут в течение 10 дней, гибель в положительных случаях наблюдают на 2-7 сутки. Органы и ткани от погибших животных подвергают микроскопическому исследованию и делают высевы на питательные среды. Как положительный результат оценивают гибель хотя бы одной мышки. Для ускоренного выделения *S. pneumoniae* из контаминированного материала можно заражать двух белых мышей исходным материалом — 0,5 мл взвеси в бульоне. Далее через 6-8 часов из брюшной полости берут стерильным шприцом 1-2 капли жидкости и делают дробный высеv на глюкозо-кровяной агар в чашках либо животное убивают в эти же сроки. Посев делают из крови сердца. Из селезенки готовят и микроскопируют мазки-отпечатки.

Идентификация стрептококков и энтерококков на базе планшетных фотометров фирмы «TERMO-Labsystems», «iEMS-Reader» и «Multican-Ascent»

Для идентификации каталазоотрицательных грамположительных кокков фирма «ПЛИВА-Лахема» выпускает две тест-системы: СТРЕПТОтест 16 - для идентификации стрептококков и ЭН-КОККУСтест - для идентификации энтерококков. Для дифференциации этих микроорганизмов используют ПИРАтест - положительный практически у всех клинически значимых энтерококков (из стрептококков этот тест положителен только у *S. pyogenes*).

Идентификация стрептококков с использованием СТРЕПТОтеста 16

СТРЕПТОтест 16 предназначен для определения биохимической активности и идентификации стрептококков по 16 планшетным биохимическим тестам, расположенным в двухрядном вертикальном стрипе: гиппурат, фосфатаза, лейцинаминопептидаза, бета-глюкуронидаза, альфа-галактозидаза, эскулин, аргинин, уреазы, маннитол, сорбитол, трегалоза, лактоза, раффиноза, инулин, мелибиоза и рибоза. Идентификацию дополняют тестами на диагностических полосках: ПИРАтест для выявления пирролидонилариламидазы и ВПтест для выявления образования ацетона. Набор содержит 10 пластин и позволяет провести идентификацию 60 культур.

Методика проведения исследования

Пластинки СТРЕПТОтест 16 (один двухрядный стрип на одну культуру), рамка пластинок с крышкой, суспензионная среда для СТРЕПТОтест 16, физиологический раствор, парафиновое масло, реактивы для тестов гиппурат, фосфатазы, диагностические полоски ПИРАтест и ВПтест (ацетон), реактивы к тестам ПИР и ацетон, стандарт мутности третьей степени по шкале McFarland.

Выделение чистой культуры и приготовление бактериальной суспензии. Выделяют чистую культуру на кровяном агаре (с кровью барана). Инкубацию чашек производят в атмосфере с содержанием 5% CO₂. Учитывают морфологию культуры, проверяют каталазную активность на предметном стекле с 3% перекисью водорода, гемолитическую активность на кровяном агаре, ставят ПИРАтест. Из чистой 24-часовой культуры стрептококков готовят в физиологическом растворе бактериальную суспензию мутностью, соответствующей указанной выше. Для приготовления суспензии удобно использовать ватные тампоны для снятия колоний с питательной среды.

Инокуляция и инкубация

Подготовленную суспензию после тщательного встряхивания инокулируют по 0,1 мл во все 8 лунок первого ряда стрипа (лунки H-A, тесты с HIP по URE). В ампулу с 1 мл суспензионной среды добавляют 1 мл исходной суспензии, встряхивают и инокулируют разведенную суспензию в 8 лунок второго ряда стрипа (лунки H-A, тесты с MAN по RIB). После инокуляции в лунки B и A первого ряда (тесты ARG и URE) добавляют по две капли парафинового масла. В пробирку с исходной суспензией (объем 1 мл) помещают полоску с ВПтестом. Пластинку СТРЕПТОтест 16 и пробирку с ВПтестом инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 и 2 часов соответственно.

Учет результатов и идентификация

После 2 часов инкубации в пробирку с ВПтестом добавляют по три капли реактивов ВПТ1 и ВПТ2, пробирку встряхивают и дополнительно инкубируют при 37 °С в течение 30-40 минут, после чего учитывают результат ВПреакции.

После 24 часов инкубации добавляют реактивы в следующие лунки пластинок: ряд 1-й, лунка Н (тест гиппурат) - две капли реактива на гиппурат; лунка G (тест фосфатаза) - одну каплю реактива на фосфатазу. Инкубируют пластинку 5-10 минут при комнатной температуре для лучшего проявления цветовых реакций и учитывают результаты всех тестов. Тест НР учитывают не позднее 10 минут после добавления реактива, так как по истечении этого времени могут проявиться ложноположительные реакции. Чтение тестов LAP, GLR и GAL проводят на белом фоне.

При оценке СТРЕПТОтеста 16 ориентируются по таблице «Интерпретация реакций», цветной шкале сравнения и/или цветным реакциям контрольных штаммов.

Таблица 13 - Интерпретация реакций

Колонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Ряд 1-й				
Н	Гиппурат	HIP	Синяя	Бесцветная, голубоватая
G	Фосфатаза	PHS	Красно-фиолетовая	Бесцветная, розоватая
L	Лейцинаминопептидаза	LAP	Желтая	Бесцветный
U	Бета-глюкуронидаза	GLR	Желтая	Бесцветная
D	Альфа-галактозидаза	aGA	Желтая	Бесцветная
S	Эскулин	ESL	Черная, темно-коричневая	Бесцветная, светло-коричневая
U	Аргинин	ARG	Красно-фиолетовая, красная	Желтая, светло-оранжевая
Колонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
A	Уреаза	URE	Красная, красно-оранжевая	Желтая, светло-оранжевая
Ряд 2-й				
U	Маннитол	MAN	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
S	Сорбитол	SOR	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная

P	Трегалоза	TRE	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
E	Лактоза	LAC	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
I	Раффиноза	RAF	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
C	Инулин	INU	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
B	Мелибиоза	MLB	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
A	Рибоза	RIB	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная

Идентификацию проводят с помощью идентификационной таблицы или книги кодов для СТРЕПТОтеста 16.

При окончательной идентификации следует учитывать всю дополнительную информацию (микроскопию, характер колоний, наличие пигмента, гемолиз, источник выделения и т. д.).

Идентификация энтерококков с использованием ЭН-КОККУСтеста

Идентификацию энтерококков производят с использованием микро-тест-системы ЭН-КОККУСтест, позволяющей идентифицировать клинически значимые виды рода энтерококков при помощи восьми биохимических тестов: аргинин, сорбоза, арабиноза, маннитол, сорбитол, мелибиоза, раффиноза и мелецитоза, размещенных в однорядном восьмилучном стрипе. Для выявления типичного для рода энтерококков теста - активности пирролидонилариламидазы - предназначен ПИРАтест, поставляемый в форме диагностической полоски.

Методика проведения исследования

Пластинка ЭН-КОККУСтест, рамка пластинки с крышкой, физиологический раствор, парафиновое масло, диагностические полоски и реактив для теста ПИР, стандарт мутности второй степени по шкале McFarland.

Выделение культуры и приготовление бактериальной суспензии. Для идентификации используют чистую культуру, выращенную на кровяном агаре с кровью барана. Для первичной изоляции энтерококков из смешанных культур используют селективные среды. Учитывают морфологию, ставят ПИРАтест для подтверждения принадлежности испытуемого изолята к роду энтерококков. Из чистой 24-часовой культуры энтерококков готовят в физиологическом растворе бактериальную суспензию плотностью, соответствующей указанному выше стандарту мутности.

Инокуляция и инкубация

После тщательного встряхивания подготовленную суспензию инокулируют по 0,1 мл во все лунки стрипа, помещенного в рамку пластинки. После инокуляции в лунку Н (тест аргинин) добавляют две капли парафинового масла. Рамку с инокулированными стрипами инкубируют в течение 24 часов при температуре 37 °С.

Учет результатов и идентификация

По окончании инкубации учитывают результаты всех тестов, используя при этом таблицу «Интерпретация реакций», цветную шкалу сравнения и/или цветные реакции контрольных штаммов.

Таблица 14 - Интерпретация реакций

Код-лунка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Н	Аргинин	ARG	Красно-фиолетовая, красная	Желтая, светло-оранжевая
С	Сорбоза	SOE	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
Г	Арабиноза	ARA	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
Код-лунка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Г	Маннитол	MAN	Желтая, светло-оранжевый	Красная, оранжево-красная
П	Сорбитол	SOR	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
С	Мелибиоза	MLB	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
П	Раффиноза	RAF	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная
А	Мелситоза	MLZ	Желтая, светло-оранжевая	Красная, оранжево-красная

Идентификацию проводят с помощью идентификационной таблицы или индекса, находящихся в инструкции к тест-системе. При окончательной идентификации учитывают всю дополнительную информацию (источник выделения, характер колоний, наличие пигмента, подвижность и т. д.).

Питательные среды

Глюкозо-сывороточный бульон. К свежему стерильному МПБ (рН 7,4-7,6) добавляют 10% стерильной инактивированной при 56° С в течение 30 минут сывотки крови лошади.

Глюкозо-красный агар. К расплавленному МПА с температурой 42-45°С добавляют до 1 %-ный стерильный раствор глюкозы и 5-10% дефибрированной крови барана или кролика. Среду разливают в чашки Петри.

Желчный бульон. К МПБ добавляют необходимое количество нативной желчи крупного рогатого скота (10-40%), устанавливают необходимый рН (7,4-7,6), разливают по пробиркам и стерилизуют при 113-115° С в течение 20-30 минут.

Среда Эдварда. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 10 г сухого мясного экстракта, 1 г эскулина, 5 г натрия хлорида, 0,0013 г кристалвиолета, 0,33 г талия сульфата, 15 г агар-агара; устанавливают рН 7,4; стерилизуют при 115°С 20 минут. К охлажденному до 45°С агару добавляют 5% стерильной крови барана, перемешивают и разливают среду в чашки Петри.

Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда. К 1000 мл расплавленного МПА (45-50°С) добавляют 0,1 ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолий хлорид), 12,5 мл 0,01%-ного водного раствора кристалвиолета, 0,1 г налидиксовой кислоты, 20% обезжиренного молока, 1% глюкозы, 5% стерильной дефибрированной крови. Компоненты перемешивают и разливают по чашкам Петри. ТТХ и налидиксовую кислоту предварительно растворяют в небольшом количестве МПБ.

Желто-цитратная среда для энтерококков. К 100 мл МПА добавляют 20 мл дрожжевого автолизата, 100 мл желчи, 40 г цитрата натрия. Смесь кипятят на водяной бане, добавляют 0,1 г трифенилтетразолия хлористого и 200 ЕД/мл нолмиксина М. Колонии энтерококков на этой среде розово-красного цвета.

Желчно-красный агар Беленького для энтерококков. К 600 мл 3%-ного расплавленного МПА добавляют 400 мл нативной профильтрованной желчи. Стерилизуют при 115° С 30 минут. К охлажденному до 45° С агару добавляют 5% дефибрированной крови и разливают по чашкам Петри. На среде растут энтерококки, но не растут гноеродные и оральные стрептококки.

Молочная среда с полимиксином по Калине (для энтерококков). К 85 мл расплавленного МПА (45°С) добавляют 1,25 мл 0,01%-ного водного раствора кристалвиолета, 0,5 мл 10%-ного водного раствора 2, 3, 5-ТТХ, 15 мл стерильного обезжиренного молока, 20-40 ЕД/мл полимиксина М. Среда, разлитая в чашки Петри, пригодна для использования в течение 7-10 дней при условии хранения в холодильнике (4° С). Колонии энтерококков имеют красноватую окраску с зоной протеолиза.

Щелочно-полимиксиновая среда Калины (для энтерококков). Готовят отдельно три раствора. *Раствор 1:* 23 мл МПБ, 1 г глюкозы, 0,5 г натрия хлорида, 2 г дрожжевого экстракта. *Раствор 2:* 25 мл дистиллированной воды, 0,53 г Na_2CO_3 . *Раствор 3:* 25 мл дистиллированной воды, 0,25 г двуосновного фосфата калия.

Смеси стерилизуют раздельно при 112°С 12 минут, затем смешивают, устанавливают рН 10-10,2, добавляют воды до 100 мл, 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего, 200 ЕД/мл полимиксина М.

Кровяной агар с азидом натрия. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптозы, 3 г сухого мясного экстракта, 5 г натрия хлорида, 0,2 г азид натрия, 12 г агара; устанавливают рН 7,2, автоклавируют при 121° С 15 минут. К расплавленному агару (45°) добавляют 5% стерильной крови овцы, перемешивают и разливают в чашки Петри. Азид натрия подавляет рост многих грамотрицательных бактерий.

Селективная среда с антибиотиками для стрептококков. В расплавленную и охлажденную агаровую среду добавляют 7% дефибрированной крови барана и антибиотики (на 1000 мл среды): налидиксовой кислоты - 7,5 мг, полимиксина В - 17 000 ЕД, неомицина сульфата - 2,12 мг. Каждый антибиотик предварительно растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воды. Готовую среду используют в течение 48 часов при хранении в холодильнике. На среде ингибируется рост стафилококков, синегнойной палочки, энтеробактерий, предотвращается рост протей.

Если после засева материала на поверхность среды положить полоску фильтровальной бумажки (диски), пропитанные бацитрацином (10 ЕД), то можно дифференцировать стрептококки серогруппы А (чувствительные к бацитрацину) от

β-гемолитических стрептококков других групп, устойчивых к бацитрацину.

Агар с ацетатом таллия для энтерококков. Ацетат таллия - 1 г, пептон - 10 г, дрожжевой экстракт - 10 г, глюкоза - 10 г, агар - 13 г, дистиллированная вода - 1000 мл, рН 6. Стерилизуют 15 минут при 118° С, охлаждают и добавляют 10 мл 1%-ного стерилизованного фильтрованием солянокислого трифенилтетразолия.

Лабораторная диагностика энтеробактерий

Представители семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными, аэробными или факультативно анаэробными палочками. Подвижные за счет перетрихальных жгутиков, реже — неподвижные. Большинство видов хорошо растет при 37° С, однако некоторые виды лучше растут при 25-30° С. D-глюкозу и другие углеводы ферментируют с образованием кислоты, а многие виды, кроме того, и газа. Оксидазоотрицательные, каталазоположительные, редуцируют нитраты в нитриты. Распространены повсеместно. Встречаются на растениях, у животных (от червей и насекомых до млекопитающих) и человека. Присутствуют в почве, воде и даже в воздухе. Они существуют как симбионты, сапрофиты или паразиты. По патогенности для человека, животных и растений весьма разнообразны. Отдельные роды (напр., *Ervinia* и др.) известны как фитопатогены, причиняющие урон злакам и картофелю, другие (напр., *Serratia*) распространены в воде, являются фитопатогенами, обитают у насекомых, способны вызывать спорадические инфекции холоднокровных, домашних, диких животных и человека. Многие роды имеют медицинское значение, вызывая желудочно-кишечные болезни, являясь причиной оппортунистических инфекций.

В ветеринарии на первое место выступают роды *Escherichia*, *Salmonella* и *Yersinia*. Кроме того, определенное значение имеют роды *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*. Эти микроорганизмы вызывают желудочно-кишечные болезни и могут быть возбудителями различных внекишечных инфекций, таких, как бактериемия, менингит, инфекции мочевыводящих путей, дыхательных путей, раневые инфекции и др.

Лабораторная диагностика включает: отбор материала для исследований и транспортировку проб; выявление методом световой микроскопии, выделение чистой культуры возбудителя посевом на питательные

среды, идентификацию энтеробактерий по морфологическим, тинкториальным, культуральным серологическим и патогенным свойствам; дифференциацию родов энтеробактерий.

Для прижизненной диагностики используют фекалии, кровь, мочу, молоко. Посмертно в лабораторию направляют трупы мелких животных и птиц целиком, трубчатую кость, долю печени с желчным пузырем, селезенку, почку, брыжеечные лимфоузлы, отрезок тонкого отдела кишечника, перевязанный с двух концов лигатурой (упаковывается отдельно от остального материала), легкие. При абортах с подозрением сальмонеллезной их этиологии (отмечают у конематок и овцематок) для бактериологической диагностики направляют абортированный плод или плодовые оболочки, околоплодную жидкость, истечения из родовых путей, желудок плода, его паренхиматозные органы.

Сбор фекалий осуществляют в стерильную посуду сразу после дефекации. Можно собирать материал непосредственно из прямой кишки с помощью ректальных ватных или ватномарлевых тампонов, укрепленных на деревянной палочке или проволочной петле. Посев фекалий желательнее осуществлять непосредственно после их сбора или в пределах 2-3 часов после сбора. Если это невозможно, материал консервируют хранением при температуре 2-6° С или глицериновой смесью.

Лучшие результаты для получения гемокультуры дает посев крови, взятой в самом начале болезни, однако при отрицательных результатах целесообразен повторный посев крови в течение всего периода лихорадки. В отдельных случаях для посева на гемокультуру можно использовать сгустки крови, направляемой для серологических исследований.

Другой материал отбирают общепринятыми способами. Во всех случаях его берут от животных, не подвергавшихся в последние 10 дней лечению антибактериальными препаратами.

Выделение и первичная идентификация культур энтеробактерий

При наличии паренхиматозных органов или целых трупов (плодов) из исходного материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Энтеробактерий представляют собой грамотрицательные, прямые палочки длиной 1,0-3,0 мкм и диаметром 0,3-0,6 мкм. Располагаются одиночно, реже попарно. Для некоторых характерно наличие капсулы или микрокапсулы. Спор не образуют.

При наличии иного материала исследования начинают с посева на питательные среды. Рекомендуемые плотные и жидкие питательные среды для выделения энтеробактерий в зависимости от исследуемого материала и предполагаемого возбудителя приведены в таблице 15.

Для посева проб материалов, обычно содержащих разнообразную микрофлору (фекалии, околоплодная жидкость и др.), наиболее целесообразно применять высокоселективные среды (висмут-сульфит агар, агар Плоскирева). Для проб, обычно не содержащих или содержащих незначительное количество микроорганизмов (кровь, паренхиматозные органы и др.), — слабоселективные дифференциальные среды (агары Левина, Эндо). Однако, учитывая возможность выделения из фекалий и другого материала в качестве возбудителей не только патогенных, но и условно-патогенных энтеробактерий, которые могут сильно подавляться на высокоселективных средах, оптимальным является одновременное применение тех и других сред. При исследовании проб, в которых концентрация возбудителя, скорее всего, низка, целесообразно использовать среды накопления. Фекалии перед посевом на плотные среды суспендируют в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:10. При взятии материала ректальным тампоном его погружают в среду обогащения (накопления). Пробирки с посевами помещают в термостат, а по окончании инкубации (12-18 час) делают высевы на плотные селективные среды.

Цитратную кровь засевают в жидкие среды накопления в соотношении 1:10. Для посева сгустков крови после их асептического «обведения» и отсывания сыворотки сгусток растирают в пробирке стеклянной палочкой и вносят в среду накопления в соотношении 1:10. После посева крови или сгустков крови и инкубации в термостате (12-18 час) ежедневно в течение 3 дней делают высев на плотные среды. При отрицательных результатах высевы повторяют еще на 6-е и 10-е сутки.

Мочу после центрифугирования или без него засевают в среды накопления двойной концентрации в соотношении 1:1.

Посев другого материала осуществляют общепринятыми в бактериологии методами. Посевы инкубируют при температуре 37° С на плотных питательных средах в течение 18-24 часов (48 часов на висмут-сульфит агаре), в средах обогащения максимальный срок инкубации посевов не должен превышать 18 часов (кроме крови). Посевы для выделения иерсиний инкубируют при 25-26° С. Чашки с посевами на эти микроорганизмы про-

смаатривают через 18-20 часов и повторно на вторые сутки термостатирования.

Характеристика колоний энтеробактерий на плотных селективно-дифференциальных средах представлена в таблице 13. Более подробная характеристика колоний энтеробактерий определенных родов изложена в соответствующих разделах.

Колонии, полученные на селективно-дифференциальных средах и характерные для энтеробактерий, отсевают на питательные среды для получения чистых культур, которые используют для родовой дифференциации энтеробактерий.

Таблица 15 - Питательные среды, рекомендуемые для первичного выделения энтеробактерий

Исследуемый материал	Энтеробактерии, которые могут содержаться в исследуемом материале	Плотные (селективные) среды						Жидкие (среды накопления)									
		Плоскирева	Висмут-сульфит	Левина	Эндо	Мак-Колки	Миника	Магничная	Селенитовая	Моллера или Кауржана	Кишечная	Раппопорт	Глеккоцкий бульон	Буферная (Ющенко)	К-1	П-1	ЭТ-1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Шкала-ции, отходы, фекалии, моча, испражнения	<i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Yersinia</i> <i>Proteus</i> <i>Morganella</i>	+++ +++ +++ +++ +++ +++	+	+++ +++ +++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++ +++ +++	+	+	+	+	+						+
Кровь	<i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Yersinia</i>			+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++		+					+	+				+
Моча	<i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Yersinia</i>	+++ +++ +++ +++	+	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+	+	+	+	+					+	+
Паренхиматозные органы, органы пищеварения	<i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Yersinia</i>	+++ +++ +++ +++ +++	+	+++ +++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++ +++	+	+	+	+	+			+		+	+

При дифференциации родов энтеробактерий ключевое значение имеет изучение биохимических и физиологических свойств, являющихся генетически более стабильными (табл. 15). Кроме сред Гисса с соответствующими индикаторами и реактивами, для идентификации энтеробактерий могут быть использованы различные диагностические системы, позволяющие сократить и упростить исследования. Так, системы индикаторные бумажные (СИБ), представляющие собой диски или полоски хроматографической бумаги с необходимыми субстратами и индикаторами, а также диски из фотопленки с желатином, выпускаются в виде двух наборов (изготовитель — предприятие по производству бактериальных препаратов Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии). Набор «А» (малый) предназначен для межродовой дифференциации энтеробактерий по 9 основным биохимическим свойствам: утилизации цитрата натрия, малоната натрия, ферментации лактозы, наличию (β -галактозидазы, фенилаланиндезаминазы, уреазы, лизиндекарбоксилазы, образование индола, сероводорода (табл. 16).

Системы мультимикротестов для идентификации микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, выпускаемые НПО «Алерген» (г. Ставрополь), включают два набора. Набор ММТ Е1 позволяет определить 12 ключевых ферментативных свойств энтеробактерий: образование сероводорода, индола, наличие лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, уреазы, фенилаланиндезаминазы, утилизацию цитрата натрия, малоната натрия, маннита, сахарозы, лактозы, сорбита. Набор ММТ Е2 позволяет определить 12 дополнительных биохимических свойств, которые в сочетании с 12 ключевыми свойствами служат для видовой идентификации энтеробактерий: наличие аргининдегидролазы, бетта-галактозидазы, нитратредуктазы, утилизация инозита, дульцита, арабинозы, рамнозы, мальтозы, адонита, раффинозы, салицина, глюкозы.

После изучения биохимических и физиологических свойств культур заключительным этапом анализа является серологическая идентификация. Антигены и антигенная структура сальмонелл, эшерихий, отчасти протей и клебсиелл изучены достаточно глубоко. Менее известна антигенная структура иерсиний.

Из числа известных антигенов энтеробактерий значение для серологической идентификации имеют три: О-, К- и Н-антигены.

О-антиген (соматический) расположен в клеточной стенке бактерий. Он представляет собой липополисахариδο-протеиновый комплекс. Липид связан с токсигенностью, белок обуславливает иммуногенность, полисахарид является компонентом, определяющим антигенную специфичность.

Таблица 17 - Основные дифференцирующие признаки некоторых родов и видов семейства *Enterobacteriaceae*

Признаки	<i>Esche- richia</i>	<i>Sal- mo- nella</i>	<i>Yer- sinia</i>	<i>Kleb- siella pneu- monia</i>	<i>Mor- ganella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Serratia marces- cens</i>	<i>Hafnia</i>
Образование индола	+	-	P	-	+	P	-	-
Проба с метиленовым красным	+	+	+	X	+	+	X	X
Реакция Фогес-Проскауера	-	-	-	+	-	P	+	X
Цитрат (среда Симмонса)	-	+	-	+	-	P	+	-
Образование H ₂ S	-	+	-	-	-	P	-	-
Гидролиз мочевины	-	-	P	+	+	+	X	-
Лизиндекарбоксилаза	+	+	P	+	-	-	+	+
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	+	+	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	X	+	P	-	+	P	+	+
Подвижность	+	+	+*	-	+	+	+	+
Образование кислоты из:								
лактозы	+	-	P	+	-	-	-	-
маннита	+	+	+	+	-	-	+	+

Обозначения: «-» — 0—10% штаммов положительны; «X» — признак варьирует у различных штаммов; «+» — штаммов положительные; «P» — признак различен в разных видах рода; «+*» — подвижны при температуре ниже 30° С.

О-антиген устойчив к физико-химическим воздействиям. Выдерживает нагревание при 120° С в течение 2-2,5 часов, сохраняя основные антигенные свойства. На него не оказывают действия спирт, 0,5%-ный раствор формалина, нормальный раствор хлористоводородной кислоты (N HCl) и некоторые другие химические вещества.

Полноценный О-антиген характерен для S-форм (гладких) бактерий. Появление S => R мутаций затрудняет серологическую идентификацию энтеробактерий, а иногда делает ее невозможной.

К-антигены (оболочечные) являются кислыми полисахаридами. Расположены более поверхностно, чем О-антигены, вследствие чего иногда полностью их экранируют. Последнее может явиться причиной инвазивности.

табильности живых К+ (плюс) бактерий в О-сыворотках (например, эшерихий).

К-антигены серологически обособлены и не дают перекрестных реакций. Они менее устойчивы к воздействиям различных факторов и являются неоднородными в этом отношении. В зависимости от свойств, устойчивости к химическим факторам и термоустойчивости К-антигены обозначают как А-, В-, L-, М- и Vi-антигены.

H-антигены (жгутиковые) имеют белковую природу (флагеллин). Энтеробактерии являются перитрихами (жгутики расположены по всей поверхности клетки). В ряде случаев H-антигены могут иметь фазовые вариации. H-антигены термолабильны. Обработка 0,5-1%-ным раствором формалина не влияет на антигенные свойства H-антигенов.

Характерные для каждого рода особенности О-, К- и H-антигенов и антигенная структура бактерий представлены в соответствующих разделах. На основании данных об антигенной структуре энтеробактерий проводят их серологическую идентификацию.

Таблица 18 - Определение рода энтеробактерий по тестам СИБ

Тест или субстрат	Роды энтеробактерий									
	Escherichia	Edwardsiella	Citrobacter	Salmonella	Shigella	Klebsiella	Enterobacter	Hafnia	Serratia	Proteus
Лактоза	+/x	-	+/-	P	P	P	+	-	-	-
Рибозитол-арабиноза	+	-	+	P	P	+	+	+	+	-
Цитрат аммония	-	-	+	+	-	P	+	+	+	P
Младенцы пектин	-	-	P	P	-	P	+	P	-	-
Меланилин	-	-	+	-	-	P	P	-	-	P
Оксид аланин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Цинк	+	+	-	+	-	P	P	+	+	P
Нитрит и нитрат-редуктаза	-	+	P	+	-	-	-	-	-	P
Уреаза	+/-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Слизь	+	+	P	+	P	P	-	-	-	P

Обозначения: «+» — положительная реакция; «-» — отрицательная реакция; «x» — реакция с запозданием и не всегда положительная; «Р» — реакция различна у разных видов рода; «р» — реакция различна у разных штаммов или сероваров.

Идентификация микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* на базе планшетных фотометров фирмы «TERMO-Labsystems», «iEMS-Reader» и «Multican-Ascent»

Идентификацию микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* производят с использованием микротест-систем:

- ММТ-Е1 и ММТ-Е2
- ЭНТЕРОтест 24
- ЭНТЕРОтест 16
- ЭНТЕРО-Рапид 24
- ЭНТЕРО-Скрин

и диагностических полосок:

- КОЛИтест
- САЛМтест

Применение систем мультимикротестов ММТ-Е1 и ММТ-Е2

Системы мультимикротестов ММТ-Е1 и ММТ-Е2 предназначены для определения биохимической активности и последующей идентификации наиболее распространенных представителей семейства энтеробактерий и дифференциации их от некоторых бактерий из семейства вибрионов в течение 18-24 часов. Они представляют собой целиковые 96-луночные планшеты. Каждый планшет предназначен для проведения идентификации восьми культур.

ММТ-Е1 позволяет определить двенадцать ключевых тестов: образование сероводорода, индола, наличие лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, уреазы, фенил аланиндезаминазы, утилизация цитрата натрия, малоната натрия, маннитола, сахарозы, лактозы и сорбитола.

ММТ-Е2 позволяет определить двенадцать дополнительных биохимических свойств, которые в сочетании с перечисленными ключевыми тестами служат для видовой идентификации энтеробактерий: наличие аргининдегидролазы, бета-галактозидазы, нитратредуктазы; утилизация инозитола, дульцитола, арабинозы, рамнозы, мальтозы, адонитола, раффинозы, салицина, глюкозы.

Методика проведения исследования

Дополнительно к планшетам ММТ-Е1 и Е2 необходимы стерильная дистиллированная вода, реактивы для тестов: фенилаланин, индол, нитра-

ты, стерильное вазелиновое масло и отечественный стандарт мутности на 10 единиц.

Выделение культуры и приготовление бактериальной суспензии. Используют чистую культуру грамотрицательных палочек со среды Эндо или кровяного агара. Ставят тест на ферментацию глюкозы (ОГ-тест) на среде Хью-Лейфсона для установления принадлежности выделенной культуры к группе ферментирующих микроорганизмов и тест на оксидазу для дифференциации энтеробактерий от вибрионов и других оксидазоположительных культур. Готовят суспензию в стерильной свежеприготовленной дистиллированной воде (при хранении рН воды снижается, что может повлиять на результаты биохимических реакций). Конечная мутность суспензии должна соответствовать указанному выше стандарту.

Инокуляция планшетов и их инкубация

Приготовленную суспензию инокулируют по 0,15 мл в каждую лунку соответствующих горизонтальных рядов планшетов. После инокуляции в лунки №1,3, 4, 5, 7 (тесты: сероводород, лизин, индол, орнитин, уреаза соответственно) планшета ММТ-Е1 и в лунку № 1 (аргинин) планшета ММТ-Е2 добавляют по две капли вазелинового масла. Планшеты инкубируют в течение 18-24 часов при температуре 35-37 °С.

Учет результатов и идентификация

По окончании инкубации добавляют реактивы в следующие лунки: ММТ-Е1 - № 4 - две капли реактива на индол, № 10 - одну каплю реактива на фенилаланин; ММТ-Е2 - № 12 - реактивы на нитраты: одну каплю раствора соляной кислоты и затем одну каплю раствора риванола.

Учитывают результаты планшетных тестов визуально с помощью таблицы «Интерпретация реакций» и заносят их в бланки (учет результатов теста на бета-галактозидазу проводят дважды: через 3-5 часов и через 18-24 часа, так как у некоторых штаммов желтое окрашивание к конечному сроку инкубации исчезает).

Таблица 19 - Интерпретация реакций

№ п/п	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
1	Образование сероводорода	H ₂ S	Черная, темно-серая	Бесцветная, светло-серая
2	Углевождение маннитола	МАН	Желтая, оранжевая	Красная
3	Наличие лизиндикарбоксилазы	ЛИЗ	Синяя, сине-зеленая	Желтая, зеленая

4	Образование индола	ИНД	Розовая, розовато-коричневая	Бесцветная
5	Наличие орнитин-декарбоксилазы	ОРН	Синяя, сине-зеленая	Желтая, зеленая
6	Утилизация цитрата натрия	ЦИТ	Синяя, сине-зеленая	Желтая, зеленая
7	Наличие уреазы	УРЕ	Малиновая, розовая	Желтая
8	Утилизация мало-ната натрия	МАЛ	Синяя, сине-зеленая	Желтая, зеленая
9	Утилизация сахарозы	САХ	Желтая, оранжевая	Красная
	Тест п/п		Результат (цветовая реакция)	
		Код	Положительный	Отрицательный
10	Наличие дезаминазы фенилаланина	ФЕН	Зеленая, темно-зеленая	Желтая
11	Утилизация лактозы	ЛАК	Желтая, оранжевая	Красная
12	Утилизация сорбитола	СОР	Желтая, оранжевая	Красная
ММТ-Е2				
1	Наличие аргининдегидролазы	АРГ	Синяя, сине-зеленая	Желтая, зеленая
2	Наличие бета-галактозидазы	ГАЛ	Желтая	Бесцветная
3	Утилизация инозитола	ИНО	Желтая, оранжевая	Красная
4	Утилизация дульцитола	ДУЛ	Желтая, оранжевая	Красная
5	Утилизация арабинозы	АРА	Желтая, оранжевая	Красная
6	Утилизация рамнозы	РАМ	Желтая, оранжевая	Красная
7	Утилизация мальтозы	МАТ	Желтая, оранжевая	Красная
8	Утилизация адонитола	АДО	Желтая, оранжевая	Красная
9	Утилизация раффинозы	РАФ	Желтая, оранжевая	Красная
10	Утилизация салицина	САЛ	Желтая, оранжевая	Красная
11	Утилизация глюкозы	ГЛЮ	Желтая, оранжевая	Красная
12	Наличие нитратредуктазы	НИТ	Темно-бордовая, бордовая	Желтая, оранжевая

Идентификацию проводят с помощью таблиц «Биохимическая характеристика энтеробактерий» с учетом данных микроскопии, характера роста, О/Ф-теста, оксидазной активности, подвижности, наличия пигмента, источника изоляции и др.

Применение микротест-систем ЭНТЕРОтест 24

ЭНТЕРОтест 24 предназначен для определения биохимической активности и идентификации наиболее важных для патологии человека

микроорганизмов семейства энтеробактерий и дифференциации их от некоторых представителей семейства вибрионов в течение 18-24 часов. Система представляет собой стриппированный планшет, содержащий четыре трехрядных вертикальных стрипа для определения 24 биохимических тестов: индол, сероводород, лизин, орнитин, уреазы, аргинин, цитрат Симмонса, малонат натрия, фе-нилаланин, бета-галактозидаза, инозитол, адонитол, целлобиоза, сахароза, трегалоза, маннитол, ацетоин (реакция Фогеса-Проскауэ-ра), эскулин, рамноза, сорбитол, мелибиоза, раффиноза, дульцитол, глюкоза. Набор ЭНТЕРОтест 24 содержит 10 пластинок и позволяет провести идентификацию 40 культур.

Методика проведения исследования

ЭНТЕРОтест 24 - на каждую исследуемую культуру один трехрядный стрип, рамка для ЭНТЕРОтест 24, стерильный физиологический раствор (рН 6,5-7,2), диагностические полоски ОКСИ-тест, реактивы для тестов индол, фенилаланин, ацетоин, оксидаза, парафиновое масло и стандарт мутности первой степени по шкале McFarland.

Выделение культуры и приготовление бактериальной суспензии.

Используют чистую культуру грамотрицательных бактерий со среды Эндо, агара MacConkey или кровяного агара. Ставят тест на ферментацию глюкозы (О/Ф-тест) на среде Хью-Лейфсона для установления принадлежности выделенной культуры к группе ферментирующих микроорганизмов и тест на оксидазу для дифференциации энтеробактерий от вибрионов и других оксидазоположительных культур. Готовят суспензию в физиологическом растворе мутностью, соответствующей стандарту, указанному выше.

Инокуляция и инкубация

Приготовленную суспензию инокулируют по 0,1 мл во все 24 лунки соответствующего стрипа. После инокуляции в лунки Н, G, F, E, D и C первого ряда стрипа (тесты: индол, сероводород, лизин, орнитин, уреазы, аргинин соответственно) добавляют по две капли парафинового масла. Инокулируют инокулированную пластинку в термостате в течение 18-24 часов при температуре 35-37 °С.

Учет результатов и идентификация

По окончании инкубации добавляют реактивы в следующие лунки: ряд 1-й, лунка Н (тест индол) - две капли реактива на индол; ряд 3-й, лунка Н (тест ацетоин) - по одной капле реактива ВПТ 1 и ВПТ 2. Пластинку дополнительно инкубируют 30 минут при температуре 35-37 °С. Через 30 минут в лунку Н второго ряда стрипа (тест фенилаланин) добавляют одну каплю реактива на фенилаланин и немедленно учитывают результат этого

теста, так как цвет положительной реакции может исчезнуть через 2 минуты. Учитывают результаты всех тестов и заносят их в бланк.

При оценке ЭНТЕРОтест 24 ориентируются по таблице «Интерпретация реакций», цветной шкале и/или по цветным реакциям контрольных штаммов.

Таблица 20 - Интерпретация реакций

Колонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
Ряд 1-й				
H	Индол	IND	Красная, розовая	Желтоватая
G	Сероводород	H ₂ S	Черная, темно-серая	Бесцветная, светло-серая
F	Лизин	LYS	Синяя, сине-зеленая	Зеленая, желто-зеленая
E	Орнитин	ORN	Синяя, сине-зеленая	Зеленая, желто-зеленая
D	Уреаза	URE	Красная, оранжево-красная	Желтая, бледно-оранжевая

Колонка	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
C	Аргинин	ARG	Синяя, сине-фиолетовая	Зеленая, зелено-синяя
B	Цитрат Симмонса	SCI	Синяя, сине-зеленая	Желтая, желто-зеленая
A	Малонат	MAL	Синяя, сине-зеленая	Желтая, желто-зеленая
Ряд 2-й				
H	Фенил аланин	PHE	Темно-зеленая, зеленая	Желтая, желто-коричневая
G	Бета-галактозидаза	ONP	Желтая, бледно-желтая	Бесцветная
F	Инозитол	INO	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
E	Адонитол	ADO	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
D	Целлобиоза	CEL	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
C	Сахароза	SUC	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
B	Трегалоза	TRE	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
A	Маннитол	MAN	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
Ряд 3-й				

II	Ацетонин	VPT	Красная, розовая	Бесцветная, бледно-розовая
CI	Декулин	ESL	Черная, темно-коричневая	Бесцветная, светло-коричневая
III	Сорбитол	SOR	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
IV	Рамноза	RHA	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
D	Мелибиоза	MLB	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
Код- панель	Тест	Код	Результат (цветовая реакция)	
			Положительный	Отрицательный
С	Раффиноза	RAF	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
U	Дульцит	DUL	Желтая, желто-зеленая	Зеленая
L	Глюкоза	GLU	Желтая, желто-зеленая	Зеленая

Идентификацию проводят с помощью идентификационной таблицы или книги кодов для ЭНТЕРОтест 24. При окончательной идентификации учитывают всю дополнительную информацию: микроскопию, О/Ф-тест, оксидазную активность, характер колоний, наличие пигмента, подвижность, источник выделения и т. д.

Использование диагностических полосок САЛМтест и КОЛИтест для ускоренной предварительной идентификации сальмонелл и кишечной палочки

Диагностические полоски САЛМтест предназначены для обнаружения сальмонелл при скрининговых исследованиях в санитарной микробиологии, пищевой промышленности, а также в клиническом материале и т. д. Диагностика основана на выявлении типичного для рода сальмонелл признака - активности С8-эстеразы. Высокая чувствительность теста по отношению к роду сальмонелл вместе с несложным выполнением и скоростью, с которой получают результаты реакции, позволяют применять САЛМтест для предварительной идентификации сальмонелл. Такая упаковка диагностических полосок позволяет провести 50 определений.

Принцип действия

С8-эстераза гидролизует 4-метилумбеллиферрил каприлат, содержащийся в индикаторной зоне полоски. Освобожденный 4-метилумбеллиферрон под источником УФ-излучения дает синюю флуоресценцию, регистрируемую как положительная реакция.

Методика постановки САЛМтеста

- Используют 24-часовую культуру, подозрительную на сальмонеллы со среды Эндо, агара с бриллиантовым зеленым, MacConkey агара, агара с эозин-метиленовым синим (примечание: для обнаружения присутствия сальмонелл неподходящими являются среды, предназначенные для обнаружения продукции сероводорода - черный преципитат затрудняет учет реакции на диагностической полоске).

- Добавляют на зону индикации полоски приблизительно 10 мкл реактива для САЛМтест.

- При помощи инокуляционной петли втирают испытуемую культуру в зону полоски; в случае роста чистой культуры (или же достаточно друг от друга изолированных колоний на агаровой среде) можно бактериальный рост снимать с поверхности агара непосредственно зоной полоски.

- Полоску инкубируют 10-15 минут при комнатной температуре.

- Параллельно ставят отрицательный контроль: добавляют реактив на зону полоски и инкубируют без нанесения бактериальной культуры.

- По истечении указанного времени учитывают реакции под УФ-лампой с длиной волны приблизительно 360 нм. Считывание реакций необходимо выполнять в темноте, лучше всего в специальной установке, предназначенной для оценки флюоресценции (например шкаф Гансена), положительная реакция проявляется возникновением синей флюоресценции в индикаторной зоне полоски.

- Штаммы с положительной реакцией подтверждают дальнейшей идентификацией, например при помощи набора ЭНТЕРО-Скрин (время инкубации 4 часа).

Питательные среды

Консервирующие смеси используют при отсутствии необходимых условий и сред для посева в течение 3-4 ч с момента взятия материала. Обычно объем консервирующей смеси должен составлять $\frac{2}{3}$ от объема материала, взятого для исследования.

Глицериновая смесь. Смешивают 1000 см³ изотонического раствора хлорида натрия и 500 см³ глицерина, затем добавляют 20%-ный раствор натрия фосфорнокислого (Na₂HPO₄) в таком количестве, чтобы pH смеси соответствовал 7,8-8,0. Смесь стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 мин.

Фосфатная буферная смесь. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 0,45 г калия фосфата однозамещенного (KH₂HPO₄) и 5,34 г натрия фосфата двузамещенного (Na₂HPO₄). Стерилизуют 30 мин при 121° С.

Боратно-буферный раствор. Смешивают 57 г кристаллической буры, 84 г борной кислоты, 99 г натрия хлорида. Затем 20 г полученной смеси растворяют в 1000 см³ дистиллированной воды. Стерилизуют 10 мин при 121° С.

Среды обогащения

Желчный бульон. Применяют в качестве среды обогащения для сальмонелл, выделяемых из крови или материалов, не содержащих или содержащих в незначительных количествах другие виды бактерий.

Желчь крупного рогатого скота наливают в колбу и нагревают 1 ч текучим паром. После отстаивания фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 мин. К 800 см³ МПБ добавляют 200 см³ желчи, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 мин.

Среда Мюллера. Используют для накопления сальмонелл.

К 4,5 г простерилизованного сухим жаром химически чистого мела (CaCO₃) добавляют 90 см³ МПБ или бульона Хоттингера и стерилизуют 30 мин при 121° С. Перед посевом к бульону асептически добавляют 2 см³ раствора Люголя (калия иодид — 25 г, йод кристаллический — 20 г, вода дистиллированная — до 100 см³) и 10 см³ раствора натрия тиосульфата (натрия тиосульфат — 50 г, вода дистиллированная до 100 см³). Смесь перемешивают и разливают по пробиркам.

Среда Кауфмана. Используют для накопления сальмонелл.

К 100 см³ стерильной среды Мюллера асептически добавляют 5 см³ стерильной желчи (желчь стерилизуют дробно, текучим паром 3 дня подряд по 30 мин) и 5 см³ 0,1%-ного водного раствора бриллиантового зеленого. Разливают по пробиркам. Не стерилизуют.

Среда Киллиана. Используют для накопления сальмонелл.

К 100 см³ стерильного МПБ или бульона Хоттингера (рН 6,7-6,9) непосредственно перед применением добавляют 1 см³ 0,1%-ного водного раствора бриллиантового зеленого.

Селенитовая среда. Используют для накопления сальмонелл. Для приготовления используют два раствора. Раствор 1. К 950 см³ раствора фосфатов (натрия гидрофосфат безводный — 7 г, натрия дигидрофосфат безводный — 3 г) на дистиллированной воде добавляют 5 г пептона и 4 г левина. Разливают во флаконы по 50 см³ и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин или 30 мин при 112° С. При приготовлении рас-

твора количественное соотношение фосфатов подтитровывают так, чтобы при добавлении пептона и натрия селенита готовая среда имела рН 6,9-7,1. Раствор хранят при 4-10° С 1-2 мес.

Раствор 2. В 40 см³ стерильной дистиллированной воды растворяют 4 г натрия гидроселенита (NaHSeO₃). Раствор готовят непосредственно перед приготовлением среды.

В каждый флакон с 50 см³ раствора 1 асептически добавляют 2 см³ раствора 2, перемешивают и разливают по пробиркам.

Магниева среда. Используют для накопления сальмонелл. Для приготовления используют два раствора. Раствор 1. К 890 см³ дистиллированной воды добавляют 4,2 г пептона, 7,15 г натрия хлорида, 1,43 г калия дигидрофосфата (KH₂PO₄ и 9 см³ дрожжевого автолизата.

Раствор 2. В 90 см³ дистиллированной воды растворяют 35,7 г магния хлорида (MgCl₂ x 6H₂O). Растворы смешивают и добавляют 0,9 см³ 0,5%ного водного раствора бриллиантового зеленого. Разливают по пробиркам и стерилизуют 30 мин при 112° С.

Среда Минка. Используют для накопления эшерихий, обладающих адгезивными антигенами. Раствор 1 (фосфатный буферный раствор рН 7,5). Берут 1,36 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH₂PO₄), 10,1 г натрия фосфорнокислого двузамещенного (Na₂HPO₄ x 7H₂O) и растворяют в дистиллированной воде до конечного объема 1000 см³. Стерилизуют 30 мин при 115° С.

Раствор 2. 10 г магния сульфата (MgSO₄ x 7H₂O), 1 г марганца хлорида (MnCl₂ x 4H₂O), 0,135 г железа хлорного (FeCl₃ x 6H₂O) и 0,4 г кальция хлорида (CaCl₂ x H₂O) растворяют в дистиллированной воде до конечного объема 1000 см³. Стерилизуют 30 мин при 115° С.

Раствор 3. 5 см³ гидролизата лактальбумина (или ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата) растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин.

Раствор 4. 5 г глюкозы растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин.

Раствор 5. 26 г агара «Дифко» растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Стерилизуют 30 мин при 115° С.

Приготовленные растворы асептически соединяют в следующем соотношении: раствор 1-500 см³; раствор 2-1 см³; раствор 3-20 см³; раствор 4-20 см³; раствор 5-460 см³ при 50° С.

Среда Ющенко-Дунаева. Используют для накопления иерсиний. В 990 см³ дистиллированной воды растворяют 8,5 г натрия хлорида, добавляют 3 см³ 1/15 М раствора натрия гидрофосфата (Na₂HPO₄ x 12H₂O) и 7 см³ 1/15 М раствора калия дигидрофосфата (KH₂PO₄). Устанавливают рН 7,2, фильтруют, разливают по пробиркам и стерилизуют 10 мин при 116° С или 30 мин текучим паром.

Среда ЭТ-1. Используют для накопления сальмонелл. К 1000 см³ МПБ или бульона Хоттингера (рН 7,4-7,6) добавляют 2 г глюкозы и 2 см³ 5%-ного спиртового раствора розоловой кислоты. Смесь кипятят на водяной бане 15-20 мин, добавляют 25 000 ЕД полимиксина и асептически разливают по пробиркам.

Для приготовления 5%-ного спиртового раствора розоловой кислоты 0,5 г розоловой кислоты растворяют в 10 см³ спирта-ректификата, после чего добавляют 90 см³ дистиллированной воды.

Среда П-1. Используют для накопления протеев. В 1000 см³ стерильного бульона Хоттингера растворяют 1 г манита, 5 г желчных солей по Олькеницкому, 0,8 г калия дигидрофосфата (KH₂PO₄), 20 см³ 0,01%-ного водного раствора кристаллвиолета. Кипятят в водяной бане 15-20 мин. Добавляют 10 см³ 50%-ного водного раствора мочевины и 1 000 000 ЕД полимиксина. Асептически разливают по пробиркам.

Для приготовления желчных солей по Олькеницкому к 1000 см³ бычьей или свиной желчи добавляют 40 г натрия гидроокиси и автоклавируют 3 ч при 1,5 атм. Добавляют 100 см³ 20%-ного раствора бария хлорида (BaCl₂ x 2H₂O), автоклавируют 1 ч при 100° С и оставляют на 12-18 ч при комнатной температуре. Над осадочную жидкость сливают, фильтруют и добавляют 20%-ный раствор соляной кислоты (до кислой реакции), оставляют на 12-16 ч при комнатной температуре. После этого сливают, промывают водой и добавляют 40%-ный раствор натрия гидроокиси (до щелочной реакции). Полученный раствор солей высушивают при 115° С.

Среда К-1. Используют как селективную и для накопления клебсиелл. В 1000 см³ стерильной дистиллированной воды растворяют 5 г натрия хлорида, 0,2 г магния сульфата (MgSO₄ x 7H₂O), 2 г калия дигидрофосфата (KH₂PO₄), 2 г калия гидрофосфата (K₂HPO₄), 2 г раффинозы, 2 см³ 1,6%-ного щелочного раствора бромтимолового синего, 20 см³ 0,1%-ного водного раствора кристаллвиолета. Кипятят 15-20 мин на во-

для бане, добавляют 4 см³ 50%-ного раствора мочевины и асептически разливают по пробиркам.

Для приготовления 1,6%-ного щелочного раствора бромтимолового синего в 80 см³ дистиллированной воды растворяют 1,6 г бромтимолового синего, 20 см³ 0,25 N раствора натрия гидроокиси.

Среда Эндо. Селективная среда для энтеробактерий. Выпускается в сухом виде. Состоит из агара, основного фуксина, натрия сульфата, натрия фосфата, лактозы. Для посевов используют свежеприготовленную среду. В 100 см³ дистиллированной воды растворяют 5 г сухой среды, кипятят при постоянном перемешивании 2-3 мин и разливают по чашкам Петри. Для предотвращения образования большого количества конденсата среду после кипячения охлаждают до 50° С. Готовая среда имеет розовый цвет. Колонии лактозоположительных бактерий красные, лактозоотрицательных — бесцветные или слегка розоватые.

Среда Левина. Селективная среда для энтеробактерий. К 100 см³ расплавленного и охлажденного до 60-70° С 2%-ного агара Хоттингера (рН 7,2-7,4) добавляют 2 см³ 0,5%-ного водного раствора метиленового синего (подогретого на водяной бане до 60-70° С), 1,5 см³ 2%-ного раствора эозина, 2 г лактозы и 0,2 г калия фосфорнокислого двуосновного (K₂HPO₄). Перемешивают, разливают по чашкам Петри и подсушивают. Перед добавлением в среду раствора красителей стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин. Готовая среда имеет фиолетовый цвет. Колонии эшерихий синего или черного цвета, сальмонелл — бесцветные или розовые, протей — оранжевые, с измененным цветом среды вокруг колонии.

Агар Мак-Конки (таурохолевый агар). Селективная среда для энтеробактерий. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 20 г пептона, 5 г натрия хлорида, 2,5 г натрия таурохолата, 10 г лактозы, 0,1 г нейтрального красного, 20 г агара. Смесь стерилизуют 20 мин при 121° С.

Агар Плоскирева. Селективная среда для сальмонелл. Выпускается в сухом виде. Состоит из агара с желчными солями, натрия цитрата, натрия тиосульфата, натрия фосфата, лактозы, нейтрального красного, бриллиантового зеленого, соды кальцинированной, йода, натрия хлорида. Готовая среда прозрачная или розовато-желтого цвета. Лактозоположительные штаммы сальмонелл образуют колонии красного цвета, лактозоотрицательные штаммы — бесцветные.

Висмут-сульфит агар. Селективная среда для сальмонелл. Выпускается в сухом виде. Состоит из агара, гидролизата рыбы, глюкозы, висмута нитрата, натрия сульфита, соли Мора, натрия фосфата, бриллиантового зеленого. Готовая среда имеет зеленоватую окраску. Штаммы сальмонеллы, продуцирующие сероводород, образуют черные колонии с окрашиванием агара под колонией в черный цвет. Штаммы сальмонелл, не продуцирующие сероводород, образуют бесцветные или зеленоватоборичневые колонии.

Среда Рапопорта. Селективная среда для сальмонелл. Состав: МПБ или бульон Хоттингера — 900 см³, желчь бычья — 100 см³, глюкоза — 20 г, индикатор Андрее — 10 см³. Ингредиенты смешивают, разливают по 50 см³ во флаконы с поплавками. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин.

Среда Ворфеля-Фергюсона. Используют для лучшего образования капсулы у клебсиелл. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 2 г натрия хлорида, 1 г калия сульфата (K₂SO₄), 0,25 г магния сульфата (Mg SO₄ × 7H₂O), 20 г сахарозы, 88 см³ дрожжевого экстракта (или 2 г сухого дрожжевого экстракта), фильтруют через бумажный фильтр, разливают по пробиркам и стерилизуют 15 мин при 121° С.

Бульон с 0,2% глюкозы. Используют для лучшего образования капсулы у клебсиелл. Берут 1000 см³ МПБ или бульона Хоттингера (рН 7,2-7,4). В небольшом его объеме, нагретом до 40-50° С, растворяют 2 г глюкозы и смешивают с оставшимся бульоном. Разливают по пробиркам и стерилизуют 30 мин при 112° С.

Дифференциально-диагностические среды

Среда Штерна. Используют для дифференциации сальмонелл. К 1000 см³ МПБ или бульона Хоттингера добавляют 2,5 см³ 10%-ного насыщенного спиртового раствора основного фуксина, 16,6 см³ 10%-ного водного раствора натрия сульфита (Na₂SO₄) и 10 см³ глицерина. Разливают по пробиркам и стерилизуют 15 мин при 112° С. Готовая среда имеет желтую окраску. Если испытуемая культура относится к *S. typhimurium*, которая способна ферментировать глицерин, то среда приобретает фиолетовый оттенок.

Среда Буттера. Используют для дифференциации сальмонелл. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 0,05 г пептона, 0,5 г натрия цит-

рата, 5 г натрия хлорида, 5 г рамнозы (или арабинозы). Кипятят на водяной бане 3-5 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Разливают по пробиркам и стерилизуют 30 мин при 112° С или текучим паром 3 дня подряд по 30 мин. Если испытуемая культура относится к сальмонеллам, способным ферментировать рамнозу или арабинозу (*S. typhimurium*), то при добавлении к суточной культуре (выращенной на данной среде) 2 капель 0,5%-ного спиртового раствора метилового красного среда приобретает красную окраску.

Среда для посева по Свену-Гарду. Используют для выявления у сальмонелл специфической фазы жгутикового антигена. К 1000 см³ МПБ или бульона Хоттингера добавляют 8 г агара и растворяют путем кипячения на водяной бане. Устанавливают рН 7,2-7,4, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют 30 мин при 121° С.

Среды с аминокислотами. Используют для определения способности энтеробактерий в анаэробных условиях расщеплять левовращающие аминокислоты — лизин, орнитин, аргинин. В 600 см³ дистиллированной воды растворяют 5 г пептона и 1 г глюкозы, устанавливают рН 6,0-6,1. Приготовленный раствор разливают по 150 см³ в четыре колбы. В каждую из трех колб вносят по 10 г одной из аминокислот. Четвертая колба остается в качестве контрольной. Содержимое всех колб кипятят на водяной бане 5-10 мин, устанавливают рН 6,0-6,1. Во все четыре колбы вносят по 0,6 см³ 1,6%-ного спиртового раствора бромкрезолового пурпурного или бромтимолового синего и по 5 см³ 0,1%-ного спиртового раствора крезолового красного. Разливают в агглютинационные пробирки по 2-3 см³ и стерилизуют 30 мин при 110° С.

Для проведения теста в пробирки, содержащие аминокислоту, и в контрольную пробирку засевают испытуемую культуру, после чего заливают стерильным вазелиновым маслом (слоем толщиной 10 мм) и инкубируют. Учет проводят в течение 4 сут. При положительной реакции среды с аминокислотами приобретают фиолетовую или синюю (в зависимости от индикатора) окраску, в контрольных пробирках среда имеет желтую окраску.

Состав 1,6%-ного спиртового раствора бромкрезолового пурпурного бромкрезоловый пурпурный — 1,6 г, спирт этиловый 96° — 100 см³.

Состав 0,1%-ного спиртового раствора крезолового красного: крезоловый красный — 0,1 г, спирт этиловый 96° — 100 см³.

Среды, содержащие органические кислоты. Используют для дифференциации сальмонелл по их способности расщеплять органические кислоты (тарtratoы, мукаты, натрия цитрат). В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, добавляют 8,5 см³ 0,1 N раствора натрия гидроокиси, 12 см³ 0,25%-ного водного раствора бромтимолового синего, 10 г D-тарtratoа (или одну из следующих кислот: 5 г L-тарtratoа, 5 г мезо-тарtratoа, 10 г мукаата, 10 г натрия цитрата). Устанавливают рН 7,4, разливают в пробирки и стерилизуют 20 мин при 112° С. Готовая среда синезеленого цвета. При положительной реакции в процессе инкубации среда с культурой приобретает зелено-желтую окраску.

Для получения более четких результатов в конце срока инкубации в пробирки с сомнительной или отрицательной реакцией добавляют несколько капель насыщенного раствора ацетата свинца, в результате при отрицательной реакции выпадает обильный осадок (до ²/₃ объема среды), при положительной — выпавший осадок незначителен.

Среда с триптофаном. Используют для определения у бактерий наличия триптофандеаминазы. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 2 г DL-триптофана. Устанавливают рН 6,7-6,9. Для определения способности бактерий к дезаминированию триптофана испытуемую агаровую культуру бактериологической петлей вносят в пробирку с 0,5 см³ раствора триптофана и инкубируют 30 мин при 37° С, после чего вносят 1 каплю 10%-ного водного раствора железа хлористого трехвалентного (FeCl₃). При положительной реакции среда приобретает темно-красную окраску, при отрицательной — желтую.

Среда с калием цианидом. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 0,225 г калия дигидрофосфата (KH₂PO₄), 5,64 г натрия гидрофосфата (Na₂HP0₄). Устанавливают рН 7,6, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют 30 мин при 112° С. После стерилизации быстро охлаждают. Среду этого состава используют в качестве контрольной. Непосредственно перед применением к 100 см³ среды асептически добавляют 1,5 см³ свежеприготовленного 0,5%-ного водного раствора калия цианида (KCN), разливают по пробиркам и закрывают корковыми пробками.

Пробу считают положительной, если через 24-48 ч после посева культуры в среде заметно помутнение или опалесценция. При отрица-

тельном результате среда остается абсолютно прозрачной, в то время как в контрольной пробирке заметно помутнение.

Среда Клиглер. Используют для определения образования сероводорода. В 1000 см³ МПБ растворяют при кипячении 20 г пептона, 5 г натрия хлорида, 0,4 г натрия сульфида, 0,08 г натрия тиосульфата, 20 г агара. Устанавливают рН 7,8, затем снова кипятят, фильтруют через бумажный фильтр и добавляют 0,5 г железа сернистого, растворенного в небольшом количестве воды, 10 г лактозы, 1 г глюкозы и 12 см³ 0,2%-ного раствора фенолрота в 50%-ном спирте. Среду разливают по 6-7 см³ в пробирки и стерилизуют 30 мин при 112° С. Среда имеет оранжево-красную окраску. При образовании сероводорода среда окрашивается в черный цвет.

Среда Кларка. Используется для постановки реакции Фогес-Проскауэра и пробы с метиловым красным для определения окисления глюкозы с образованием 2-кетоглюконата. В 100 см³ дистиллированной воды растворяют 0,5 г калия гидрофосфата (K₂HPO₄), 0,7 г пептона, 0,5 г глюкозы. Кипятят 2-3 мин, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 6,9, разливают по пробиркам и стерилизуют 15 мин при 111° С.

Реакцией Фогес-Проскауэра выявляют промежуточный продукт расщепления глюкозы — ацетилметилкарбинол (ацетоин). Для этого испытываемую культуру выращивают на среде Кларка 4-5 дней в 2 пробирках. Одну пробирку культивируют при 25° С, другую при 37° С. Из обеих пробирок по 1 см³ культуры переносят в другие пробирки и добавляют 0,6 см³ 5%-ного спиртового раствора а-нафтола, смесь перемешивают. Затем добавляют 0,2 см³ 40%-ного водного раствора КОН. Тщательно перемешивают и инкубируют 1 ч.

Учет реакции проводят через 15 и 60 мин. Положительная реакция — вишневое окрашивание среды.

Тестом с метиловым красным устанавливают снижение рН среды при расщеплении глюкозы до 4,4-6,0. Раствор метилового красного готовят добавлением к 0,1 г метилрота 300 см³ 95%-ного этанола. После растворения красителя добавляют 200 см³ дистиллированной воды.

Для постановки теста в пробирку с 5 см³ среды Кларка вносят петлю испытываемой культуры и инкубируют 2-5 сут при 25° С. Затем добавляют 5-6 капель реактива метиловый красный и следят за изменением окраски. При положительном результате (рН 4,0-6,0) среда приобретает красный

цвет. При отрицательном результате (рН 6,0-7,0) среда приобретает желтый цвет.

Среда с мочевиной по Кристенсену. Используют для определения способности бактерий к гидролизу мочевины (уреазная активность) с образованием аммиака и углекислоты. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 1 г пептона, 5 г натрия хлорида, 2 г калия дигидрофосфата (КН₂РO₄), 20 г агара. Смесь стерилизуют 20 мин при 115° С. Затем вносят 1 г глюкозы и 6 см³ 0,2%-ного раствора фенилрота, стерилизуют текучим паром 1 ч, охлаждают до 50° С и асептически добавляют 100 см³ 20%-ного водного раствора мочевины, стерилизованного фильтрацией. Среду разливают по пробиркам и скашивают.

Испытуемую культуру засевают на поверхность скошенного агара и культивируют 1-4 сут. Положительный результат (зашелачивание среды) — красно-малиновое окрашивание среды.

Среда Симмонса. Используют для определения способности бактерий утилизировать цитрат как единственный источник углерода. Состав: агар — 20 г, NaCl — 5 г, MgSO₄ x 7H₂O — 0,2 г, K₂HP0₄ — 1 г, NH₄ x H₂PO₄ — 1 г, C₆H₅O₇Na₃ x 5H₂O — 3 г, бромтимоловый синий — 0,08 г, воды дистиллированная — 1000 см³.

В дистиллированной воде растворяют агар. Соли растворяют отдельно в небольшом объеме воды и затем смешивают с агаром, до объема 1000 см³. Устанавливают рН 7,2, добавляют 40 см³ 0,2%-ного водного раствора бромтимолового синего. Среду перемешивают, разливают в пробирки по 5-7 см³ и стерилизуют 15 мин при 121° С. После автоклавирования агар скашивают.

Испытуемую культуру засевают на поверхность агара и инкубируют. При положительном результате отмечают рост культуры на среде и изменение ее цвета с оливкового на синий.

Среда с алгинатом натрия. Используют для определения способности бактерий утилизировать натрия алгинат как единственный источник углерода. Состав среды аналогичен составу среды Симмонса, но вместо натрия цитрата вносится 2,5 г натрия алгината. Положительным считают изменение цвета среды. Микроорганизмы, не обладающие способностью усваивать натрия алгинат, на данной среде не растут.

Среды Гисса. Используют для изучения способности ферментации углеводов с образованием кислоты и газов. Состав: пептон — 10 г, натрия

хлорид — 5 г, вода дистиллированная — 1000 см³, 0,1%-ный индикатор Андрее, углевод 0,5% (адонит, глицерин, сорбит, дульцит, целлобиоза, раффиноза, трегалоза, салицин, арабиноза, мальтоза, рамноза, ксилоза) или 1,0% (глюкоза, лактоза, маннит, сахароза).

В дистиллированной воде растворяют навески пептона, натрия хлорида, добавляют индикатор, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 7,1-7,2 и стерилизуют 15 мин при 111 ° С. Затем добавляют углевод. Приготовленную среду разливают по пробиркам и стерилизуют 15 мин при 110° С.

Среда для выявления фенилаланиндезаминазы. Состав: сухой дрожжевой экстракт—3 г, натрий хлористый — 5 г, L-фенилалапин — 1 г, Na₂HPO₄ — 1 г, агар — 12 г, вода дистиллированная — 1000 см³. Смешивают воду и дрожжевой экстракт, нагревают, добавляют компоненты и кипятят до расплавления агара, рН среды 7,0-7,2. Горячую среду фильтруют, разливают в пробирки по 2-3 см³ и стерилизуют 30 мин при 112° С. Среду скашивают.

Испытуемую культуру засевают штрихом по поверхности агара и через сутки инкубации добавляют на поверхность культуры несколько капель 10%-ного водного раствора железа хлорида (FeCl₃). При дезаминировании фенилаланина среда окрашивается в зеленый цвет, при отрицательном результате сохраняется желтое окрашивание.

Среда для выявления β-галактозидазы. В 100 см³ расплавленного и охлажденного до 40-45° С МПА асептически добавляют 20 см³ 1%-ного водного раствора О-нитрофенил-β-D-галактопиранозид. Среду разливают по пробиркам.

Испытуемую культуру засевают уколом петлей до дна пробирки. Посевы инкубируют 24 ч при 37° С.

При положительной реакции среда окрашивается в желтый цвет одним из конечных продуктов гидролиза О-нитрофенил-β-D-галактопиранозида О-нитрофенолом.

Среды для выявления лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы и чргининдегидролазы. Состав: мясная вода — 400 см³, пептон — 5 г, глюкоза — 1 г, вода дистиллированная — 600 см³, 0,1%

ной спиртовой раствор крезолового красного — 5 см³, 1,6%-ный спиртовой раствор бромкрезолового пурпурного — 0,6 см³, L-лизин (или орнитин, или аргинин) — 10 г.

Мясную воду, пептон, глюкозу и дистиллированную воду смешивают, устанавливают рН 6,0-6,1. Вносят аминокислоту, кипятят 8-10 мин, добавляют индикатор и разливают в агглютинационные пробирки по 3 см³. Стерилизуют 30 мин при 110° С. Цвет среды розовый.

Испытуемую культуру засевают в среды с аминокислотами (опыт) и среду безаминокислоты (контроль). Во все пробирки вносят стерильное вазелиновое масло до получения слоя в 4-5 мм. Пробирки инкубируют 4 дня при 37° С.

При положительной реакции (защелачивание среды) наблюдается фиолетовое окрашивание в опытных пробирках и желтое — в контрольной.

Среда для определения пиразинамидазной активности у *Y. enterocolitica*. Состав: трипсинизированный соевый агар — 30 г, дрожжевой экстракт сухой — 3 г, пиразинкарбоксамид — 1 г, трисмалат буфер 0,2 М, рН 6,0-1000 см³.

Составные части среды смешивают и подогревают на водяной бане до полного растворения. Разливают по 5 см³ в пробирки, стерилизуют 30 мин при 112° С и скашивают.

Среда для определения кальцийзависимости роста у *Y. enterocolitica*. В качестве питательной основы используют коммерческую среду для определения чувствительности бактерий к антибиотикам (агар АГВ).

К стерильному расплавленному и охлажденному до 50° С агару добавляют (из расчета на 100 см³) 8 см³ 0,25 М стерильного натрия щавелевокислого, среду тщательно перемешивают и вносят 4 см³ 0,5 М стерильного раствора магния хлорида. Готовую среду разливают по чашкам Петри.

Определение индолообразования. Испытуемую культуру выращивают в пробирке с бульоном Хоттингера. В пробирку с культурой вносят 2-3 капли эфира, тщательно ее встряхивают, оставляют в покое до отстаивания на поверхности среды слоя эфира. Осторожно добавляют 0,5 см³ реактива Эрлиха, выдерживают 5 мин и учитывают результат. При

наличии индолообразования слой эфира приобретает розово-красный цвет.

Для приготовления реактива Эрлиха в 95 см³ 96%-ного этанола растворяют 1 г парадиметиламинобензальдегида и добавляют 20 см³ концентрированной хлористоводородной кислоты (НС1).

Лабораторная диагностика колибактериоза

Род *Escherichia* в настоящее время объединяет 6 видов бактерий. Практически важное для ветеринарии значение имеет один вид — *E. coli*. Естественным местом обитания *E. coli* является толстый отдел кишечника человека, млекопитающих животных, птиц, многих пресмыкающихся, рыб и насекомых. С испражнениями эшерихии попадают во внешнюю среду (почва, вода, пищевые продукты и др.), где могут сохраняться в течение нескольких месяцев.

Являясь представителями резидентной (постоянной) микрофлоры кишечника, эшерихии у здоровых животных старше 20-30, дневного возраста не превышают 1-2% от общей численности бактерий кишечника. Из-за особенностей становления кишечной микрофлоры у новорожденных животных первых дней жизни и до 2-3, недельного возраста число эшерихии может достигать 50% и более. Если среди них преобладают энтеропатогенные, токсигенные варианты, а животные имеют недостаточную иммунную защиту (что часто бывает у молодняка), то развиваются кишечные инфекции эшерихиозной этиологии: колибактериоз телят, поросят, ягнят, кроликов, собак, птиц; у поросят отечная форма. Транслокация эшерихий из кишечника в кровяное русло является причиной развития у разных животных септицемии, у свиноматок симптомокомплекса ММА (метрит-мастит-агалактия), у коров и других животных мастита, может стать причиной воспаления слизистых оболочек урогенитального, респираторного тракта, осложнять раневые инфекции и т.д.

Колибактериоз (эшерихиоз) — остропротекающая инфекционная болезнь молодняка животных всех видов, включая птиц. Протекает в септической или энтеритной (колидиарей) формах, у поросят-отъемышей — еще и в форме энтеротоксемии (отечная форма), у птиц — в виде септицемии, реже — в виде сальпингита и колигранулематоза. Возбудителем болезни являются энтеропатогенные эшерихий вида *E. coli*.

Бактериологическое исследование

Для исследования используют свежие трупы мелких животных и птиц целиком, трубчатая кость, доля печени с желчным пузырем, селезенка, почка, сердце, перевязанное лигатурой у аорты, брыжеечные лимфоузлы, отрезок тонкого кишечника, перевязанный с двух сторон. При направлении трупов целиком в лаборатории, помимо указанного материала, исследуют еще и головной мозг.

Для прижизненной диагностики в лабораторию могут направляться фекалии, кровь.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из поступившего материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Эшерихий являются мелкими (1,0-3,0x0,3-0,6 мкм) прямыми палочками. Грамотрицательные.

Выделение и идентификация культур патогенных эшерихий

Культивирование. Эшерихий — факультативные анаэробы, обладающие дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 37- 38° С, рН среды 7,0-7,2, хорошо растут на всех широко используемых в лабораторной практике питательных средах.

Исследуемый материал высевают на плотные селективно-дифференциальные среды Эндо, или Левина, или Мак-Конки и среду с сорбитом. Посевы инкубируют при 37° С в течение 18-24 часов. По истечении этого срока посевы просматривают и отбирают 10 колоний (5, выросших после посева фекалий или соскобов со слизистой кишечника, и 5 — от других органов, в т.ч. брыжеечных лимфатических узлов), типичных для эшерихий, которые пересевают в МПБ, на МПА и среду Минка (при наличии колоний слизистой консистенции, т.е. тянущихся за петлей, их обязательно отсевают на среду Минка) в чашках, разделенных карандашом для стекла на 10 секторов (каждую колонию на 2 среды в отдельный пронумерованный сектор). При подозрении или целенаправленном исследовании на отечную болезнь поросят (энтеротоксемию) дополнительно пересевают несколько колоний на кровяной агар в чашке, разделенной на соответствующее количество секторов. С чашек с культурами на среде с сорбитом отсевают 3-4 колонии S-формы серовато-белого цвета в пробирки со скошенным МПА. Культуры, выделенные от птиц, на МПА и среду Минка не пересевают. Их высевают в специальные питательные среды для изучения биохимических свойств.

Характер роста эшерихий на питательных средах. На плотных питательных средах эшерихий образуют круглые с гладкой, вышуклой поверхностью, ровным краем, диаметром 2-4 мм колонии. На МПА колонии полупрозрачные, сероватого цвета. На средах Эндо, Левина и Мак-Конки за счет ферментации лактозы и закисления среды приобретают цвет индикаторов: на среде Эндо - красные, малиново-красные с металлическим блеском или без него; на среде Левина — темно-синие, фиолетовые, черные с металлическим блеском или без него; на среде Мак-Конки — розовые, красные (отдельные штаммы эшерихий могут не ферментировать лактозу и формировать на перечисленных средах бесцветные колонии). На среде с сорбитом эшерихий серогруппы O157 (варианты O157:H7 и O157:H), вызывающие диарею животных с признаками геморрагического гастроэнтерита, образуют серовато-белые колонии S-формы. Колонии эшерихий других серогрупп — красно-малинового цвета. Колонии штаммов, образующих гемолизин, на кровяном агаре окружены зоной гемолиза. В МПБ рост эшерихий проявляется в виде равномерного помутнения среды с образованием легко разбивающегося осадка.

Обнаруженные на данном этапе исследований эшерихий с гемолитическими свойствами, выделенные от поросят-отъемышей с признаками отечной болезни (из содержимого тонкого отдела их кишечника и (или) брыжесчных лимфатических узлов), относят к возбудителю отечной болезни (энтеротоксемии) поросят.

Морфология клеток эшерихий в культуре. В мазках, приготовленных из культур, эшерихий обнаруживают в виде грамтрицательных, мелких (1,0-3,0x0,3-0,6 мкм) прямых палочек с закругленными концами. В поле зрения микроскопа располагаются одиночно, реже попарно. Спор не образуют. Некоторые (штаммы серо групп 08, 09, 020, 0101) образуют капсулу или микрокапсулу. Большинство подвижно за счет перетрихальных жгутиков, но встречаются и неподвижные.

Идентификация эшерихий по ферментативным признакам. Выделенные чистые культуры микроорганизмов с характерными для эшерихий культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами окончательно относят к роду *Escherichia* и виду *E.coli* на основании изучения их ферментативных свойств. Ориентируясь на критерии к *E.coli* относят штаммы, образующие индол, не образующие H_2S , дающие положительную реакцию с метиловым-красным (среда окрашивается в розово-

красный цвет) и отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра (среда расширяется в желтый цвет), не растущие на среде Симмонса, не расщепляющие мочевины, образующие лизиндекарбоксилазу. Большая часть эшерихий образует орнитиндекарбоксилазу, ферментирует манит. Все (за редким исключением) сбраживают лактозу.

На данном этапе исследований диагноз на колибактериоз считают установленным в том случае, если выделены чистые культуры *E. coli* не менее чем из двух ниже указанных органов и тканей: селезенки, крови, крови сердца, костного мозга, головного мозга свежего трупа животного без изучения патогенных свойств штаммов и установления их серогрупповой принадлежности. В остальных случаях устанавливают патогенность выделенных культур.

Серологическая идентификация. Важнейшую информацию о патогенных свойствах эшерихий получают при определении их антигенной структуры. Клетки эшерихий содержат три вида антигенов: О — соматический; К — оболочечный и Н — жгутиковый.

О-антиген термостабилен (выдерживает нагревание при 100° С в течение 2,5 часов). Является липополисахаридо-протеиновым комплексом, неоднороден, и на его основе эшерихий делят на группы (более 160 О-групп).

К-антигены поверхностные, оболочечные (кислые полисахариды, редко протеины). По своим свойствам их подразделяют на три типа: С-антиген термолабильный, инактивируется при 100° С в течение часа;

В-антиген в этих же условиях теряет агглютинабельность; А-антиген термостабильный, инактивируется при 120° С в течение 2,5 часов, имеется у слизистых капсулообразующих эшерихий О-групп 08,09,020,0101; Н-антиген термолабильный, инактивируется при 60° С в течение 1 часа, белок, располагается в фимбриях (пилях), пронизывающих клеточную стенку, поэтому в последнее время его чаще называют фимбриальным антигеном.

К-антигены покрывают О-антиген и делают клетки эшерихий иннагглютинабельными в гомологичных О-сыворотках. Они обладают адгезивными свойствами, т.е. с их помощью бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам кишечника. Адгезивные антигены являются фактором патогенности, который изучается у чистых культур *E. coli* в первую оче-

Н-антиген — жгутиковый, состоит из протеина, термолабилен, имеет несколько десятков разновидностей, определяемых в РА. Для диагностики существенного значения не имеет. Сочетание О-, К- и Н-антигенов характеризует серологический вариант (серовар) эшерихий.

Ведущая роль в развитии колибактериоза принадлежит эшерихиям с адгезивными антигенами К88, К99, F41, F18, 987P, А20 и др. Наличие этих адгезинов можно выявить в реакции агглютинации на стекле или в ELISA-тесте с соответствующими антисыворотками. В нашей стране наиболее распространенным методом выявления адгезивных антигенов у эшерихий является РА. Для этой цели промышленностью выпускается набор агглютинирующих сывороток к адгезивным антигенам эшерихий. Этот набор включает моновалентные агглютинирующие сыворотки к антигенам К88, К99, F41, 987P, А20 и поливалентную агглютинирующую сыворотку, представляющую собой смесь моновалентных сывороток в равных объемах. Сыворотки выпускаются в сухом виде во флаконах по 0,5 см³, что обеспечивает сохранение их специфической активности на срок не менее 5-ти лет.

Постановка РА. В ампулу (флакон) с сухой сывороткой добавляют растворитель (дистиллированная вода или физиологический раствор) до первоначального объема сыворотки (0,5 см³), затем растворителем разводят поливалентную сыворотку в соотношении 1:2, а моновалентные — 1:10 (рабочий титр). Разведенные сыворотки хранят в пробирках (флаконах) под резиновой пробкой при температуре 4-10° С до 3 месяцев. По внешнему виду разведенные сыворотки должны представлять собой прозрачную или слегка опалесцирующую бледно-розовую жидкость. Мутные сыворотки, проросшие плесенью или другими микроорганизмами, с обильным осадком к употреблению непригодны.

Для выявления антигенов К88, 987P и А20 используют культуры эшерихий, выращенные на МПА или агаре Хоттингера, для обнаружения антигенов К99 и F41 — на среде Минка. В обоих случаях посевы инкубируют при 37-38° С в течение 20-24 часов.

Культуры эшерихий, выделенные от птиц, для выявления адгезивных антигенов не используют. Выросшие культуры исследуют в РА на стекле вначале с поливалентной, а затем (в случае положительной реакции) с моновалентными сыворотками. С этой целью каплю поливалентной сыворотки наносят на предметное стекло, бактериологической петлей

берут испытуемую культуру и тщательно растирают с сывороткой. Реакцию учитывают в течение одной минуты при легком покачивании стекла при температуре от 18 до 28° С. Контролем служит испытуемая культура, смешанная с каплей физиологического раствора (рН 7,2 -7,4) и с каплей нормальной кроличьей сыворотки, разведенной 1:10 (для исключения самоагглютинации культуры).

Положительная реакция характеризуется склеиванием микробных клеток в зерна или хлопья различной величины и полным или частичным просветлением сыворотки при отсутствии агглютинации в контроле.

Эшерихии, давшие положительную реакцию агглютинации с одной из сывороток, считают возбудителем колибактериоза (колидиарей).

Наличие адгезивных антигенов у энтеропатогенных эшерихии (ЕРЕС) имеет определенную связь с хозяевами этих возбудителей и О-серогруппами (табл. 21).

Культуры эшерихии на скошенном МПА, полученные после переноса серовато-белых колоний со среды с сорбитом (не ферментирующие этот многоатомный спирт), исследуют с агглютинирующей колик-сывороткой О157 в РА на стекле. Реакцию ставят с живыми культурами. Для исключения самоагглютинации бактериальных клеток культуру исследуют с 0,85%-ным раствором натрия хлорида. При отсутствии агглютинации в контроле и ее наличии на стекле с коли-сывороткой О157 исследуемые эшерихии относят к возбудителю колибактериоза.

Таблица 21 - Распространение адгезивных антигенов у ЕРЕС в зависимости от хозяина и О-серогрупп

Адгезивные антигены	Хозяин	Главные О-группы, носители антигенов
К 9Н	Поросята	08.0141.0147.0149.0157
9Н71*	Поросята	09.020.0141
К 99	Поросята, телята, ягнята	08. 09. 020, 0101
Г 11	Телята	09. 101
1Н	Поросята	н.д.
А 70	Телята, ягнята	н.д.

Со штаммами, давшими отрицательную реакцию агглютинации, а также со штаммами выделенными от птиц, проводят дальнейшие диагностические исследования. При этом определяют их О-групповую принадлежность в РА с поливалентными и моновалентными агглютинирующими

ми О-коли-сыворотками или изучают их патогенность в биопробе на белых мышах (штаммы, выделенные от млекопитающих) или цыплятах (штаммы, выделенные от птиц).

Серогрупповая принадлежность эшерихии определяется в реакции агглютинации на стекле и в пробирочной реакции агглютинации. Для этого выпускаются наборы агглютинирующих О-коли-сывороток, включающие моновалентные сыворотки к О-антигенам 30 основных серогрупп ЕРЕС, и четыре поливалентные, каждая к О-антигенам 6-8 серогрупп. Агглютинирующие О-коли-сыворотки выпускают во флаконах в жидком виде. Пригодные к использованию сыворотки представляют собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета.

Ход определения. 1. Испытуемый штамм выращивают на МПА при 37-38° С в течение 18-24 часов, смывают физиологическим раствором, переносят в стерильные пробирки, прогревают в течение часа в водяной бане при температуре 100° С для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антигенов или автоклавируют при температуре 120° С в течение 2-2,5 часов для разрушения термостабильного А-антигена. Если во взвеси бактерий после кипячения или автоклавирования образуются хлопья или зернистость (R-форма), то ее не используют для реакции. Прогретую взвесь бактерий центрифугируют при 3 тыс. об/мин в течение 20 минут, надосадочную жидкость сливают, а осадок используют в качестве антигена для постановки реакции на стекле. Оставшуюся часть антигена разводят стерильным физиологическим раствором по оптическому стандарту мутности до концентрации 500 млн. микробных клеток в 1см³ и используют для постановки пробирочной реакции агглютинации.

2. На предметное стекло наносят по одной капле каждой из четырех поливалентных сывороток. В каждую из них бактериологической петлей вносят осажденную центрифугированием культуру и хорошо перемешивают. Реакция протекает при комнатной температуре, учитывают ее в течение 3 минут. Положительная реакция характеризуется образованием мелкозернистого аг-глютината и полным или частичным просветлением жидкости. При отрицательном результате антиген остается в капле сыворотки в виде равномерной взвеси.

3. Каждый антиген, агглютинирующийся одной из поливалентных сывороток, исследуют в реакции агглютинации на стекле с моновалентными, разведенными 1:10, сыворотками, входящими в состав данной по-

дивалентной сыворотки, а затем в пробирочной реакции агглютинации с осадкой сывороткой, давшей положительную реакцию на стекле.

4. Пробирочную РА ставят в обычных серологических или бактериологических пробирках в объеме 1 мл.

Сыворотку разводят стерильным физиологическим раствором от 1:25 до титра, указанного на этикетке. Для приготовления исходного разведения в 2,4 см³ физиологического раствора добавляют 0,1 см³ сыворотки. По все другие пробирки разливают по 0,5 см³ физиологического раствора. Из исходного разведения 0,5 см³ смеси переносят во вторую пробирку, из второй — в третью и т.д. Каждое разведение готовят отдельной пипеткой. Содержимое каждой пробирки смешивают. Из первой пробирки удаляют 1,5 см³, из последней — 0,5 см³ антигена, имеющего концентрацию 300 млн. микробных тел в 1 см³.

Одновременно ставят контроли:

а) антиген + физиологический раствор (для исключения самоагглютинации);

б) сыворотка в разведении 1:25 без антигена (для исключения флуклюации).

Штатив с пробирками встряхивают и выдерживают 16-18 часов при температуре 37° С и 6-8 часов при комнатной температуре.

5. Положительная реакция характеризуется просветлением жидкости и образованием на дне пробирки осадка в форме раскрытого зонтика, который при встряхивании распадается на мелкие хлопья или комочки.

Реакцию считают отрицательной, когда на дне пробирки образуется осадок в виде пуговки (диска), который при встряхивании разбивается в равномерную взвесь. Аналогичный результат должен быть в контрольных пробирках.

6. В том случае, когда поливалентные О-коли-сыворотки не агглютинируют в РА на стекле, антиген, прогретый при температуре 100° С, и суспензию из исследуемых бактерий автоклавируют при температуре 120° С в течение 2 -2,5 часов.

Полученный антиген исследуют в пробирочной РА с сыворотками серогрупп 08, 09, 020 и 0101.

7. Исследуемый штамм относят к той О-группе, с сывороткой которой он вступает в реакцию до титра или не ниже половины титра сыворотки.

Определение серогрупповой принадлежности эшерихий имеет важное диагностическое значение, поскольку по морфологическим, ферментативным и культуральным свойствам патогенные и непатогенные разновидности эшерихий не отличаются друг от друга. В то же время установлено, что из более чем 160 O-серогрупп известных в настоящее время эшерихий лишь около 40 являются основными возбудителями колибактериоза (эшерихиоза) у животных и птиц (табл. 22). Отнесение изучаемого штамма к одной из этих серогрупп дает основание для постановки диагноза на колибактериоз.

е) Определение патогенных свойств *E.coli*. Патогенность изучаемых штаммов эшерихий может быть установлена в биопробе на белых мышках или цыплятах. Для этого испытуемый штамм выращивают на МПА при 37-38° С в течение 18-24 часов, смывают стерильным физиологическим раствором, готовят суспензию концентрацией 1 млрд. микробных клеток в 1 см³ по оптическому стандарту мутности и вводят внутривентриально по 0,5 см³ трем белым мышам массой 14-16 г или трем цыплятам 3-4-недельного возраста (при исследовании материала от птиц). Наблюдение за зараженными животными проводят в течение трех суток. В случае гибели двух и более зараженных мышей или цыплят выделенный штамм признают патогенным и считают возбудителем инфекции.

Таблица 22 - Основные серогруппы эшерихий, патогенные для животных

Виды животных и патология	Основные серогруппы ЕРЕС
1. Крупный рогатый скот:	
сепсис у телят	078, 08, 09, 015, 055, 086, O1 15, 0117, 041, O1 19
диарея у телят	08, 09, 020, 0101
мастит у коров	09, 08, 06, 02, 021, 081, 086
2. Свиньи:	
диарея у поросят	08, 09, O20, 045, O101, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149, 0157
энтеротоксемия у поросят	0138, 0139, 0140, 0141
3. Овцы:	
сепсис у ягнят	078, 015, O20, 035, 075, O1 14, 0115, 0119, 0125, 0137,
диарея у ягнят	09, 08, 0101
4. Собаки: энтериты	04, 025, 042
5. Кролики: диарея	085, 02, 0101, 06, 018, 0128, 055, 044
6. Лошади: из репродуктивных органов	018, 02, 06, 0147, 0141

Штамм септицемия цыплят, гальваники кур-несушек, свиной ранулематоз	01, 02, 078, 015, 0101, 0115, 041
---	-----------------------------------

Постановка биопробы завершает общепринятую схему бактериологического исследования материала на колибактериоз (эшерихиоз). При необходимости могут быть проведены исследования токсигенных свойств изучаемых штаммов.

Одним из факторов вирулентности эшерихий является продуцируемый ими экзотоксин. Экзотоксины *E.coli* относят к энтеротоксинам, а штаммы, их продуцирующие, — к энтеротоксигенным *E.coli* (ЕТЕС). Выявление ЕТЕС позволяет установить диагноз на колибактериоз при бактериологическом исследовании материала. Кроме того, наличие энтеротоксигенных штаммов необходимо учитывать при конструировании вакцин против колибактериоза.

ЕТЕС продуцируют два типа энтеротоксинов: термостабильный (ТС) и термолабильный (ТЛ), отличающиеся друг от друга по молекулярной массе, структурной организации, иммуногенности и механизму действия.

Синтез ТЛ-токсина детерминирован конъюгативной (передающейся другим, в т.ч. и непатогенным, бактериям) плазмидой. Он секретируется во внешнюю среду, окружающую бактерию, адсорбируется на ворсинках эпителиальных клеток тонкого кишечника, где стимулирует аденилатциклазу. Последняя вызывает увеличение концентрации аденозинмонофосфата, который ведет к гиперсекреции воды и хлоридов в просвет кишечника и угнетению резорбции натрия. Просвет кишки переполняется жидкостью, развиваются усиленная перистальтика кишечника и диарея. Молекулярная масса ТЛ-токсина 24000 Д, он является пептидом и обладает антигенными свойствами. Разрушается при 60° С в течение 30 минут, инактивируется в среде с рН 4,0 -5,0 и под воздействием проназы.

ТС-токсин также находится под генетическим контролем гетерогенной группы конъюгативных *Ept*-плазмид. Адсорбируясь на клетках эпителия тонкого отдела кишечника, он вызывает гиперсекрецию воды и электролитов, путем активации гуанилатциклазы. Молекулярная масса ТС-токсина колеблется от 1000 до 10 000 Д, он является гаптенем и не обладает антигенной активностью. Сохраняет биологическую активность при температуре 65° С в течение 15 мин., при 100° С - 2 мин. Полностью разрушается при кипячении в течение 30 мин. Устойчив к действию

трипсина, проназы, протеиназы, дезоксирибонуклеазы. Имеется две разновидности термостабильного энтеротоксина: ТСa и ТСв.

Синтез энтеротоксинов у *E. coli* не связан с их серогрупповой принадлежностью. Так, ЕТЕС-возбудители колибактериоза телят могут принадлежать к серогруппам 08, 09, 020, 026, 0101 и другим, колибактериоза поросят — к 08, 045, 0141, 0149, 0139 и 0157.

Энтеротоксигенные *E. coli* — возбудители колибактериоза новорожденных телят, ягнят и козлят, синтезируют в основном ТСa энтеротоксин (среди них такие штаммы встречаются в 86,4 - 100% случаев), редко — ТЛ-энтеротоксин (0 - 9,1%).

Кроме того, ЕТЕС выделяются при колибактериозе поросят и жеребят, при отечной форме у поросят, редко выделяются от щенков.

Данные о корреляции у штаммов *E. coli* между адгезивными антигенами, энтеротоксигенностью и хозяевами представлены в табл. 18.

Под влиянием антибактериального или антиадгезивного иммунитета или специфических сывороток ЕТЕС теряют способность к адгезии и не проявляют энтеротоксичности. То же происходит с энтеротоксигенными *E. coli* при утрате ими плазмид, детерминирующих адгезивные антигены.

Таблица 23 - Взаимозависимость между адгезинами, энтеротоксинами и хозяевами

Тип адгезинов	Главные хозяева штаммов	Продуцируемые энтеротоксины		
		ТС	ТЛ	ТС+ТЛ
К 88	Поросята	+	+	+
К 99	Телята, ягнята	+	-	-
987 P	Поросята	+	-	-
F41	Телята	+	-	-

Поскольку, как отмечалось выше, в большинстве случаев корреляция между энтеротоксигенностью штаммов эшерихий и их серогрупповой принадлежностью отсутствует, проводить диагностику заболеваний, вызванных ЕТЕС с помощью обнаружения у них О- или К-антигенов, нецелесообразно. Для этой цели необходимо выявлять либо адгезины, либо непосредственно энтеротоксины.

Определение энтеротоксигенных свойств *E. coli* проводят на изолированных петлях тонкого кишечника кролика или морской свинки. Ме-

тот основан на феномене расширения кишечной петли за счет скопления в ее просвете жидкости, что и является показателем токсигенной активности испытуемых штаммов.

При использовании кроликов (классическая модель) отбирают клинически здоровых животных массой 2,0-2,5 кг, выдерживают их на голодной диете со свободным доступом к воде в течение 36-48 часов, после чего оперируют под эфирным наркозом с фиксацией в спинном положении. Общепринятыми хирургическими методами осуществляется лапаротомия, тонкий кишечник извлекается на стерильную салфетку и орошается физиологическим раствором через каждые 5-7 минут операции. На кишечник накладывают шелковые лигатуры так, чтобы образовалось 8-12 сегментов по 10 см с промежутками между ними в 3-5 см. В опытные сегменты вводят испытуемый материал в объеме 2 см^3 (суспензия испытуемого штамма эшерихий в физиологическом растворе концентрацией 1 млрд. микробных клеток в 1 мл. Культуру выращивают на плотных средах в течение 16-24 часов. В контрольные сегменты вводят по 2 см^3 стерильного физиологического раствора. Петли кишечника вправляют в брюшную полость, брюшину с брюшными мышцами зашивают непрерывным швом. Через 16-18 часов кроликов усыпляют. Извлекают кишечник, из каждого опытного сегмента жидкость переносят в мерный цилиндр. Индекс дилатации определяют соотношением объема скопившейся жидкости в сегменте к длине этого сегмента. Энтеротоксигенными считают штаммы, дающие индекс дилатации 1 и более.

При использовании морских свинок тест выполняется аналогичным образом. При этом отбирают животных массой 250-500 г. Лигатуры накладывают на тощую кишку так, чтобы образовались сегменты длиной 1,0-1,5 см. Исследуемый материал вводят в объеме $0,1 \text{ см}^3$. Энтеротоксигенными признают штаммы, дающие индекс дилатации 0,5 и более.

Для обнаружения ТЛ-энтеротоксина в настоящее время используют тест отека лап белых мышей, кожную пробу на кроликах, реакцию агрегации тромбоцитов, реакцию отсутствия прилипания лейкоцитов в вате, реакцию латекс-агглютинации, РИД по Манчини и др. ТС-энтеротоксин выявляют в анальной пробе на 15-дневных мышатах-сосунах или в пробе на 15-дневных куриных эмбрионах.

Патогенные эшерихии сероваров O157:H7 и O157:H-, вызывающие болезнь животных с признаками геморрагического гастроэнтерита, бакте-

рии, образующие адгезивный антиген F 18 и вызывающие отечную форму колибактериоза поросят, продуцируют вероцитотоксин.

Лабораторная диагностика сальмонеллезов

Сальмонеллезы — группа инфекционных бактериальных болезней, преимущественно молодняка сельскохозяйственных животных, в том числе и птиц, промысловых и мелких домашних животных.

У животных сальмонеллезы могут проявляться в виде трех основных форм: первичные, вторичные и бактерионосительство.

Первичные сальмонеллезы при остром течении характеризуются лихорадкой, явлениями септицемии, токсикоза и поражением кишечника, а при хроническом — воспалением легких. У взрослых животных (кобыл, овец и реже у коров) могут наблюдаться абортты.

Вторичные сальмонеллезы осложняют течение основного заболевания (чума свиней, пастереллез и др.), при этом характерные для сальмонеллезов признаки обычно слабо выражены или отсутствуют.

Бактерионосительство сальмонелл характеризуется тем, что животные, будучи внешне здоровыми, выделяют бактерии во внешнюю среду с фекалиями и мочой. У таких животных возбудителя обнаруживают главным образом в печени (в желчи, в слизистой желчного пузыря, в лимфатических узлах печени), в мезентериальных лимфатических узлах, в содержимом слепой кишки.

У человека сальмонеллез протекает в виде пищевых токсикоинфекций (острых кишечных инфекций).

Возбудители сальмонеллезов относятся к роду *Salmonella* семейства *Enterobacteriaceae*. В настоящее время все сальмонеллы разделяют на два вида. Вид *S. bongori* содержит менее 10 очень редких сероваров. Все остальные 2500 сероваров выделены внутри вида *S. choleraesuis*, который по фенотипическим и генетическим критериям разделен на 6 подвидов: *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*; *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*; *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*; *S. choleraesuis* subsp. *houtenae*

§ *choleraesuis* subsp. *indica* u *S. choleraesuis* subsp. *salamae*. Все серовары внутри подвида *choleraesuis* имеют названия, тогда как в других подвидах серовары (за исключением некоторых в подвидах *salamae* и *houtenae*) не имеют названий.

Диагностическим лабораториям рекомендовано для имеющих названия сероваров бактерий рода *Salmonella* использовать эти названия, а не имеющие названий серовары обозначать с помощью антигенной формулы и указанием подвида. **Лабораторная диагностика сальмонеллеза** основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой и люминесцентной микроскопии, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Бактериологическое исследование

Для посмертной диагностики в лабораторию направляют свежий труп мелких животных, в том числе и птиц, целиком, от трупов крупных животных — трубчатую кость, долю печени с желчным пузырем, почку, селезенку, брыжеечные лимфоузлы, пораженные участки легких, слепую кишку с содержимым; в случае аборта — свежий плод.

Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют фекалии, носовую слизь, истечения из родовых путей.

Для получения гемокультуры на 1-4-й день болезни (не позже, т.к. период бактериемии при сальмонеллезах короткий) от животных может быть взята кровь, а для серологического исследования по РА — сыворотка крови. От птиц берут кровь для постановки кровякапельной реакции агглютинации или кровякапельной реакции непрямой гемагглютинации для диагностики пуллороза-тифа.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из полученного материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Сальмонеллы являются грамотрицательными, мелкими палочками с закругленными концами, от 1 до 4 мкм длиной и 0,5-0,8 мкм шириной. Не образуют спор и капсул.

Для люминесцентной микроскопии готовят мазки-отпечатки из патологического материала и обрабатывают их в соответствии с «Наставлени-

ем по применению комплексной и групповых сальмонеллезных флуоресцирующих сывороток» (для прямого метода иммунофлуоресценции).

Выделение и идентификация культур сальмонелл. Сальмонеллы — факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы; обладают и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура культивирования 37° С, рН среды 7,2-7,4, хорошо растут на обычных питательных средах.

Исследуемый материал высевают на обычные МПА и МПБ, на плотные селективные среды, а в ряде случаев (главным образом при исследовании фекалий и при получении гемокультуры) в среды накопления. На селективных наиболее часто используют среды Плоскирева, Эндо, Левина, висмут-сульфит агар, а из сред накопления — Мюллера, Кауфмана, Киллиана.

Для получения гемокультуры кровь засевают в пробирку с 20%-ным желчным МПБ. Засеянные чашки Петри и пробирки инкубируют 18-20 часов при 37° С. После этого просматривают посевы на плотных средах в чашках Петри и отбирают подозрительные колонии, наряду с этим делают высевы с жидких сред накопления на плотные селективные среды, которые инкубируют при 37° С в течение 18-24 часов.

Характер роста сальмонелл на питательных средах. В МПБ сальмонеллы дают рост в виде равномерного помутнения среды, на МПА образуют небольшие, диаметром 2-4 мм, гладкие выпуклые прозрачные или серо-голубоватые колонии с ровными краями. Некоторые серовары (*S. abortus equi*, *S. abortus ovis*, *S. typhisuis*) образуют более мелкие колонии диаметром около 1 мм. На среде Эндо колонии сальмонелл слегка розовые, прозрачные, на средах Плоскирева и Мак-Конки — бесцветные, но выглядят более плотными и мутноватыми, чем на МПА. На агаре Левина сальмонеллы растут в виде прозрачных колоний, иногда с фиолетовым оттенком. На висмут-сульфит агаре почти все сальмонеллы образуют черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом наблюдается прокрашивание участка среды под колонией в черный цвет. Отдельные немногочисленные серовары составляют исключение, и на висмут-сульфит агаре образуют светлые или светло-зеленоватые колонии.

Морфология клеток сальмонелл в культуре. В мазках, приготовленных с питательных сред, сальмонеллы обнаруживают в виде грамотрицательных, мелких палочек с закругленными концами, от 1 до 4 мкм

длиной и 0,5-0,8 мкм шириной. В мазках располагаются одиночно, беспорядочно, иногда попарно. Не образуют спор и капсул. Обладают, как правило, выраженной подвижностью за счет перитрихально расположенных жгутиков. Некоторые серовары (*S. gallinarum-pullorum*) всегда неподвижны, могут встречаться неподвижные мутанты и среди других сероваров.

Идентификация сальмонелл по ферментативным признакам. Чистые культуры бактерий с характерными для сальмонелл культуральными свойствами с целью установления родовой принадлежности засевают в дифференциально-диагностические среды для определения ферментативных свойств.

К роду *Salmonella* относят бактерии: оксидазоотрицательные; каталазаположительные; не образующие индол; дающие отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра (желтое окрашивание среды); положительную пробу с метиловым красным (среда окрашивается в розово-красный цвет); способные расти на среде Симмонса с цитратом; лизин- и орнитиндекарбоксилазо-положительные; образующие H_2S ; не сбраживающие лактозу, сахарозу; не расщепляющие мочевины; не разжижающие желатину. По аргининдегидрогеназе, способности расти в присутствии KCN и использованию малона-та сальмонеллы различаются. Как правило, сбраживаемые ими углеводы включают L-арабинозу, D-ксилозу, мальтозу, D-маннитол, D-маннозу, L-рамнозу, D-сорбитол, трегалозу и глюкозу.

Частота выявления позитивных реакций при изучении некоторых биохимических характеристик сальмонелл представлена в таблице 24.

Таблица 24 - Биохимические свойства рода *Salmonella*

Показатели	% позитивных реакций
Ферментация глюкозы	100%
Образование газа на среде с глюкозой	91,9%
H_2S	91,6%
Индол	1,1%
Арабиноза	89,2%
Сорбит	94,1%
Третьяк	86,5%
Маннит	99,7%
Рост на среде Симмонса	80,1%

На основании биохимических характеристик возможна не только родовая идентификация сальмонелл, но и определение их видовой и подвидовой принадлежности.

Наибольшее значение для ветеринарии имеют сальмонеллы подвидов *choleraesuis* и *arizonae*, объединяющие более 80% всех сальмонелл.

Таблица 25 - Дифференциация видов и подвидов бактерий рода *Salmonella*, первоначальные источники их выделения

Тесты	Вид	Подвиды вида <i>S. choleraesuis</i>					
	<i>S. bongori</i>	<i>Choleraesuis</i>	<i>Salamae</i>	<i>Arizonae</i>	<i>Diagonae</i>	<i>Houtenae</i>	<i>Indica</i>
β-галактозидаза (ONPG-тест)	+	-	(-)	+	+	-	+/-
Образование кислоты из: лактозы	-	-	-	(-)	(+)	-	(-)
д-глицерилфосфат	-	+	+	-	-	-	+/-
мука	+	+	+	+	+/-	-	+
галактоуроната	+	-	+	-	+	+	Н.Д.
Утилизация мальтозы	-	-	+	+	+	-	+
d-тарtrate	-	+	+/-	-	(-)	+/-	+
Гидролиз желатин	-	-	+	+	+	+	+
Первоначальные источники выделения: теплокровные животные;	*	+	*	*	*	*	Н.Д.
холоднокровные и объекты внешней среды	+	-	+	+	+	+	Н.Д.

Примечания: Данные по подвиду *Indica* приведены по Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (1994). Обозначения: «-» — 0-10% штаммов положительные; «(-)» — 11-25% штаммов положительные; «+/-» — 26-75% штаммов положительные; «(+)» — 76-89% штаммов положительные; «*» — 90-100% штаммов положительные.

Учитывая возможность отклонений отдельных из перечисленных признаков, следует отметить, что биохимическая идентификация сальмонеллы является лишь первым этапом работы в этом направлении. Окончательную идентификацию выделенных штаммов осуществляют с учетом последующего изучения их антигенной структуры.

Серологическая идентификация сальмонелл. Сальмонеллы имеют сложное антигенное строение. Основными антигенами, имеющими значение для идентификации сальмонелл на уровне рода, определения их видовой, серогрупповой и серовариантной принадлежности, являются соматический или O-антиген и жгутиковый или H-антиген.

O-антиген расположен на поверхности бактериальной клетки и представляет собой термостабильный (не разрушается при кипячении в течение 2 часов) фосфолипидо-полисахаридный комплекс. Он не однороден и

содержит различные антигенные факторы (дидезоксигексозы, или иначе полиозиды) на концах полисахаридных цепей, что обуславливает специфичность О-антигена в серологических реакциях.

В соответствии с содержанием тех или иных О-антигенов сальмонеллы делят на серологические группы, обозначаемые заглавными буквами латинского алфавита. Отдельные антигенные факторы О-антигена обозначаются арабскими цифрами. Некоторые антигенные факторы О-антигена (далее просто О-антигены) называют главными О-антигенами, т.к. они встречаются только в одной из групп сальмонелл и именно они определяют групповую принадлежность бактерий. Другие О-антигены называют малыми, т.к. они встречаются в нескольких или даже многих группах сальмонелл и, следовательно, не могут определять их групповую принадлежность. В настоящее время выделено более 50 О-групп сальмонелл.

Одним из компонентов О-антигена является Vi-антиген — полимер N-ацетиламино-гексурановой кислоты. Он обнаруживается у отдельных сероваров сальмонелл (*S. dublin*, *S. paratyphi* и др.) и некоторых других бактерий семейства энтеробактерий (*Escherichia*, *Citrobacter*). Vi-антиген затрудняет серологическую идентификацию сальмонелл в РА, т.к. препятствует агглютинации бактерий в О-сыворотках.

Vi-антиген термолабилен. Он полностью разрушается при кипячении в течение 10 минут, частично инактивируется при нагревании при 60° С в течение часа и под действием фенола, чувствителен к действию соляной кислоты и этанола. Наиболее полное его развитие у соответствующих сероваров происходит при температуре 37° С.

Жгутиковые или H-антигены сальмонелл могут существовать в двух, выявляемых в серологических реакциях, фазах: первой и второй (или «специфической» и «неспецифической»).

Антигенные факторы 1-й фазы обозначаются прописными буквами латинского алфавита, антигены 2-й фазы - арабскими цифрами или прописными буквами латинского алфавита с арабскими цифрами. Сальмонеллы, у которых H-антиген представлен двумя фазами, называются двухфазными, а имеющие антигенные факторы 1-й фазы-монофазными.

Помимо перечисленных основных антигенов, у сальмонелл обнаружены и другие антигены. Среди них — M-антиген (слизистый). Он выявляется у некоторых слизистых штаммов сальмонелл сероваров *S. cholerae-*

suis, *S. dublin*, *S. anatum* и др. М-антиген — кислый полисахарид. Он не растворим в воде, разрушается под действием кислоты и этанола, обладает слабыми антигенными свойствами.

У ряда сероваров сальмонелл (*S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. stanley*, *S. anatum* и др.) показано наличие белково-полисахаридного комплекса, отнесенного к К-антигену. Он устойчив к действию кислоты, этанола и обладает выраженными антигенными свойствами.

У сальмонелл имеется несколько видов антигенных вариаций, знание которых необходимо для получения однородных результатов идентификации и правильной их интерпретации.

Н-О-вариации — переход из жгутиковой НО-формы в безжгутиковую О-форму. Встречается редко, но такой переход почти всегда необратим. Некоторые серовары сальмонелл (*S. gallinarum-pullorum*) существуют только в О-форме.

S-R-вариации — переход от гладких S-форм к шероховатым R-формам, сопровождающийся качественными и количественными изменениями О-антигена.

О-вариации — количественные изменения О-антигена. Наиболее часто изменениям подвергаются О-антигены 1,6, и 12. Этот тип вариаций антигенов связывают с фаговой конверсией сальмонелл.

V-W-вариации (или Vi-вариации) — количественные изменения Vi-антигена, влияющие на агглютинабельность культур, содержащих этот антиген (V-форма — О — инагглютинабельна из-за большого количества Vi-антигена, W-форма не содержит Vi-антиген и агглютинируется О-сыворотками, VW — форма является промежуточной, т.е. содержит Vi-антиген, но является О-агглютинабельной).

Н-вариации — качественные изменения жгутиковых антигенов, в результате чего отдельные антигенные комплексы, входящие в 1-ю и 2-ю фазы, могут присутствовать или отсутствовать.

При идентификации сальмонелл следует помнить и то, что они могут иметь общие антигены не только в пределах их отдельных О-групп, но и с представителями других родов семейства энтеробактерий (*Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*). Несмотря на мозаичность и вариабельность антигенной структуры сальмонелл, при их серологической идентификации во внимание принимаются лишь два основных антигена (О и H). Этот принцип положен в основу диагностической антигенной схемы К

Кауфмана-Уайта. В этой схеме, в соответствии со структурой О-антигенов, сальмонеллы распределены по О-группам с различным числом сероваров, расположенных в пределах этих О-групп в алфавитном порядке в соответствии с обозначением их Н-антигенов 1-й фазы. Фактически схема Кауфмана-Уайта представляет собой каталог антигенов сальмонелл, имеющих первостепенную диагностическую ценность. Краткая схема Кауфмана-Уайта, касающаяся антигенной структуры групп сальмонелл, в которые входят патогенные сероварианты бактерий, представлена в таблице 26.

Таблица 26 - Антигенная структура групп сальмонелл, в которые входят патогенные для животных сероварианты (Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 1994)

Серовар	Соматический антиген (О)	Жгутиковый антиген (Н)	
		фаза 1	фаза 2
Группа А (O2)			
<i>S. paratyphi A</i>	1,2, 12	a	(1,5)
<i>S. kiel</i>	1,2, 12	g, d	-
Группа В (O4)			
<i>S. kasangani</i>	1,4, (5), 12	a	1,2
<i>S. hessarek</i>	4,12,27	a	1,5
<i>S. litchia</i>	4,(5), 12	a	1,5
<i>S. anichavaleta</i>	4,(5), 12	a	1,7
<i>S. hispanberg</i>	1,4,(5), 12	a	e, n, x
<i>S. aboufousequi</i>	4,12	-	e, n, x
<i>S. tinda</i>	1,4, 12,27	a	e, n, Z15
<i>S. paratyphi B</i>	1,4,(5), 12	b	1,2
<i>S. Java</i>	1,4,(5), 12	b	(1,2)
<i>S. linnet</i>	1,4, 12,27	b	1,5
<i>S. canada</i>	4,12	b	1,6
<i>S. uppsala</i>	4, 12, 27	b	1,7
<i>S. andia</i>	1,4, 12,27	b	(e, n, x)
<i>S. abony</i>	1,4,(5), 12,27	b	e, n, x
<i>S. aboufousov</i>	1,4, 12,27	b	e, n, x
<i>S. warenta</i>	1,4, 12,27	b	e, n, Zis
<i>S. schlesheim</i>	4, 12, 27	b	-
<i>S. wien</i>	1,4,12,27	b	1, w
<i>S. boerum</i>	1,4, 12,27	c	1,5
<i>S. aboufousov</i>	4,12	c	1,6
<i>S. altenduff</i>	4, 12, 27	c	1,7
<i>S. bury</i>	4, 12, 27	c	Z6
<i>S. stanley</i>	1,4,(5), 12,27	d	1,2
<i>S. derby</i>	1,4, 12,27	d	1,7
<i>S. derby</i>	1,4, 12,27	d	e, n, Z15

S. salinatis	4,12	d, e, h	d, e, n, Z ₁₅
S. saintpaul	1,4,(5), 12	e, h	1,2
S. reading	1,4,(5), 12	e, h	1,5
S. kaapstad	4,12	c, h	1,7
S. chester	1,4,(5), 12	e, h	c, n, x
S. san-diego	4,(5), 12	e, h	e, n, Z ₁₅
S. derbv	1,4,(5), 12	f, g	(1,2)
S. agona	1,4, 12	f, g, s	-
S. essen	4,12	g, m	-
S. caledon	1,4, 12,27	g, m, (s), t	e, n, x
S. hats	4,(5), 12	g, m, s	-
S. californica	4, 12	g, m, t	-
S. kingston	1,4, (5), 12,27	g, s, t	(1,2)
S. budapest	1,4,12,27	g, t	-
S. hanana	4,(5), 12	m, t	1,5
S. typhimurium	1,4, (5), 12	i	1,2
S. lagos	1,4,(5), 12	i	1,5
S. agama	4, 12	i	1,6
S. gloucester	1,4,12,27	i	1, w
S. texas	4, (5), 12	κ	e, n, Z ₁₁
S. fvrjs	4,5, 12	l, v	1,2
S. azteca	4,(5), 12,27	l, v	1,5
S. bredency	1,4,12,27	l, v	1,7
S. kimuenza	1,4, 12,27	l, v	e, n, x
S. brandenburg	1,4,12	l, v	1, n, Z ₁₅
S. togo	4,12	l, w	1,6
S. vora	1,4, 12,27	c, Z ₁₁ , Z ₁₅	1, II, Z ₁₅
S. kunduchi	1,4,(5), 12, 27	c, Z ₁₁ , Z ₁₅	1,2
S. heidelberg	1,4,(5), 12	r	1,2
S. bradford	4, 12, 27	r	1,5
S. remo	1,4,12,27	r	1,7
S. southampton	1,4, 12,27	r	Z ₆
S. africana	4, 12	r, i	l, w
S. coeln	4,(5), 12	y	1,2
S. teddington	1,4,12,27	y	1,7
S. ball	1,4,(5), 12, 27	y	e, n, x
S. ios	1,4,12,27	y	c, n, Z ₁₅
S. shubra	4,(5), 12	z	1,2
S. kiamhu	4,12	z	1,5
S. indiana	1,4,12	z	1,7
S. neston	1,4,12	z	1, w
S. entebbe	1,4, 12,27	z	2,6
S. nordenham	1,4, 12,27	z	e, n, x
S. Stanleyville	1,4,(5), 12,27	Z ₄ , Z ₁₅	(1,2)
S. kalamu	4, 12	Z ₄ , Z ₁₅	(1,5)
S. haifa	1,4,(5), 12	Z ₁₀	1,2
S. ituri	1,4,12	Z ₁₀	1,5
S. fortune	1,4, 12,27	Z ₁₀	Z ₄
S. brancaster	1,4,12,27	Z ₁₅	-
Группа C. (06. 7)			
S. san-juan	6,7	a	1,5
S. austin	6,7	a	1,7
S. denver	6,7	a	e, n, Z ₁₅
S. brazzaville	6,7	b	1,2
S. edinburg	6,7	b	1,5
S. georgia	6,7	b	e, n, Z ₁₅

1. leopoldville	6,7	b	Z6
2. duratyni C	6,7(vi)	c	1,5
3. choleraesuis	6,7	(c)	1,5
4. typhisuis	6,7	c	1,5
5. birkenhead	6,7	c	1,6
6. isangi	6,7	d	1,5
7. amersfoort	6,7	d	e, n, x
8. gombé	6,7	d	e, n, Z ₁₅
9. livingstone	6,7	d	1, w
10. la Rochelle	6,7	e, h	1,2
11. lomita	6,7	e, h	1,5
12. norwich	6,7	e, h	1,6
13. braenderup	6,7	e, h	e, n, Z ₁₅
14. montevideo	6,7	g, m, (p), s	(1,2,7)
15. menston	6,7	g, s, t	(1,6)
16. haelingborg	6,7	m, p, t, (u)	-
17. oranienburg	6,7	m, t	-
18. norton	6,7	i	1, w
19. thompson	6,7	k	1,5
20. daytona	6,7	k	1,6
21. Mingsore	6,7	k	e, n, x
22. concord	6,7	l, v	1,2
23. mumu	6,7	lv	1,5
24. boom	6,7	l, v	e, n, x
25. putadam	6,7	l, v	e, n, Z ₁₅
26. colorado	6,7	l, w	1,5
27. miziona	6,7	l, Zu	1,5
28. kenya	6,7	l, Z ₁₃	e, n, x
29. vichow	6,7	r	1,2
30. infantis	6,7	r	1,5
31. esperia	6,7	r	1,6
32. colindale	6,7	r	1,7
33. papuma	6,7	r	e, n, Z ₁₅
34. richmond	6,7	y	1,2
35. boreilly	6,7	y	1,5
36. gatow	6,7	y	1,7
37. nobawasima	6,7	y	e, n, Z ₁₅
38. ngamanga	6,7	z	1,5
39. esportoria	6,7	Z ₄ , Z ₂₃	e, n, Z ₁₅
40. nganda	6,7	Z ₁₀	1,5
41. eschwiter	6,7	Z ₁₀	1,6
42. djogo	6,7	Z ₁₀	e, n, x
43. eschwege	6,7	Z ₂₉	-
44. eszoma	6,7	-	1,6
Latinna C. (06, 8)			
1. curacao	6,8	a	1,6
2. mardinet	6,8	a	1,7
3. marcalutu	6,8	a	e, n, x
4. manrya	6,8	b	1,5
5. satun	6,8	b	e, n, x
6. bandin	6,8	b	Z ₆
7. esprosser	6,8	c	1,2
8. litch	6,8	c	1,5
9. espen	6,8	c	1,6

S. belem	6,8	c	e, n, x
S. mucnchen	6,8	d	1,2
S. manhattan	6,8	d	1,5
S. sterrenbos	6,8	d	e, n, x
S. herston	6,8	d	e, n, Z ₁₅
S. newport	6,8	e, h	1,2
S. kottbus	6,8	e, h	1,5
S. tshiongwé	6,8	e, h	e, n, Z ₅
S. sandow	6,8	f, g	e, n, Z ₁₅
S. chincol	6,8	g, m, s	(e, n, x)
S. baragwanath	6,8	m, t	1,5
S. germiston	6,8	m, t	e, n, x
S. lindenburg	6,8	i	1,2
S. takoradi	6,8	i	1,5
S. bonariensis	6,8	i	e, n, x
S. aba	6,8	i	e, n, Z ₁₅
S. blockley	6,8	κ	1,5
S. charlotten-	6,8	κ	e, n, Z ₁₅
S. litchfield	6,8	l, v	1,2
S. loanda	6,8	l, v	1,5
S. manchester	6,8	l, v	1,7
S. edmonton	6,8	l, v	e, n, Z ₁₅
S. fayed	6,8	l, w	1,2
S. bovisorbif-	6,8	r	1,5
S. hidalgo	6,8	r	e, n, Z ₁₅
S. tananarive	6,8	Y	1,5
S. praha	6,8	Y	e, n, zis
S. kuru	6,8	z	1, w
S. chailey	6,8	Z ₄ , Z ₃₃	e, n, Z ₁₅
S. duesseldorf	6,8	Z ₄ , Z ₃₄	-
S. tallahassee	6,8	Z ₄ , Z ₃₂	-
S. mapo	6,8	Z ₁₀	1,5
S. hadar	6,8	Z ₁₀	e, n, x
S. glostrup	6,8	Z ₁₀	e, n, Z ₁₅
Грвнна C₁ (08)			
S. shipley	8,20	b	e, n, Z ₁₅
S. Virginia	8	d	1,2
S. labadi	8,20	d	Z ₆
S. emek	8,20	g, m, s	-
S. kentucky	8,20	i	Z ₆
S. amherstiana	8	l, v	1,6
S. hindmarsh	8,20	r	1,5
S. altona	8,20	r, (i)	Z ₆
S. alaybon	8	Y	1,7
S. corvallis	8,20	Z ₄ , Z ₃₁	(Z ₆)
S. albany	8,20	Z ₄ , Z ₃₄	-
S. molade	8,20	Z ₁₀	Z ₆
S. tamale	8,20	Z ₂₉	(e, n, Z ₁₅)
Грвнна C₄ (06, 7,14)			
S. kaduna	6, 7, 14	c	(c, n, Z ₁₅)
S. eimsbuettel	6, 7, 14	d	1, w
S. gelsenkir-	6, 7, 14	l, v	Z ₆
Грвнна D₁ (09,12)			

S. sendai	1.9.12	a	1,5
S. mitami	1.9.12	a	1,5
S. onarimon	1.9.12	b	1,2
S. fentrop	1.9.12	b	1,5
S. alabama	9.12	c	c, n, Z ₁₅
S. tynho	9.12. (vi)	d	-
S. ndolo	9.12	d	1,5
S. castbourne	1.9.12	e, h	1,5
S. berta	1.9.12	f, g, t	-
S. enteritidis	1.9.12	g, m	(1,7)
S. bleedam	1.9.12	g, m, q	-
S. dublin	1.9.12. (vi)	g, P	-
S. rostock	1.9.12	g, P, "	-
S. moscow	9.12	g, q	-
S. wisuscola	1.9.12	m, t	-
S. acetemban	9.12	i	1,5
S. elabornei	1.9.12	k	1,5
S. mendoza	1.9.12	l, v	1,2
S. panama	1.9.12	l, v	1,5
S. kapemba	9.12	l, v	1,7
S. daressalaam	1.9.12	l, w	e, n, x
S. javiana	1.9.12	l, Z ₃₈	1,5
S. Jamaica	9.12	r	1,5
S. lawndale	1.9.12	Z	1,5
S. angola	1.9.12	Z	Z ₆
S. wancata	1.9.12	Z ₃ , Z ₂₁	(1,7)
S. portland	9.12	Z ₃₀	1,5
S. gallinarum	1.9.12	-	-
Группы D₁ (09 46)			
S. haldon	9.46	a	e, n, x
S. warringerode	9.46	f, g	-
S. odabraka	3, 10	Z ₄ , Z ₇₃	1,7
S. lerara	3, 10	Z ₁₀	1,2
S. leamington	3, 10	Z ₁₀	1,5
S. coquillhatville	3, 10	Z ₁₀	1,7
S. leonstad	3, 10	Z ₁₀	e, n, Z ₁₅

Примечание: в скобки взяты антигенные фазы, имеющиеся непостоянно.

Для серологической идентификации с целью окончательного установления родовой принадлежности и определения сероварианта используют чистые культуры бактерий, отнесенные по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам к роду сальмонелл. Для этих целей биопромышленностью выпускаются наборы сывороток сальмонелл О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих для экспресс-идентификации сальмонелл в РА на стекле. Эти наборы позволяют определить родовую и серовариантную принадлежность 33 групп сальмонелл, наиболее часто выделяемых от животных, из продуктов животного происхождения и объектов внешней среды.

Таблица 27. Состав наборов сывороток сальмонеллезных

О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих для идентификации сальмонелл в РА на стекле

Набор № 1		Набор № 2		
Номер О-комплексных сывороток	Рецепторный состав комплексных сывороток	Монорецепторные сыворотки		
		О	Н	
			I фаза	II фаза
1	4,7,8,9,10,15,19	6	i m	с. п. х
2	4,11,16,17,18,21,28	14	c t	2
3	7,11,30,35,38,39,40	46	r p	5
4	8,16,30,41,42,43,44	34	e h	6
5	9,17,35,41,45,47,48	20	l v	(1,2,5,6)
6	10,18,38,42,45,50,52		d	
7	15,21,39,43,47,50,53		b	
8	19,23,40,44,48,52,53		g	

Сыворотки выпускают двумя наборами. В набор № 1 входят О-комплексные сыворотки № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. В набор № 2 входят О- и Н-монорецепторные сыворотки.

Таблица 28 - Серогрупповая принадлежность сальмонелл по результатам РА

Агглютинируется комплексными сыворотками	Содержит О-антиген	Относится к серогруппе
1 и 2	04	В
1 и 3	07	С ₁ или С ₄
1 и 4	08	С ₂ или С ₃
1 и 5	09	Д ₁ или Д ₂
1 и 6	010	Е
1 и 7	015	Е ₂ или Е ₃
1 и 8	019	Е ₄
2 и 3	011	F
2 и 4	016	I
2 и 5	017	J
2 и 6	018	K
2 и 7	021	L
2 и 8	028	M
3 и 4	030	N
3 и 5	035	O
3 и 6	038	P
3 и 7	039	Q
3 и 8	040	R
4 и 5	041	S
4 и 6	042	T
4 и 7	043	U
4 и 8	044	V

и 6	045	W
и 7	047	X
и 8	048	Y
и 9	050	Z
и 5	052	52
и 8	053	53

в популяции особей с преимущественным содержанием какой-либо одной фазы, с отсутствием 1-й фазы Н-антигена (*S. choleraesuis* v. *Kunzendorf* др.) или полным отсутствием Н-антигена (*S. gallinarum-pullorin*). Для выявления искомой фазы Н-антигена используют феномен роения по Герду. В чашки Петри разливают 0,8-1%-ный МПА или агар Хоттингера. Запеченный агар подсушивают в течение 15-20 мин в термостате при 37° С. В центр чашки Петри на агар наносят 1-2 капли сыворотки, соответствующей выявленной фазе Н-антигена. После того как сыворотка впитается в агар, на то же место петлей наносят испытуемую культуру (18-часового роста на скошенном агаре) на площадь диаметром 3-4 мм. Чашки инкубируют при 37° С в течение 18-20 часов.

Таблица 29 - Дифференциация сальмонелл серогрупп C₁ от C₄; C₂ от C₃; D₁ от D₂; E₂ от E₃

Дифференцируемые серогруппы	Реакция с сывороткой	Результат	Серогрупповая принадлежность
C ₁ и C ₄	014	-	C ₁
		+	C ₄
C ₂ и C ₃	06	-	C ₂
		+	C ₃
	020	-	C ₂
		+	C ₃
D ₁ и D ₂	046	-	D ₁
		+	D ₂
E ₂ и E ₃	034	-	E ₂
		+	E ₃

Данный прием приводит к тому, что распространение бактерий, богатая Н-антигеном выявленной фазы, будет угнетено соответствующей сывороткой, и что время как особи бактерий, содержащие преимущественно другую фазу, будут распространяться на поверхности неплотного агара, образуя макроколонию. С края такой макроколонии берут культуру и исследуют ее в реакции агглютинации на стекле с соответствующими моноклональными Н-сыворотками.

Для выявления искомой фазы Н-антигена можно использовать та же U-образную трубочку Хайна, заполненную полужидким (0,1-0,4%-ным) агаром, смешанным с Н-сывороткой к антигену подавляемой фазы или без сыворотки. Во втором случае культуру засевают в одну из трубочек, при этом наличие роста в противоположном (от посева) колене трубочки будет обусловлено подвижными особями.

В некоторых случаях для точного определения сероварианта необходимо обязательное определение дополнительных биохимических свойств выделенной культуры в связи с тем, что отдельные из сероваров имеют идентичную антигенную структуру и различаются только по ферментативным свойствам (табл. 30).

Таблица 30 - Характеристика биохимических и серологических свойств некоторых сальмонелл

Серовар	Антигенная структура	Биохимические свойства
<i>S. paratyphi B</i>	1,4,5,12:b:1,2	Ацетат -
<i>S. java</i>	1,4,5,12:b:1,2	D-таурат -
		Ацетат +
		D-таурат +
<i>S. choleraesuis</i>	6,7:c:1,5	Арабиноза -
		Трегалоза -
		D-таурат +
<i>S. typhisuis</i>	6,7:c:1,5	Арабиноза +
		Трегалоза +
		D-таурат -
<i>S. mission</i>	6,7:d:1,5	Инозит -
<i>S. isagani</i>	6,7:d:1,5	Инозит +
<i>S. enteritidis</i> var. jena	1,9,12: gm:-	Глицерин (бульон Штерна) +
<i>S. enteritidis</i> var. ratin	1,9,12: gm:-	Глицерин (бульон Штерна) -
<i>S. gallinarum</i>	1,9,12:-:-	Орнитин-
		Дульцит +
		Глюкоза (газ) -
<i>S. pullorum</i>	1,9,12: -:-	Орнитин +
		Дульцит -
		Глюкоза (газ) -

Сероварианты сальмонелл, наиболее часто выделяемые от различных животных и из продуктов животного происхождения, приведены в таблице 31.

Выявление сальмонелл прямым методом иммунофлуоресценции
Выявление в патологическом материале и в мясе сальмонелл, входящих в серологические группы В, С₁ С₂, D₁ и E₁, возможно прямым методом

мунофлюоресценции с помощью комплексной и групповых сальмонеллезных флуоресцирующих сывороток.

Комплексная сыворотка предназначена для выявления сальмонелл, входящих в любую из серогрупп В, С₁ С₂, D₁ или E₁. Групповые адсорбированные сыворотки используют для определения принадлежности обнаруженных сальмонелл к одной из указанных групп.

Из типичных для сальмонелл колоний, выращенных на плотных средах, либо непосредственно из патологического материала или мяса готовят мазки (мазки-отпечатки) на тщательно обезжиренных предметных стеклах с таким расчетом, чтобы в поле зрения микроскопа было около 100 клеток.

Таблица 31 - Сальмонеллы, наиболее часто выделяемые от животных и из продуктов животного происхождения

Части животных	Сероварианты сальмонелл
Рогатый скот	S. dublin, S. typhimurium, S. abortus havis, S. enteritidis
Свины	S. choleraesuis, S. typhisuis, S. typhimurium, S. enteritidis, S. dublin, S. brandenburg, S. oranienburg, S. muenster
Мясной рогатый скот	S. abortus ovis, S. typhimurium, S. paratyphi A, S. dublin
Лошади	S. abortus equi, S. typhimurium, S. dublin
Птицы	S. gallinarum, S. pullorum, S. typhimurium
Домашние пернатые животные, в т.ч. утки; кролики	S. typhimurium, S. enteritidis, S. arizonae
Продукты животного происхождения	S. typhimurium, S. dublin, S. gallinarum, S. pullorum, S. choleraesuis, S. derby, S. infantis, S. agona, S. panama, S. enteritidis, S. heidelberg

Мазки фиксируют метиловым спиртом (5 мин) или этиловым спиртом (15 мин) и высушивают.

Сухие препараты помещают строго горизонтально на мостики во влажной камере (чашка Петри) для предупреждения высыхания сыворотки.

Сухие сыворотки в ампулах разводят стерильным физиологическим раствором pH — 7,4 до указанного на этикетке первоначального объема, а

затем дополнительно до рабочего разведения, указанного на этикетке ампулы.

На каждый мазок наносят 2 капли подготовленной таким образом сыворотки и распределяют ее по всей поверхности мазка. Окрашивание препарата осуществляют 15-20 минут при комнатной температуре или в термостате при 37° С. Для лучшего окрашивания препараты каждые 5-7 минут слегка покачивают.

Препараты промывают физиологическим раствором рН — 7,4 в течение 5 минут, заменяя раствор за это время 4-5 раз. Отмытые препараты дополнительно отмывают дистиллированной водой и подсушивают.

После этого на мазок наносят небольшую каплю смеси, состоящей из 9 частей глицерина и одной части 0,2 М фосфатного буфера рН — 8,0 и накрывают покровным стеклом. Для иммерсии используют не флуоресцирующее масло или его заменитель, приготовленный из чистого диметилафталата (100 мл) и нафталина сублимированного (1,75 г) или тимоло чистого (5 г). Мазки просматривают под люминесцентным микроскопом при увеличении 5х90 и силе тока 4,1 А.

Окрашенные флуоресцирующей сывороткой сальмонеллы имеют светящийся периферический контур (ободок). Это характерное свечение контура визуально оценивается в крестах: (++++) — сияющее зеленоватое желтое свечение; (+++) — яркое желтовато-зеленоватое свечение; (++) — умеренное желтовато-зеленоватое или беловатое свечение отчетливо заметного контура; (+) — слабое беловатое свечение различимого контура; (-) — клетки в виде сероватых теней, контур отсутствует или слабо заметен на отдельных участках периферии клеток.

Положительным результатом считается свечение типичных для сальмонелл форм, оцениваемое не ниже чем в два креста, при условии что в контрольных препаратах, окрашенных рабочим разведением физиологической сыворотки, оно оценивается отрицательно. Собственное бесконтурное свечение некоторых бактерий всегда оценивается отрицательно, хотя оно иногда хорошо выражено.

Для проведения исследования патологического материала и мяса готовят несколько комплектов отпечатков на стекле. После фиксации один комплект отпечатков окрашивают комплексной флуоресцирующей сальмонеллезной сывороткой и проводят флуоресцентную микроскопию.

Если сальмонеллы будут обнаружены хотя бы в одном из препаратов, устанавливают их принадлежность к той или иной группе. С этой целью окрашивают другие комплекты препаратов, используя отдельно прежде всего те О-сыворотки, которые соответствуют сальмонеллам наиболее часто выявляемым у животных данного вида.

Выявление сальмонелл серогрупп В, С₁, С₂, Д, Е экспрессным методом в реакции коаггутинации. С этой целью используют набор сальмонеллезных диагностикумов серогрупп В, С₁, С₂, Д, Е для реакции коаггутинации.

Для постановки реакции исследуемый материал подращивают в жидкой питательной среде (селенитовый бульон, МПБ) в течение 12-18 часов при 37° С. После подращивания культуральную среду (2-3 см³) прогревают в водяной бане при 100° С в течение 30 мин, при необходимости центрифугируют или фильтруют, чтобы получить прозрачный раствор. Приготовленный таким образом материал можно хранить при 4-6° С не более 7-10 суток, в замороженном состоянии — неограниченное время.

Сухие диагностикумы разводят дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетке.

На предметное стекло, размеченное на сектора, наносят 6 отдельных капелек исследуемой пробы, затем в первые 5 капелек добавляют по 1 капле соответствующего диагностикума, а в последнюю — 1 каплю несенсибилизированного стафилококка (1%-ная взвесь стафилококка Cowan 1 для отрицательного контроля, который ставится с каждой пробой исследуемого материала). Кроме того, контролем служат: капля каждого диагностикума, смешанная с каплей фосфатно-солевого буфера или физиологического раствора (контроль диагностикумов на гомогенность) — на отдельном стекле (ставится один раз в день постановки реакции); капля диагностикума с каплей гомологичного антигена, прилагаемого к набору (положительный контроль) — на отдельном стекле (ставится по мере необходимости).

Капли перемешивают осторожным покачиванием стекла, не допуская их высыхания, стекло помещают во влажную камеру на 30 мин при комнатной температуре.

Результат реакции коаггутинации учитывают через 30 мин при просмотре стекол над вогнутым зеркалом, регистрируя появление агглютинации стафилококков.

Положительной реакцией считается появление хлопьев агглютинированных стафилококков в одной из капелек с каким-либо диагностикумом при сохранении гомогенности контрольных капелек и наличии положительных реакций диагностикумов с гомологичными антигенами.

Нитенность агглютинации оценивают в крестах:

— все стафилококки склеены и легко скатываются к краю капли при наклоне стекла, жидкость просветлена;

«+++» — склеена большая часть стафилококков, частичное просветление жидкости;

«++» — на фоне слабого просветления жидкости четко виден агглютнат; «+» — мелкие легкие хлопья, жидкость остается непросветленной;

«-» — признаков агглютинации нет, взвесь стафилококков гомогенна, сходна с отрицательным контролем.

Положительной считают реакцию с оценкой не ниже двух крестов. Положительная реакция коаггутинации свидетельствует о наличии в исследуемом материале сальмонелл соответствующей серогруппы. При необходимости определения серовара сальмонелл проводят бактериологические исследования с выделением чистой культуры и ее изучением, как было указано выше. При отрицательной реакции коаггутинации дальнейшее проведение бактериологического анализа на наличие сальмонелл серогрупп В, С₁, С₂, Д, Е считается нецелесообразным.

Идентификация сальмонелл с помощью сальмонеллезного бактериофага. Идентификация сальмонелл может быть осуществлена с помощью сальмонеллезного

О-бактериофага, который высоко специфичен для этих бактерий. Он лизирует 97,5% штаммов сальмонелл и только 0,3% штаммов культур, принадлежащих к другим родам семейства кишечных. С этой целью две капли 4-или 18-часовой бульонной культуры испытуемого штамма (можно использовать взвесь суточной агаровой культуры на физиологическом растворе) наносят тонко оттянутой пастеровской пипеткой на хорошо подсушенный МПА (рН 7,2-7,4) в чашке Петри. После подсыхания на одну из капель петлей или пастеровской пипеткой меньшего диаметра наносят О-бактериофаг, а на другую в качестве контроля — каплю бульона.

Фаг наносят неразведенный или в разведении 1:5 (в зависимости от указания на этикетке). На одной чашке, таким образом, можно испытать одновременно 8-10 культур. Чашку с нанесенными культурами и О-бактериофагом помещают на 18-20 часов в термостат при 37° С, после чего учитывается результат. Положительный результат реакции при появлении на месте нанесения фага четко очерченной зоны сливного лизиса оценивают на +++++, при наличии отдельных негативных колоний, отчетливо видимых глазом, в зависимости от их количества реакцию оценивают на +++, ++ или +.

При отрицательном результате (отсутствие лизиса) в местах нанесения фага будет сплошной рост культуры, как в контроле.

Культура, лизировавшаяся фагом, является подозрительной на сальмонеллезную и может быть прямо с чашки испытана в РА на стекле с

тивалентной сальмонеллезной сывороткой. В случае положительного результата РА культуру засевают на скошенный агар и на пестрый ряд для изучения биохимических свойств и антигенной структуры (с помощью сальмонеллезных монорецепторных сывороток), без чего не представляется возможным дать окончательный ответ о принадлежности культуры к определенному сероварианту сальмонелл. Культуры, не чувствительные к О-бактериофагу, подлежат также дальнейшему изучению (биохимическому и серологическому). Большую помощь О-бактериофаг может оказать при изучении атипичных, трудно диагностируемых культур. Атипичные сальмонеллезные культуры в большинстве случаев чувствительны к О-бактериофагу. Резистентными к нему могут быть некоторые штаммы *S. derby*, *S. tennessee*, *S. anatum*, *S. london* и некоторые другие, в то время как культуры, лишь сходные с сальмонеллезными по биохимическим свойствам (например, лактозонегативные *E. coli*), как правило, не лигируются этим фагом.

Серологическая диагностика сальмонеллеза. Серологическая диагностика сальмонеллеза в пробирочной реакции агглютинации

Вспомогательным тестом, результаты которого учитывают в комплексе с другими диагностическими исследованиями на сальмонеллез, может служить пробирочная РА, которую ставят с сыворотками, полученными от животных, подозрительных в заболевании сальмонеллезом.

Для постановки пробирочной РА отдельными наборами выпускаются серогрупповые антигены и сыворотки трех серологических групп — В, С₁ и D, для диагностики сальмонеллеза.

Сыворотки крови животных исследуют с различными антигенами в зависимости от вида животного, а именно: овец — с антигеном серогруппы II и, как исключение (при соответствующих бактериологических показаниях), с антигеном D крупного рогатого скота — с антигеном серогрупп III и IV; свиней — с антигеном всех трех серогрупп — В, С₁ и D₁.

Реакцию агглютинации проводят в объеме 1 см³ в двух разведениях сыворотки — 1:100 и 1:200. При исследовании с одним антигеном для каждой испытуемой сыворотки требуется три пробирки: в первую наливают 0,96 см³, во вторую и третью — по 0,5 см³ фенолизированного физиологического раствора. Затем в первую пробирку вносят 0,04 см³ испытуемой сыворотки, смешивают и переносят 0,5 см³ во вторую, из второй такое же количество в третью, из третьей 0,5 см³ удаляют.

После приготовления разведенной сыворотки во вторую и третью пробирки вносят по 0,5 см³ антигена в рабочем разведении, указанном на

этикетке, в первую — $0,5 \text{ см}^3$ физиологического раствора. Разведение сыворотки в первой пробирке является контрольным.

Одновременно ставят контроль антигена с гомологичной серогрупповой (контрольной) сывороткой. Для этого сухую контрольную сыворотку разводят физиологическим раствором до объема, указанного на флаконе, и готовят двукратные разведения, начиная с 1:25 до предельного титра сыворотки. Во все пробирки, кроме первой, вносят по $0,5 \text{ см}^3$ антигена в рабочем разведении, в первую пробирку — $0,5 \text{ см}^3$ физиологического раствора.

Для контроля антигенов на самоагглютинацию к $0,5 \text{ см}^3$ антигена в рабочем разведении добавляют $0,5 \text{ см}^3$ физиологического раствора.

Штативы с пробирками тщательно встряхивают до получения равномерной взвеси, помещают в термостат при $37-38^\circ \text{C}$ на 4-10 часов, затем дополнительно выдерживают при комнатной температуре 14-20 часов, после чего производят учет реакции.

Реакцию считают: положительной — при оценке результатов на три-четыре креста в разведении сыворотки 1:200; сомнительной — при оценке три-четыре креста в разведении 1:100 или один-два креста в разведении 1:200; отрицательной — при оценке один-два креста в разведении 1:100 или полном отсутствии агглютинации.

Во всех случаях в контролях должны быть следующие показатели: положительная реакция с позитивной агглютинирующей сывороткой до предельного титра; отрицательные результаты в контрольных пробирках с сывороткой без антигена и в контроле антигена с физиологическим раствором.

От сомнительно реагирующих животных сыворотку крови исследуют повторно через 10-15 дней. Если нет повышения титра сальмонеллезной агглютининов, животных считают отрицательно реагирующими.

Кровекапельная реакция агглютинации (ККРА) и кровекапельная реакция непрямой гемагглютинации (ККРНГА). Данные методы исследований используют для прижизненной диагностики пуллороза у птиц и выявления сальмонеллоносительства у птиц.

Для постановки ККРА используют цветной пуллорный антиген. От точности выполнения реакции во многом зависит результат исследования. На обезжиренное предметное стекло рекомендуется наносить 1 каплю антигена и примешивать к нему кровь, которую берут от исследуемой птицы из гребешка или подкрыльцовой вены. Для оптимального соотношения антигена и крови (примерно 5:1 соответственно) последнюю лучше при-

мешивать платиновой петлей из проволоки толщиной 0,5-0,6 мм и внутренним диаметром кольца 2,5-3 мм.

Предметное стекло плавно покачивают и учитывают результат в течение 1-2 мин. В положительных реакциях образуются хорошо выраженные хлопьеватые хлопья агглютината, а жидкость просветляется. Если образуется небольшое количество мелких хлопьев, то реакцию считают сомнительной. При отрицательной реакции агглютинат не образуется и жидкость не просветляется.

Для постановки ККРНГА используют эритропитарный диагностикум. При этом к одной капле диагностикума добавляют одну каплю крови (т.е. соотношение компонентов реакции должно быть близко к 1:1). Результаты реакции учитывают через 2 мин после тщательного смешивания эритропитарного антигена и крови при плавном покачивании предметного стекла. Образование хорошо заметных коричневатых хлопьев свидетельствует о положительной реакции, слабовыраженных мелкозернистых хлопьев — о сомнительном результате. Отрицательная реакция характеризуется стабильной гомогенной взвесью эритроцитов в капле исследуемой крови.

Обе реакции дают лучшие результаты, если температура воздуха в помещении, где исследуют птицу, не ниже 16-18° С, а предметные стекла с компонентами реакции размещают на грелке-качалке М.А.Артемичева с температурой 37-42° С. При более низкой температуре и при невысоком уровне антигел в крови реакцию на стекле в течение 2 мин визуально можно не заметить.

При необходимости реакции можно ставить пробирочным методом. Диагностическим титром в развернутой РНГА при исследовании сыворотки крови кур служит разведение 1:40 и выше.

Наиболее благоприятно, в котором удается выявить наибольшее количество положительных возбудителя пуллороза-тифа, 50-55 дней, индюшат — 45-50 дней. Взрослых кур исследуют в возрасте 7 мес, а индеек — в 11 мес.

Лабораторная диагностика иерсиниозов

Под *Yersinia* согласно «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (1994) объединяет 11 видов: *Y. pestis*; *Y. pseudotuberculosis*; *Y. enterocolitica*; *Y. kristensenii*; *Y. intermedia*; *Y. frederiksenii*; *Y. aldovae*; *Y. rohdei*; *Y. mollaretii*; *Y. bercovieri*; *Y. ruckeri*. Из них зоопатогенными видами являются *Y. pestis* — возбудитель чумы, острого инфекционного заболевания животных и человека, относящегося к группе особо опасных инфекций; *Y. pseudotuberculosis* — возбудитель псевдотуберкулеза животных;

Y. enterocolitica — возбудитель иерсиниоза животных и человека; *Y. ruckeri* — возбудитель «красного рта» радужной форели и других видов рыб. остановимся на диагностике иерсиниоза и псевдотуберкулеза.

Иерсиниоз — инфекционная болезнь многих видов животных и человека, характеризующаяся у молодняка животных гастроэнтероколитами с развитием диареи (фекалии нередко с примесью крови), которая может перемежаться с запорами. Реже могут наблюдаться артриты, конъюнктивиты, дерматиты и бронхопневмония. У коров могут наблюдаться маститы, эндометриты, рождение нежизнеспособного приплода, энтериты. У кроликов болезнь протекает в виде эпизоотии с высокой летальностью. При этом у больных животных отмечают анорексию, прогрессирующее истощение, субфебрильную температуру и последующий смертельный исход. Широко распространено длительное бактерионосительство. У человека кроме диареи возможно развитие псевдоаппендицита, мезентериального лимфаденита, артритов, менингита, гепатита, поражения сетчатки, сепсиса, сопровождающегося высоким уровнем смертности.

Возбудителем болезни является *Y. enterocolitica*. Эти бактерии выделены практически от всех видов млекопитающих, птиц, рыб, земноводных, моллюсков, насекомых. Они обнаружены в воде, почве, сточных водах, пищевых продуктах, включая овощи и фрукты. Широкой распространенности иерсиний способствуют их психрофильные свойства (способность размножаться и накапливаться в различных питательных субстратах при 4° С).

Псевдотуберкулез — инфекционная болезнь многих видов животных и человека, характеризующаяся преимущественно латентным течением мезентериальным лимфаденитом, длительным расстройством деятельности желудочно-кишечного тракта. Возможно развитие тяжелой септицемии. У лошадей может наблюдаться пневмония и сильное обезвоживание на фоне диареи. У крупного рогатого скота наблюдают пневмонию, аборт и маститы. Аборты и маститы при псевдотуберкулезе могут быть у овец и коз. У кроликов болезнь возможна в острой, подострой и хронической формах. У птиц отмечают острую форму заболевания с развитием поносов, одышки, истощением, взъерошенностью шерсти, потемнением кожных покровов. У собак и кошек псевдотуберкулез чаще всего начинается остро без заметного продромального периода. Появляются лихорадка, угнетение, анорексия, диарея, рвота, боль в мышцах при пальпации. В ряде случаев отмечают кашель, а также признаки поражения печени (желтушное окрашивание склер, темный цвет мочи). Нередко клинические признаки кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза оказываются весьма сходными.

У людей различают кишечную, скарлатиноподобную, артритную формы течения псевдотуберкулеза. Нередко болезнь протекает с поражением печени и напоминает болезнь Боткина. Возможно развитие септической формы, особенно у детей, пожилых и ослабленных лиц.

Возбудителем болезни является *Y. pseudotuberculosis*, выделяемая от млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, земноводных, членистоногих и рыб.

Принципиальные схемы лабораторной диагностики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза сходны и потому ниже излагаются совместно. **Лабораторная диагностика иерсиниозов** основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой и люминесцентной микроскопии, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Бактериологическое исследование

Для исследования направляют свежие трупы мелких животных и птиц целиком, трубчатая кость, доля печени с желчным пузырем, селезенка, почка, отрезки тонкого и толстого отделов кишечника, перевязанные с двух сторон, мезентериальные и подчелюстные лимфоузлы, корень языка, миндалины.

С целью прижизненной диагностики используют фекалии. При наличии в фекалиях примеси крови, слизи, гноя, пленок для исследования отбирают именно такие пробы. Наибольшие шансы на выделение возбудителя имеются, если материал отбирают в период острого течения болезни при повышенной температуре тела.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Иерсинии являются грамтрицательными прямыми палочками с закругленными концами, иногда имеют вид коккобактерий. Диаметр клеток 0,5-0,8 мкм, длина от 0,8-1,2 до 2,0-3,0 мкм.

Выделение и идентификация культур иерсиний

Культивирование. Возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза являются факультативными анаэробами, обладающими и дыкательным и бродильным типами метаболизма. Хемоорганотрофы. Оптимальная температура культивирования 22-28° С, но размножаться они способны при температурах от 2 до 40° С. Диапазон рН 6,0-9,0, оптимальная величина рН 7,4-7,6.

Иерсиний хорошо растут на дезоксихолатном агаре, средах Мак-Конки, Эндо, Серова, СБТС. Среда Плоскирева и висмут-сульфит агар обладают выраженным ингибирующим действием на иерсиний обоих видов. Оба возбудителя способны расти на голодных средах (голодно-кислый агар, фосфатно-буферный раствор и др.).

Высеву исследуемого материала на питательные среды обычно предшествует его обогащение, позволяющее повысить эффективность выделения культур иерсиний.

Общепризнанным методом обогащения материала при исследованиях на иерсиниозы является метод холодогового обогащения, основанный на способности иерсиний размножаться в питательных субстратах при низких плюсовых температурах. Большинство других микроорганизмов, включая и энтеробактерии иных родов, такой способностью не обладает. Способность *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* расти на голодных средах и использование в силу этого фосфатно-буферного раствора в качестве среды обогащения, придают методу дополнительную эффективность.

Исследуемый материал массой не менее 20 г растирают в ступках. Измельченные пробы вносят в пробирки со стерильной средой обогащения (фосфатно-буферный раствор) в соотношении 1:5. Пробирки помещают в холодильник при температуре 4° С. Начиная со вторых-третьих суток хранения из пробирок начинают делать ежедневно (до получения положительных результатов, но не более 15 суток хранения) высевы на среду Эндо или среду с индикатором бромтимоловым синим (СБТС), являющуюся дифференциально-диагностической для выделения возбудителей иерсиниоза и псевдотуберкулеза.

Существенным недостатком классического метода холодогового обогащения является его длительность (до 15 суток), из-за чего бактериологические исследования в ряде случаев затягиваются до 28 суток. Устранить этот недостаток позволяют рекомендуемые для выделения и идентификации чистой культуры *Y. enterocolitica* экспресс-методы, предусматривающие использование «холодового удара», «теплового удара» и «щелочной обработки».

При применении метода «холодового удара» пробирки с исследуемым материалом помещают в холодильную камеру при температуре минус 18° С на 18 часов. Затем материал оттаивают и делают из него высевы на среды Эндо или СБТС.

При использовании метода «теплового удара» пробирки с исследуемым материалом помещают в термостат при 42° С на 18 часов. После этого производят посевы на среды Эндо или СБТС.

Для метода «щелочной обработки» предварительно готовят 40%-ный раствор едкого кали на стерильной дистиллированной воде и хранят его в холодильнике. Перед проведением исследований из 40%-ного раствора готовят 0,5%-ный раствор едкого кали на стерильном 0,5%-ном растворе натрия хлорида. Для этого в стерильных условиях смешивают 7,9 мл 0,5%-ного раствора натрия хлорида с 0,1 мл 40%-ного раствора едкого кали.

Приготовленный таким образом раствор щелочи разливают по 0,2 мл в лунки полистироловой пластины и вносят в них 0,2 мл исследуемого материала в среде обогащения. Смесь тщательно перемешивают. Выдерживают в течение 3-5 мин и делают высевы в бульон Хоттингера. Посевы инкубируют при 37° С в течение суток и делают из них высевы в чашки со средами Эндо или СБТС.

Помимо фосфатно-буферного раствора в качестве сред обогащения могут быть использованы буферно-казеиново-дрожжевая среда, 1%-ная забуферная пептонная вода, 1%-ная пептонная вода с добавлением K_2HPO_4 .

Исследуемый материал с жидких сред обогащения высевают на среду Эндо или СБТС петлей из верхней трети слоя среды (но не с поверхности). Перед посевом содержимое пробирок не взбалтывают. Посевы инкубируют при 22-25° С в течение 18-24 час (на СБТС — в течение 48 час). По истечении этого срока посевы просматривают и характерные для нерсиний колонии пересевают на слабощелочной МПА или агар Хоттингера. Посевы инкубируют при 22-25° С в течение суток. Из типичных изолированных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Из тех же колоний делают высевы на питательный бульон для определения оксидазной активности. Посевы инкубируют при 22-25° С в течение суток. В бульонные культуры добавляют 0,2 мл оснафтола и 0,3 мл диметил-парафенилендиамина, содержимое пробирок перемешивают. При наличии оксидазы в течение 30 сек происходит окрашивание бульона в фиолетовый цвет. Дальнейшему изучению подлежат только грамотрицательные, не образующие оксидазу культуры (сем. *Enterobacteriaceae*). Такие культуры высевают на среду Клигlera и среду с мочевиной по Кристенсену. Для дальнейшего изучения отбирают культуры, не образующие сероводород (оранжево-красный цвет среды Клигlera не изменяется в черный после 24 час инкубирования посевов), обладающие уреазной активностью (красно-малиновое окрашивание среды Кристенсена в течение 1-4 суток инкубирования посевов).

Характер роста нерсиний на питательных средах. На плотных питательных средах при 4-28° С оба возбудителя в аэробных условиях обра-

зуют колонии S-формы. На агаре Хоттингера и МПА через 18-24 часа образуются круглые с ровными краями, полупрозрачные, блестящие колонии с голубоватым оттенком, мягкой консистенцией и диаметром 0,5-1,0 мм. На агаре Эндо колонии круглые, выпуклые, блестящие с ровными краями, бесцветные со слегка розоватым оттенком, диаметром от 0,1 до 1,0 мм.

На СБТС агаре через 48 часов на сине-голубом фоне среды образуются голубые колонии с фестончатым краем, выпуклым центром и сухой матовой поверхностью, диаметром 1,5-2,0 мм. При взятии петлей они сдвигаются по поверхности агара. Иногда (особенно у возбудителя псевдотуберкулеза) виден светло-голубой ободок по краю колонии. Колонии других энтеробактерий, не разлагающих мочевины (эшерихии, сальмонеллы и др.), изменяют окраску среды, приобретая желтый цвет и характерную морфологию (сочные, выпуклые). В жидких средах (МПА, бульон Хоттингера) образуют равномерное помутнение.

При температурах культивирования свыше 28° С микроорганизмы обоих видов диссоциируют в R-форму. При этом на плотных питательных средах, наряду с описанными выше колониями S-формы, появляются колонии с выраженным полиморфизмом по размеру, форме, цвету (особенно при температуре 37° С и выше). Чаще всего R-формы колоний имеют бугристую поверхность, неправильную форму, неровные изрезанные края, коричнево-желтоватый цвет. Нередко они имеют суховатую консистенцию. В жидких средах R-формы образуют помутнение и хлопьевидный осадок либо осадок и рыхлую поверхностную пленку с прозрачной надосадочной жидкостью.

Морфология иерсиний в культуре. В мазках из культур возбудители обоих видов представляют собой грамотрицательные овоидные палочки или коккобактерии размером 0,5- 0,8x1,0-3,0 мкм. Спор и капсул не образуют. *Y. enterocolitica* чаще располагается в мазках поодиночке, но может образовывать и цепочки различной длины. *Y. pseudotuberculosis* палочки образует чаще, а также может окрашиваться биполярно.

Иерсинии обоих видов подвижны при температуре ниже 30° С (подвижность выражена максимально при 20-22° С) за счет перитрихальных расположенных жгутиков и неподвижны при 37° С. У *Y. enterocolitica* подвижность обычно выражена в большей степени, чем у *Y. pseudotuberculosis*.

Идентификация иерсиний по ферментативным признакам. Выделенные чистые культуры микроорганизмов с характерными для иерсиний культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами относят к роду *Yersinia* на основании изучения их ферментативных

свойств. К иерсиниям относят штаммы микроорганизмов, не обладающие оксидазной активностью, не образующие сероводород, уреазопозитивные, дающие положительную реакцию с метиловым-красным, отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра (при 37° С), не растущие на среде Симмонса, не образующие лизиндекарбоксилазу, фенилаланиндезаминазу, подвижные при 4-28° С и неподвижные при 37-42° С, не ферментирующие лактозу и ферментирующие с образованием кислоты маниит, L-арабинозу. Ни *Y. pseudotuberculosis*, ни *Y. enterocolitica* не растут в присутствии KCN. При дифференциации *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* следует иметь в виду, что *Y. pseudotuberculosis* не ферментирует лактозу, сахарозу, раффинозу, целлобиозу, дульцит, инозит, сорбит, инулин и D-арабинозу, но ферментируют с образованием кислоты глюкозу, галактозу, L-арабинозу, левулезу, маннозу, ксилозу, рамнозу, мальтозу, трегалозу, маниит и салицин; редуцируют нитраты, метиловый синий; вступают в реакцию с метиловым красным; образуют каталазу; обладают уреазной активностью; не образуют ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра при температурах 25 и 37° С.

Y. enterocolitica не ферментируют лактозу (есть лактозоположительные варианты, часто среди сероваров 05 и 07, 8), рамнозу, раффинозу; не обладают фенилаланиндезаминазой, лизиндекарбоксилазой и аргининдегидролазой. Реакция Фогес-Проскауэра положительная при температуре 25° С и отрицательная при 37° С.

Другие 8 видов рода *Yersinia*, а именно: *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Yruckeri* могут находиться в испражнениях людей, животных и в смывах с предметов окружающей среды. Они так же, как *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* хорошо растут на питательных средах для выделения иерсиний. Тесты, позволяющие дифференцировать *Y. pseudotuberculosis*, 5 биоваров *Y. enterocolitica* от других часто встречающихся видов иерсиний, представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Основные биохимические свойства *Y.pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, отличающие их от других видов рода *Yersinia*

Тесты	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>					<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. aldovae</i>
		Биовары								
		I	II	III	IV	V				

Лактоза 37° С	-	+	-	-	-	-	d	d	-	-
Мальтоза 37° С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Сахароза 37° С	-	+	+	+	+	d	+	+	-	-
Фогес-Проскауер 37° С	-	-	-	-	-	-	-	-	o	-
Фогес-Проскауер 25° С	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Рамноза 25° С	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Цитрат Симмонса 37° С	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-
Цитрат Симмонса 25° С	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d
Индол	-	-	+	-	-	-	+	+	d	-
Ксилоза 37° С	+	+	+	+	-	-	+	+	d	d
Салицин 37° С	d	+	-	-	-	-	+	+	d	-
Сорбит 37° С	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Трегалоза 37° С	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

Обозначения: «+» — признак положительный; «-» — признак отрицательный; «d» — признак варьирует у различных штаммов.

Возбудитель псевдотуберкулеза по ряду свойств сходен с возбудителем чумы (*Y. pestis*) и в ряде случаев, главным образом при исследовании материала от грызунов (особенно в природных очагах чумы), когда посевы из органов производят непосредственно на плотные питательные среды, может возникнуть необходимость дифференциации этих возбудителей. Основные отличительные признаки *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* представлены в таблице 33.

Таблица 33 - Свойства и дифференциация *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

Тест или свойство	Реакция	
	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Подвижность при 37° С	-	-
Подвижность при 25° С	-	+
Гидролиз мочевины	-	+
Ферментация адонита	-	+
Ферментация L-рамнозы	-	+

Ассимиляция мелибиозы	-	+
Активность к фагу при 37° С	+	d
Активность к фагу при 25° С	+	-
Восприимчивость к антисыворотке к фракции 1 <i>Y. pestis</i>	+	-
Производство коагулазы	+	-
Производство фибринолизина	+	-
Патогенность для мышей	+	+
Патогенность для белых крыс	+	-
Патогенность для морских свинок	+	+
Патогенность для кроликов	-	-

Наиболее ценными для дифференциации этих возбудителей являются тесты, характеризующие их отношение к мочеине, подвижность, наличие фибринолизина и плазмокоагулазы. Кроме того, следует учитывать неприхотливость к питательным средам *Y. pseudotuberculosis* и отсутствие полиморфизма у колоний *Y. pestis*, который обычно растет на специальных средах, и при 28° С на вторые сутки образует колонии только В-формы. При подозрении на выделение *Y. pestis* дальнейшую идентификацию проводят в специализированных учреждениях.

Культуры, отнесенные к видам *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, подвергают серологической идентификации в реакции агглютинации на стекле. Завершающим этапом является определение патогенных свойств выделенных штаммов иерсиний.

Серологическая индикация и идентификация иерсиний. *Y. enterocolitica* имеют соматический (О) и жгутиковый (Н) антигены. У вирулентных штаммов обнаруживаются V- и W-антигены, расположенные в наружной мембране клетки. У отдельных штаммов имеется антиген К1, связанный с фимбриями и разрушающийся только автоклавированием при 120° С в течение час.

О-антигены возбудителя кишечного иерсиниоза являются полисахаридами, устойчивыми к нагреванию и действию этанола. Согласно классификации Winbland—Wauters по О-антигену различают более 60 сероваров *Y. enterocolitica*, которые обозначают арабскими цифрами 1,2 и т.д. Часть сероваров имеет разделение на субсеровары, обозначаемые буквами а, в и т.д. Также буквами обозначают и жгутиковый термолabileный антиген, разрушающийся при кипячении.

Наиболее распространенными среди животных и людей являются серовары: 01,2а,3; 02а, 2b,3; 03; 04,32; 04,33; 05; 05,27; 06,30; 06,31; 07,8; 08; 09; 010; 013,7; 014; 015; 018; 019, 8; 020; 021 и 022.

Y. enterocolitica серовара О3 распространены на всех континентах. Частота их обнаружения на территории России составляет от 15 до 60% и выше. Далее следуют серовары 04,32 и 05,27 (10-50%), 07,8 (5-10%) и 09

(1-30%). Другие из названных сероваров встречаются значительно реже. Часть культур типировать не удается.

Y.pseudotuberculosis имеют жгутиковый антиген (H), 2 соматических (O) антигена S и R, антигены вирулентности — V и W, расположенные на наружной мембране и выраженные при температуре культивирования иерсиний 37° С. H-антиген образуется при температуре 18-20° С, термолабилен и не имеет диагностического значения. R-антиген является общим для всех псевдотуберкулезных бактерий, а также и для *Y.pestis*. Обнаружена общность этого антигена с сальмонеллами групп В и D. По S-антигену различают 8 сероваров *Y.pseudotuberculosis*, обозначаемых римскими цифрами (I-VIII). Большая часть штаммов, выделенных на территории России, как и в других странах, от животных, человека, из объектов внешней среды, относится к серовару I (60-90%). На втором месте по частоте обнаружения находится серовар III (10-30%). Серовары II, IV, V обнаруживают в 2-8% случаев. О циркуляции в нашей стране *Y.pseudotuberculosis* сероваров VI, VII и VIII сведений нет.

Антигенные связи *Y.pseudotuberculosis* и большинства сероваров *Y. enterocolitica* слабые и выявляются лишь иммунно-диффузионными методами. Более значительные антигенные взаимодействия, проявляющиеся в традиционной РА, имеют место у возбудителя псевдотуберкулеза серовара I с культурами *Y. enterocolitica* сероваров 08; 018 и 021.

Оба возбудителя имеют общий антиген с энтеробактериями других видов, за счет чего могут быть получены положительные реакции с сыворотками к некоторым представителям этого семейства. У *Y.pseudotuberculosis* установлены антигенные связи с сальмонеллами, шигеллами и эшерихиями, у *Y. enterocolitica* — с сальмонеллами, протейями, серрациями, гафниями, клебсиеллами. Особо следует отметить наличие антигенного родства у серовара 09 с представителями рода *Brucella*.

В связи с этим в благополучных по бруцеллезу хозяйствах нередко выявляются неспецифические реакции с бруцеллезным диагностикумом, обусловленные инфицированием крупного рогатого скота *Y. enterocolitica*. Возбудитель кишечного иерсиниоза имеет антигенное родство с холерным вибрионом и возбудителем туляремии. С *Y. pestis* близкие антигенные связи и постоянные перекрестные положительные результаты реакций имеет возбудитель псевдотуберкулеза. *Y. enterocolitica* не имеет антигенных связей с *Y. pestis*.

Серологической идентификации подлежат культуры, отнесенные по биохимическим свойствам к видам *Y.pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Ее проводят с помощью реакции агглютинации на стекле с диагностиче-

скими сыворотками к наиболее распространенным сероварам иерсиний. Наборы, выпускаемые для этих целей (Санкт-Петербургский институт им. Пастера), включают сыворотку, поливалентную к I-V сероварам, и сыворотки, моновалентные к I и III сероварам *Y.pseudotuberculosis*, а также сыворотки к сероварам: 03; 04,32; 04,33; 05,27; 05; 06,30; 07,8; 08; 09 и 013,7 *Y.enterocolitica*.

Реакция агглютинации ставится по общепринятой методике. С этой целью из флакона пастеровской пипеткой набирают сыворотку, не захватывая при этом осадка со дна флакона. Каплю сыворотки наносят на предметное стекло и тщательно растирают в ней петлю 20-24-часовой паровой культуры испытуемого штамма. После получения гомогенной суспензии стекло покачивают осторожными круговыми движениями. Положительная реакция (агглютинация) наступает сразу или не позднее 2-3 мин в виде склеивания бактериальной массы с образованием плотных, с трудом разбивающихся зернышек. Жидкость при этом полностью или частично просветляется.

При отрицательной реакции смесь сыворотки и бактериальной массы остается в виде равномерной гомогенной взвеси.

В последние годы разработан и успешно апробирован ряд методов диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, направленных на обнаружение возбудителей или их антигенов в патологическом материале от навших животных, а также в копрофильтратах и моче больных животных с подозрением на псевдотуберкулез и иерсиниоз.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В последнее десятилетие установлена прямая зависимость между степенью выраженности вирулентных свойств *Y.pseudotuberculosis* и концентрацией антигенов вирулентности в наружной мембране. Показано, что для реализации адгезии возбудителя к эпителию слизистой оболочки кишечника с последующей инвазией и размножением в эпителии и макрофагах необходима экспрессия белков наружной мембраны (БНМ) — антигенов вирулентности. Данное обстоятельство делает перспективным использование БНМ с диагностическими целями.

В настоящее время разработано и апробировано 3 варианта тест-систем для ИФА, направленного на обнаружение БНМ иерсиний:

ИФА-ЛПС — псевдотуберкулезная система с широким спектром применения как для диагностики псевдотуберкулеза, так и для решения эпидемиологических вопросов. Чувствительность метода — 10^5 микробных клеток в 1 см^3 пробы, что соответствует 100 мкг/мл липополисахарида возбудителя. Эффективность метода 70,2-81,1%;

ИФА-БНМ-1 — тест-система для ранней диагностики псевдотуберкулеза. Обладает строгой специфичностью и позволяет выявлять возбудителя в органах и тканях животных, копрофильтратах и моче. Она наиболее эффективна при исследовании материала в начальный период болезни, когда антигены обнаруживают в 69-84% проб копрофиль-тратах и в 21-38% проб мочи. Чувствительность метода 10^5 - 5×10^5 микробных клеток в 1 см^3 ;

ИФА-БНМ-П — тест-система для выявления антигенов возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в материалах от больных (копрофильтрата, моча), павших и вынужденно убитых животных.

Для определения видовой принадлежности выявленных иерсиний (антигенов возбудителя) пробы, давшие положительную реакцию в тест-системе ИФА-БНМ-П, проверяют в тест-системе ИФА-ЛПС для выявления возбудителя (антигенов) псевдотуберкулеза.

Чувствительность метода — 10^5 микробных клеток в 1 см^3 , эффективность — до 83,6% положительных проб при исследовании копрофиль-тратов в первые 5 дней болезни. На пике инфекционного процесса данным методом выявляют до 70% инфицированных животных.

Для исследования материала в тест-системе ИФА-БНМ-П копрофиль-трата, выпот брюшной полости вносят в фосфатно-буферную или буферно-казеиново-дрожжевую среду в количестве 1 г на 5 см^3 среды для подрашивания при температуре $3-7^\circ \text{C}$. Внутренние органы и ткани растирают с этими средами в ступке (соотношение 1:5). Образцы исследуют в первые сутки получения проб и затем на 3-5-е сутки от начала подрашивания. Мочу исследуют в нативном виде.

Результаты учитывают визуально или спектрофотометрически. В первом случае реакцию оценивают в крестах по интенсивности появляющегося коричневого окрашивания в лунках. Положительной считают реакцию с пробой, которая дала реакцию не менее чем на ++, и по интенсивности окраски существенно отличается от проб отрицательного контроля (К-, оцененные как «-» или «+»). Положительные результаты должны быть и в пробе с положительным контролем (К+).

При спектрофотометрическом учете результатов содержимое лунок с отрицательным контрольным образцом (К-) используют в качестве нулевого контроля. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 450 нм и считают результат положительным, если коэффициент поглощения светового потока исследуемого образца достигает величины не менее 0,05.

Наборы компонентов для постановки всех трех вариантов ИФА разработаны Санкт-Петербургским институтом эпидемиологии и микроби-

логии им. Пастера. Каждый из компонентов рассчитан на проведение 192 анализов, включая контроли.

Реакция коаггутинации (РКА). Для постановки РКА пробы мочи и копрофильтратов (с подрачиванием и без него) прогревают в водяной бане в течение 30-40 мин, центрифугируют, фильтруют и исследуют надосадочную жидкость. Сыворотку крови исследуют в нативном состоянии.

На предметное стекло, разделенное на необходимое число секторов, наносят капли исследуемого материала. В каждую из капель исследуемого образца добавляют по 1 капле коаггулинирующих диагностикумов различных видов и сероваров иерсиний, в последнюю каплю вносят в смесь несенсибилизированных стафилококков (отрицательный контроль). В качестве положительного контроля на отдельном предметном стекле смешивают по 1 капле каждого использованного диагностикума с 1 каплей липо-полисахарида соответствующих бактерий в концентрации 10-20 мкг/см³. Капли перемешивают осторожным покачиванием стекла, не допуская слияния проб, расположенных рядом. Результат реакции учитывают через 5-30 минут экспозиции стекол во влажной камере по образованию хлопьев агглютината стафилококков и просветлению жидкости.

РКА наиболее эффективна в начальный период острого заболевания (1-5-й дни), при других формах — в сроки максимальной выраженности клинических признаков. По данным различных авторов чувствительность данного метода исследований составляет 10⁵-10⁸ микробных клеток/см³. Эффективность при кишечном иерсиниозе — до 85%, при псевдотуберкулезе — до 60-70% в первые 5 дней от начала болезни. В отличие от РА при постановке РКА не наблюдается перекрестных реакций с другими представителями энтеробактерий, бруцеллами. Использование РКА сокращает сроки исследования на иерсиниоз с 14-17 до 3-4 суток в сравнении с традиционным бактериологическим исследованием.

Реакция латекс-агглютинации (РЛА). РЛА используют для выявления антигенов возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в копрофильтратах и в смывах с объектов внешней среды. В отличие от РКА, в качестве носителей иммуноглобулинов используют частицы латекса, которые не обладают антигенностью, а потому предпочтительнее стафилококка. Латексный псевдотуберкулезный диагностикум выпускается Санкт-Петербургским НИИ вакцин и сывороток. Сконструированы латексные диагностикумы и для индикации *Y. enterocolitica* сероваров ОЗ; О4, 10, О7,8.

Чувствительность метода — 10^6 микробных клеток в 1 см^3 исследуемой пробы. Диагноз на псевдотуберкулез данным методом может быть подтвержден у 73% больных животных.

Большинство штаммов *Y. enterocolitica*, выделяемых на территории Российской Федерации от животных, человека и из объектов внешней среды, относятся к сероварам O3; O9; O5, 27; O8; O6, 30. В Европе преобладают бактерии сероваров O3 и O9, в США — O8, на Дальнем Востоке — O6.

В многочисленных работах, посвященных изучению иерсиниозов у животных, сообщается, что практически на всех территориях от свиней изолируют *Y. enterocolitica* сероваров O3; O4,32; O5; O5,27; O6,30; O7; O8; O9; O11; O12; O17 и O19, а иерсиний, выделенные от крупного рогатого скота, относятся к сероварам O3; O4; O5,27; O7,8; O12; O13 и O18.

Определение патогенности *Y. pseudotuberculosis* являются условно патогенными микроорганизмами. У них, в отличие от *Y. enterocolitica*, отсутствует зависимость вирулентности от наличия плазмиды, контролирующей синтез V- и W-антигенов и кальцийзависимости роста, поскольку бесплазмидные варианты сохраняют инвазивные и цитотоксические свойства. Это указывает на определяющую роль хромосомного контроля основных патогенных свойств *Y. pseudotuberculosis*. Поэтому выделение чистой культуры, отнесение ее к виду *Y. pseudotuberculosis* и определенному его серовару являются достаточными основаниями для постановки диагноза на псевдотуберкулез. Однако и в этом случае иногда прибегают к постановке биопробы. С этой целью ставят кератоконъюнктивальную пробу (тест Шереня) на морских свинках. При этом в один из конъюнктивальных мешков животного инокулируют каплю суспензии испытуемого штамма концентрацией 10^{10} микробных тел. При положительном результате в течение 48-72 час развивается гиперемия конъюнктивы, отек век и сужение глазной щели, наблюдаются серозно-гнойное истечение.

Возможно использование для постановки биопробы и белых мышей, которых заражают орально, внутривенно или внутрибрюшинно. В зависимости от метода инокуляции псевдотуберкулезного возбудителя, животные погибают на 3-9-е сутки. На вскрытии обнаруживают увеличение печени и селезенки, которые имеют многочисленные некротические очажки, напоминающие туберкулезные бугорки, но в отличие от них, не подвергающиеся обызвествлению. Аналогичные абсцессы или узелки обнаруживают и в легких.

К безусловно патогенным *Y. enterocolitica* относятся бактерии сероваров 03; 04, 32; 05; 05, 27; 06, 30; 07,8; 08; 09 биоваров II и IV, реже I и III. Наряду с ними выделяется и значительная часть апатогенных иерсиний. При этом принадлежность того или иного штамма к определенному серологическому и биологическому варианту далеко не всегда подтверждает либо опровергает его этиологическую значимость. Имеется достаточно сообщений о выделении патогенных штаммов иерсиний серо-биоваров, ранее считавшихся непатогенными, и наоборот. Из-за столь неоднозначной роли различных серобиоваров *Y. enterocolitica* в патологии животных для правильного решения вопроса о патогенности того или иного штамма, а следовательно, и для правильной постановки диагноза необходимы дополнительные исследования его факторов вирулентности.

Для большинства патогенных штаммов *Y. enterocolitica* характерны выраженные адгезивные свойства, обуславливающие колонизацию возбудителя на энтероцитах, а также энтеротоксигенность. Продуцируемый возбудителем в больших количествах термостабильный энтеротоксин весьма сходен с таковым энтеротоксигенных неинвазивных эшерихий.

Механизм действия термостабильного энтеротоксина *Y. enterocolitica* связан с активацией аденилатциклазы в эпителиальных клетках кишечника, что ведет к накоплению циклического гуанозинмонофосфата и нарушению водноэлектролитного баланса и энтеросорбции. В реализации действия энтеротоксина принимают участие и простогландины. Наблюдаемая при этом колонизация энтероцитов при минимальной инвазии или ее отсутствии подтверждает важную роль энтеротоксина в патогенезе кишечного иерсиниоза. Энтеротоксигенные *Y. enterocolitica* вызывают у животных и человека диареи различной интенсивности.

Штаммы *Y. enterocolitica*, обладающие инвазивностью, способностью размножаться в органах и тканях организма хозяина, вызывают генерализованную инфекцию. Корреляции между энтеротоксигенностью и инвазивностью у данного возбудителя не установлено.

В отличие от *Y. enterocolitica*, у *Y. pseudotuberculosis* установлены максимальная инвазивность, цитотоксичность и способность к генерализации инфекции. Действие энтеротоксина *Y. pseudotuberculosis* на слизистую оболочку кишечника выражено значительно меньше, чем у *Y. enterocolitica*.

К настоящему времени установлено, что к возбудителю кишечного иерсиниоза чувствительны некоторые лабораторные животные: гибель иерсиниозных свинок наблюдается при внутрибрюшном их заражении патогенными иерсиниями в дозе 3×10^9 микробных клеток в течение 24-48 часов. К подкожному введению возбудителя животные оказались устойчи-

вы; у морских свинок конъюнктивит, а в ряде случаев абортный кератит при введении патогенных иерсиний серовара 09 в конъюнктивальную полость. При этом штаммы серовара 03 патологической реакции не вызвали.

Лучшими способами заражения являются внутрибрюшное и подкожное введение бактерий. При этих способах аппликации иерсиний в разных опытах и для различных сероваров (03; 08; 09; 06,30) ЛД₅₀ возбудителя составляли от $1,5 \times 10^7$ до $2,5 \times 10^8$ микробных клеток.

При пероральном заражении мышей инфекционный процесс удавалось воспроизвести только при искусственном подавлении иммунитета (бестимусные животные, обработка иммунодепрессантами) либо на мышах-гнотобиотах.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что патогенность *Y. enterocolitica* для лабораторных животных изучена еще недостаточно. Дополнительную сложность в изучении данного вопроса вызывает циркуляция в природе патогенных иерсиний с различной степенью вирулентности для животных, включая и лабораторных. Вследствие этого нередко при заражении патогенными иерсиниями лабораторных животных их гибели не наблюдается, поэтому биопроба для проверки патогенности *Y. enterocolitica* не рекомендуется.

Выше упоминалось о том, что патогенность у *Y. enterocolitica* детерминируется плазмидой и сопровождается наличием у таких штаммов ряда культуральных особенностей, которые предложено использовать в качестве маркеров вирулентности.

Определение способности к аутоагглютинации. Феномен аутоагглютинации проявляется при культивировании в жидкой питательной среде и заключается в спонтанном склеивании клеток иерсиний. Для проверки данной способности в две пробирки со средой Кларка засевают чистую культуру испытуемого штамма *Y. enterocolitica*, полученную на МПА. Посевной материал вносят в количестве 10^6 - 10^8 микробных клеток в объеме 1 см³. Одну из пробирок инкубируют при температуре 37° С, вторую — при 25° С в течение 24-48 часов.

Патогенные иерсинии при температуре культивирования 37° С образуют обильный хлопьевидный осадок, а при 25° С — равномерное помутнение, при этом возможен небольшой, компактный осадок.

Непатогенные бактерии в обеих пробирках дают рост в виде равномерного помутнения при отсутствии хлопьев.

При длительном лабораторном хранении штаммов с частыми пассажами и культивированием при 37° С часть изначально патогенных клеток

составляющих популяцию изучаемого штамма, может утрачивать плазмиду, отвечающую за вирулентность. При наличии в популяции 30-70% таких бесплазмидных клеток результаты теста становятся нечеткими. В таких случаях его повторяют после предварительного клонирования с целью выделения плазмидосодержащих клонов. Данную операцию можно осуществить при определении кальцийзависимости роста изучаемого штамма, что также относится к одному из маркеров вирулентности у данного вида бактерий.

Определение кальцийзависимости роста. Данный тест основан на том, что у патогенных иерсинии при культивировании их на кальцийдефицитной агаровой среде при температуре 37° С проявляется ограничение роста. Это выражается образованием колоний значительно меньшего диаметра, чем при культивировании на обычных питательных средах или при дефиците ионов Са ++, но при температуре 25° С.

Для определения кальцийзависимости готовят специальную кальцийдефицитную среду на основе коммерческого агара АГВ. На поверхность этой среды в двух чашках Петри засевают культуру испытуемого штамма, выращенную в среде Кларка при 25° С. Посев ведут с тем расчетом, чтобы получить рост изолированных колоний (от 100 до 500 клеток на стандартную чашку Петри). Одну чашку инкубируют при 37° С, вторую — при 25° С в течение 48 часов, после чего учитывают результаты теста.

Патогенные иерсинии при 37° С вырастают в виде колоний значительно меньшего диаметра, чем на чашке, инкубированной при 25° С. Иногда рост может отсутствовать вовсе. Дополнительное инкубирование такой чашки при 25° С в течение 24-48 часов ведет к образованию колоний обычного размера.

Непатогенные иерсинии при обеих температурах образуют колонии обычной величины (через 24 часа диаметром 1,0-1,5 мм, через 48 часов — до 1,5-2,0 мм).

При наличии в популяции патогенных иерсинии клеток, утративших плазмиду, детерминирующую факторы патогенности, рост при 37° С отмечают в виде различного соотношения крупных и мелких колоний.

Определение температурозависимой морфологии колоний. Морфологию колоний иерсинии изучают после их 24-48-часового инкубирования при 25° С и 37° С на агаре АГВ в чашках Петри.

Учет результатов осуществляют невооруженным глазом или с помощью лупы. Диаметр колоний измеряют окуляр-микрометром.

При 37° С патогенные иерсинии образуют малопрозрачные, желтого цвета, зернистые, выпуклые колонии, диаметр которых, как правило, не превышает 1,0 мм.

При 25° С колонии патогенных штаммов сходны по морфологии и размерам с колониями, образуемыми непатогенными иерсиниями при обеих температурах инкубирования. Они более прозрачны, голубоватого цвета, плоские, маслянистой консистенции, имеют диаметр в 1,5- 3 раза больший, чем у патогенных иерсинии, вырастающих при 37° С.

Определение пиразинамидазной активности. Тест основан на способности непатогенных *Y. enterocolitica* продуцировать пиразинамидазу и отсутствии такой способности у патогенных штаммов.

Для выполнения теста готовят специальную плотную питательную среду с пиразинкарбоксиамидом. В пробирку со скошенной питательной средой высевают культуру испытуемого штамма и инкубируют посевы в течение 48 часов при 25-30° С. По окончании инкубирования на поверхность среды с выросшими колониями наносят 1%-ный водный свежеприготовленный раствор железистого сульфата аммония. Учет результатов теста проводят через 15 минут.

Колонии непатогенных иерсинии, продуцирующих пиразинамидазу, приобретают розовую окраску, патогенных — не изменяют своего цвета.

Серологическая идентификация вирулентных иерсинии в реакции агглютинации на стекле (РА-СВИ). Вирулентные иерсинии выявляют с помощью диагностической сыворотки к вирулентным иерсиниям (СВИ) в РА на стекле.

Комплект для РА с сывороткой диагностической к вирулентным иерсиниям (СВИ) содержит СВИ с рабочим разведением 1:10 и 10 %-ную нормальную кроличью сыворотку («К-») для контроля специфичности).

Для постановки реакции на обезжиренное предметное стекло наносят 1 каплю СВИ и 1 каплю «К-». В обе капли добавляют по одной петлей культуры испытуемого штамма, выращенной на МПА при 25-37° С, и растирают биомассу до образования гомогенной суспензии. Затем стекло осторожно покачивают, наблюдая за результатом реакции.

Положительная РА вирулентных иерсиний с СВИ характеризуется появлением крошек агглютината в течение 3 минут. Агглютинат лучше заметен на темном фоне при косом освещении. В суспензии с нормальной сывороткой («К-») агглютинат образовываться не должен.

При отрицательной реакции в обеих каплях сохраняется равномерная, гомогенная суспензия бактерий.

Серологическая диагностика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза

Реакция агглютинации. Для постановки РА используют стандартные иерсиниозные антигены, представляющие собой суспензию инактивированных формалином культур эталонных штаммов *Y. enterocolitica* сероваров 03; 04,32; 04,33; 05; 05,27; 06,30; 07,8; 09 и *Y. pseudotuberculosis* сероваров I и III концентрацией 10 млрд. микробных клеток в 1 см³. Перед постановкой реакции, которую осуществляют методом равных объемов, антигены разводят до рабочей концентрации 1 млрд/см³ (1:10).

При кишечном иерсиниозе характер гуморального иммунного ответа в значительной степени зависит от тяжести и клинического проявления болезни. Высокие титры антител обнаруживаются при тяжелом поражении суставов и септической форме инфекции. При легком течении, особенно при гастроэнтероколитах, антитела выявляют в более низких титрах, однако и в этом случае их уровень часто достигает диагностических величин. Выше упоминалось о наличии у иерсиний общих внутривидовых антигенов и антигенов, обуславливающих перекрестные реакции с рядом энтеробак-терий других родов, бруцеллами. Однако на пике инфекционного процесса уровень видо-серовароспецифических антител, как правило, значительно превышает уровень гетерологичных антител. Этим обусловлен минимальный диагностический титр в РА, равный 1:160-1:200. Лучше использовать метод парных сывороток крови, при котором достоверным считается 2-4-кратное и более нарастание титров антител. Антитела к *Y. enterocolitica* начинают выявляться со 2-й недели болезни.

К антигенам антитела в крови появляются уже к концу первой недели болезни, а существенное увеличение титров (1:200 и более) отмечают в начале 3-й недели. Этими сроками определяется необходимость использования, как и при кишечном иерсиниозе, метода парных сывороток при постановке РА. Через 2 месяца наблюдается снижение концентрации антител, и к 6 месяцам их титры обычно не превышают значений 1:50-1:100.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). В последнее время для серодиагностики иерсиниозов все шире применяется РНГА, как тест более чувствительный в сравнении с РА. С этой целью разработаны моновалентные антигенные эритроцитарные диагностикумы к *Y. enterocolitica* сероваров 03; 05; 07,8; 06,30; 09 и *Y. pseudotuberculosis* сероваров I и III, двухвалентный диагностикум к сероварам 03 и 09, а также поливалентный диагностикум дополнительно содержащий псевдотуберкулезный антиген.

РНГА применяют со 2-3-й недели болезни, используя метод парных сывороток. Диагностический титр — разведение сыворотки 1:100 и более.

РНГА с использованием антительных эритроцитарных диагностических кумов используется для обнаружения иерсиниозных антигенов в патологическом материале и в объектах внешней среды. Исследуемый материал при этом перед исследованием подрачивают 3-5 суток, инактивируют при 56° С и берут для исследования надосадочную жидкость.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Для дифференциации специфического иммунного ответа, возникающего в острый период иерсиниоза и псевдотуберкулеза, от неспецифических антител используют иммуноферментное определение количественного содержания IgM и IgG.

В острый период данных заболеваний в сыворотке крови преобладают IgM, которые замещаются IgG к концу первого месяца от начала инфекционного процесса. Поэтому обнаружение специфических IgM при однократном исследовании проб крови может с большой долей вероятности подтвердить клинический диагноз.

Используется твердофазный ИФА в пластинах и ДОТ-ИФА.

В первом случае реакцию учитывают визуально по изменению окраски содержимого лунки планшета либо спектрофотометрически по оптической плотности продукта реакции, которая у положительных образцов должна превышать в 2-3 раза таковую в контрольных пробах.

ДОТ-ИФА проводят на нитроцеллюлозных мембранах. Данный вариант анализа не уступает по чувствительности твердофазному, но проигрывает ему в техническом исполнении. При этом используются микроколичества антигена, а результаты оцениваются визуально. Положительным результатом считается появление коричневых точек на фильтрах с исследуемыми образцами при отсутствии окрашивания в контроле.

Чувствительность ИФА превышает чувствительность РА и РНГА в 10 раз. Антитела при псевдотуберкулезе выявляются начиная с 3-й недели болезни. Диагностический титр 1:256 и более.

Наибольшие трудности представляет дифференциация иерсиниоза, обусловленного сероваром 09, от бруцеллеза. Это связано с выраженным антигенным родством их возбудителей. В таких случаях, помимо постановки серологических реакций Райта, Хеддельсона, Роз-Бенгал на бруцеллез, перспективно применение метода дифференциации иерсиниоза от бруцеллеза по классам иммуноглобулинов (М и G) в ИФА. При этом в качестве специфического антигена используют убитую ацетоном культуру *Br.abortus*. Стандартный антиген представляет собой взвесь убитых ацетоном бруцелл концентрацией 10 млрд./мл. Перед постановкой реак-

ции антиген разводят 1:10 (рабочая концентрация 1 млрд./мл) 0,9%-ным раствором натрия хлорида.

Методика приготовления компонентов реакции, техника постановки и учета ИФА изложены в инструкции по применению пероксидазных конъюгатов к иммуноглобулинам М и G, выпускаемым ТОО «Полигност» (Санкт-Петербург).

Лабораторная диагностика морганелл

По современной классификации бактерии рода *Morganella* представлены единственным видом *Morganella morganii*. Естественным местом их обитания является кишечный тракт человека, млекопитающих животных, рептилий. В подавляющем большинстве случаев морганеллы обладают патогенными свойствами и наряду с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae* вызывают кишечные и септические заболевания у человека, молодняка сельскохозяйственных животных, служат возбудителями вторичных оппортунистических инфекций и часто выделяются при бактериемии, инфекциях дыхательных путей, мочевых путей, из раневых повреждений.

Из сельскохозяйственных животных патогенность морганелл убедительно доказана в отношении телят и поросят. Имеются сообщения о выделении патогенных культур морганелл из внутренних органов павших птиц. Парентеральное введение морганелл белым мышам, крысам, хомякам, морским свинкам, кроликам, котятм вызывает гибель перечисленных животных вследствие развития у них сепсиса.

У молодняка сельскохозяйственных животных болезнь часто протекает в форме смешанной инфекции, когда в период массовых заболеваний с сальмонеллокомплексом диареи наряду с морганеллой выделяют других представителей энтеробактерий, корона-, ротавирусы, псевдомонасы, аэридриды и др. Наряду с этим известны случаи, когда кишечную инфекцию или сепсис вызывают одни морганеллы без участия других микроорганизмов. **Лабораторная диагностика** морганелл основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Бактериологическое исследование

Для исследования берут свежие трупы мелких животных целиком, голова, трубчатая кость, доля печени с желчным пузырем, селезенка, почка, сердце, перевязанное лигатурой вблизи аорты, брыжеечные лимфоузлы, отрезок пораженного участка кишечника, перевязанный с двух сторон лигатурой.

Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют фекалии, которые должны быть доставлены в нее в течение 3-4 часов после взятия материала. В противном случае пробы фекалий консервируют стерильным 30%-ным водным раствором глицерина в соотношении 1:2.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Морганеллы являются грамотрицательными, прямыми палочками с закругленными концами. Диаметр клеток 0,6-0,9 мкм, длина 1,5-3,0 мкм.

Выделение и идентификация культур морганелл

Культивирование. Морганеллы являются факультативными анаэробами, обладающими и дыхательными и бродильными типами метаболизма. Хемоорганотрофы. Размножаются при температурах от 12 до 43° С. Оптимальная температура роста 37° С, pH 7,0-7,4. К питательным средам непритязательны и хорошо растут на всех простых средах.

Пробы фекалий или содержимое кишечника суспендируют в соотношении 1:20-1:30 в стерильном физиологическом растворе. Приготовленные суспензии отстаивают 10-15 мин при комнатной температуре для осаждения крупных частиц и делают высевы надосадочной жидкости на среды Эндо, Плоскирева или висмут-сульфит агар. Из другого патологического материала делают высевы в МПБ, на МПА, агар Эндо, Плоскирева или висмут-сульфит агар. Посевы инкубируют 18-24 часа при 37-38° С. По истечении указанного срока посевы просматривают, на каждой из чашек отбирают по 1-2 колонии, характерных для морганелл, и отсеивают их на скошенный МПА в пробирках. При наличии роста только в МПБ и обнаружении в культуре грамотрицательных с закругленными концами палочек, не образующих спор и капсул, культуру пересевают на упомянутые выше селективно-дифференциальные среды, с которых в дальнейшем производят отбор типичных колоний для дальнейшего изучения биологических свойств выделенных культур. В случае роста характерных для морганелл колоний в посевах из нескольких органов и тканей пересев делают культур, полученных не менее чем из двух из них.

Характер роста морганелл на питательных средах. На плотных питательных средах (МПА, агаре Хоттингера) в течение 18-24 часов образуются

ются округлые с ровными краями, выпуклые, с гладкой блестящей поверхностью, серовато-белые колонии диаметром 1-3 мм. На агаре Плоскирева колонии росинчатые, полупрозрачные, голубовато-серого цвета, ко-
2—3-м суткам культивирования они приобретают серовато-белый цвет. На нисмунт-сульфит агаре колонии морганелл округлые, с ровным краем, гладкие, блестящие, более плоские, чем на МПА, имеют зеленовато-оливковый цвет. При многократных пересевах характерные S-формы колоний морганелл могут переходить в шероховатые R-формы из-за диссоциации культур.

В МПБ, бульоне Хоттингера, пептонной воде рост морганелл проявляется в виде равномерного помутнения среды с образованием легко разбивающегося при встряхивании осадка.

Морфология клеток морганелл в культуре. В мазках из культур морганеллы обнаруживают в виде грамтрицательных, прямых палочек с закругленными концами. Диаметр клеток 0,6-0,9 мкм, длина 1,5-3,0 мкм. Подвижны за счет перетрихиально расположенных жгутиков. Спор и капсул не образуют. В поле зрения располагаются одиночно, реже — парно.

Идентификация морганелл по ферментативным признакам. Выделенные чистые культуры микроорганизмов с характерными для морганелл культурными, морфологическими и тинкториальными свойствами относят к роду *Morganella* и виду *M.morganii* на основании изучения их ферментативных свойств.

Морганеллы образуют индол, не образуют сероводород, проба с метиловым красным положительная, реакция Фогеса-Проскауэра отрицательная, на агаре Симмонса с цитратом не растут, по лизиндекарбоксилазе и трипсинидгидролазе отрицательные, дезаминируют фенилаланин и триптофан, декарбоксилируют орнитин, гидролизуют мочевину. Способны к росту в присутствии KCN. Из Сахаров и многоатомных спиртов катаболизируют с образованием кислоты и газа (иногда с задержкой его образования) только D-глюкозу и D-маннозу.

Если на этапе идентификации установлено, что *M.morganii* выделены из селезенки, крови сердца, костного мозга, головного мозга (не менее чем из двух любых перечисленных материалов), то эти микроорганизмы относят к патогенным, их этиологическую роль в заболевании считают установленной без изучения серологических свойств и постановки биопробы. В других случаях проводят дальнейшие исследования с целью определения патогенных свойств морганелл.

К факторам патогенности морганелл относят эндотоксин, действие которого не является специфичным и аналогично действию эндотоксинов других представителей энтеробактерий. Оно проявляется в отношении

центральной нервной системы и кишечника (преимущественно толстой его отдела). Свойства образуемого морганеллами термолабильного экзотоксина изучены недостаточно. Большая часть патогенных штаммов морганелл продуцирует гемолизины, вызывающие лизис эритроцитов разных видов животных и человека. Проявлению патогенных свойств способствуют и карбоксилазная активность этих бактерий.

Культуру выделенных морганелл относят к патогенной в случае установления ее принадлежности к одной из серогрупп, наиболее часто вызывающих заболевание у молодняка животных, или при положительном результате биопробы.

Серологическая индикация и идентификация морганелл

Реакция агглютинации. Ускоренная индикация морганелл в реакции нейтрализации антител (РНАм). Морганеллы имеют соматический О- и жгутиковый Н-антигены. У отдельных штаммов обнаружено наличие поверхностного К-антигена.

О-антиген является полисахаридо-липидо-протеиновым комплексом, термостабилен (выдерживает прогревание при 100° С в течение 2,5 часов и автоклавирование при 121° С, т.е. 1 атм. в течение 1 часа). По О-антигену в Классификационной антигенной схеме Рауса-Вороса к 1980 году насчитывалось 47 серологических групп морганелл. Однако этот перечень не охватывает всего многообразия серогрупп данных бактерий, и к настоящему времени он существенно расширен.

Н-антиген является белком, термолабилен. Прогревание при 100° С приводит к быстрому разрушению жгутикового антигена и утрате им агглютинабельных свойств. Кипячение культуры в течение 2,5 часов вызывает потерю ее Н-агглютиногенных свойств.

К-антиген является поверхностным, термолабильным полисахаридным комплексом, сходным по составу с В-антигеном эшерихий, но при этом не препятствует агглютинации клеток специфическими О-сыворотками.

Совокупность названных антигенов определяет серовариант *M. parvigenii*. Серогрупповую принадлежность морганелл устанавливают в реакции агглютинации со специфическими О-сыворотками. При этом допускается использование как живой, так и инактивированной культуры. Серовариант, при необходимости, устанавливают с помощью дополнительной постановки РА с К- и Н-агглютинирующими сыворотками. При этом в качестве антигена используют только живые культуры.

Патогенность изучаемых культур морганелл устанавливают по их принадлежности к серологическим группам, наиболее часто вызывающим заболевание у молодняка сельскохозяйственных животных. С этой целью исследуют

туют набор сывороток нативных морганеллезных агглютинирующих серогрупповых к 8 серологическим группам: 01; 016; 026; 029; 033; 045; 049 и «13».

Исследования начинают с постановки пластинчатой РА с каждой из серогрупповых сывороток, входящих в набор. Антиген для РА готовят из 18-24-часовой агаровой культуры, которую смывают стерильным физиологическим раствором ($3-4 \text{ см}^3$ на 1 пробирку культуры на скошенном МПА). Суспензию прогревают при 100°C в водяной бане в течение 10-15 мин, центрифугируют 20 мин при 3-5 тыс. об/мин, после чего большую часть надосадочной жидкости удаляют и утилизируют, а меньшую часть ($1-1,5 \text{ см}^3$) смешивают с осадком и используют в качестве антигена в пластинчатой РА.

Для постановки пластинчатой РА сыворотки разводят 1:10 в стерильном физиологическом растворе и каждую из них по капле наносят на чистое обезжиренное предметное стекло. Во все капли сывороток вносят и хорошо размешивают бактериологической петлей антиген. Результаты реакции учитывают при комнатной температуре в течение 3 мин. Положительная реакция характеризуется образованием зерен агглютината и полным просветлением жидкости. При отрицательной — агглютинат не образуется, жидкость остается мутной. Возможна сомнительная реакция, при которой образуется незначительное количество зерен (хлопьев) агглютината, но жидкость остается слабо-мутной.

При наличии положительной реакции на стекле с одной и более серогрупповыми сыворотками ставят развернутую пробирочную РА с этими сыворотками. Оставшийся после пластинчатой РА антиген (или приготовленный заново по вышеуказанной методике) разводят физиологическим раствором до концентрации 1 млрд. микробных клеток в 1 см^3 по оптическому стандарту мутности и используют для постановки развернутой РА в пробирках.

Из серогрупповых сывороток готовят исходные разведения 1:50 в карболинизированном физиологическом растворе (0,5% фенола). Для этого $0,1 \text{ см}^3$ нативной сыворотки смешивают с $4,9 \text{ см}^3$ карболинизированного физиологического раствора либо $0,5 \text{ см}^3$ сыворотки, разведенной 1:10, смешивают с 2 см^3 карболинизированного физиологического раствора. Из исходного разведения готовят двукратные разведения сыворотки от 1:100 до 0 — титров, указанных на этикетках флаконов с гомологичными сыворотками. В подготовленный ряд пробирок с $0,5 \text{ см}^3$ разведенных сывороток добавляют $0,5 \text{ см}^3$ антигена.

Одновременно ставятся контроли па спонтанную агглютинацию антигена ($0,5 \text{ см}^3$ антигена + $0,5 \text{ см}^3$ карболинизированного физиологического раствора) и флокуляцию сывороток (1 см^3 сыворотки в разведении 1:100).

Опытные и контрольные пробирки встряхивают, помещают в термостат При $37-38^\circ \text{C}$ на 16-18 часов, а затем выдерживают их дополнительно при комнатной температуре 5-6 часов. После указанного срока учитывают результаты реакции общепринятым методом в крестах.

При положительной РА в разведении сыворотки не ниже 1:400 оценкой не менее чем ++ (два креста) и отрицательных контролях культуру относят к соответствующей серогруппе морганелл. Если агглютинация наблюдается с несколькими сыворотками к разным серогруппам, то культуру относят к той серологической группе, с сывороткой к которой была получена положительная реакция в наибольшем разведении. Если культура агглютинирует с разными сыворотками в одинаковом титре, то учитывают активность этих сывороток, и серогрупповую принадлежность определяют по сыворотке, имеющей минимальную активность (минимальный О — титры, указанные на этикетках флаконов).

Если РА оказалась отрицательной со всеми сыворотками набора, то Патогенность выделенных культур устанавливают путем постановки биопробы. Реакция нейтрализации антител предназначена для ускоренной идентификации эпизоотических штаммов морганелл в патологическом материале, кормах, объектах внешней среды. Она позволяет обнаружить искомыми бактерии в первичных культурах в течение 6-7 часов независимо от присутствия в них посторонних бактерий. Это Исключает необходимость получения чистых культур морганелл с последующей их видовой идентификацией и определением патогенных свойств в биопробе на белых мышах.

Для постановки РНАт необходимо три компонента: исследуемый с целью обнаружения морганелл материал; морганеллезные агглютинирующие серогрупповые сыворотки; эритроцитарные морганеллезные диагностикумы (3-4%-ная взвесь формализированных эритроцитов барана, на которых адсорбирован О-антиген морганелл определенной серологической группы из числа 8, наиболее часто вызывающих диарею у молодняка животных).

В первой фазе реакции участвуют исследуемый материал и агглютинирующие О-сыворотки. Во вторую фазу к этим компонентам добавляется эритроцитарный диагностикум. Если в исследуемом материале есть морганеллы серогрупп 01, 016, 026, 029, 033, 045, 049, «13» (О-антигены этих бактерий), то они связываются с антителами агглютинирующей сыворотки (визуально невидимый эффект). При последующем добавлении эритроцитарного диагностикума последние не могут участвовать в склеивании (в

агглютинации) эритроцитов, которые образуют на дне лунок полистироловой пластины осадок в форме диска или кольца (положительный результат РНАт). При отсутствии в исследуемом материале морганелл названных серогрупп антитела сывороток остаются свободными в первой фазе реакции и агглютинируют эритроциты во второй ее фазе, что ведет к образованию на дне лунок осадка в виде «зонтика» (отрицательный результат РНАт).

Точность результатов РНАт зависит от правильно подобранного соотношения эритроцитарных диагностикумов и морганеллезных агглютинирующих сывороток, которое определяют в реакции непрямой геммагглютинации (РНГА).

Для постановки РНГА готовят забуференный физиологический раствор с рН 7,0 -7,2. С этой целью в первую мерную колбу вносят 23,0 г Na_2HPO_4 , во вторую — 9,0 г KH_2PO_4 . В обе колбы добавляют дистиллированную воду до отметки 1 литр и тщательно растворяют их содержимое. К 1 литру свежеприготовленного физиологического раствора с рН 6,2-6,6 добавляют 10 см³ смеси 1/15 М растворов Na_2HPO_4 и KH_2PO_4 в соотношении 7:3 или 8:2 (в зависимости от исходной величины рН физиологического раствора), содержимое колбы тщательно перемешивают. Забуференный физиологический раствор разливают по 0,4 см³ во все лунки полистироловой пластины (кроме первой лунки каждого ряда).

Агглютинирующую сыворотку к определенной серогруппе морганелл разводят забуференным физраствором в отношении 1:100 и вносят по 0,4 см³ в первую (пустую) и вторую лунки двух первых рядов полистироловой пластины, а также в две пустые лунки отдельной пластины (контроль сыворотки и эритроцитарного диагностикума).

Сыворотку во вторых лунках двух первых рядов перемешивают с забуференным физраствором, получая разведение сыворотки 1:400 и т.д. до 12-й лунки, в которой получают разведение сыворотки 1:204800. Из последней 12-й лунки ряда 0,4 см³ жидкости удаляют.

Аналогичным образом, т.е. по два ряда для получения разведений от 1:100 до 1:204800, разливают другие серогрупповые морганеллезные сыворотки. Двукратное исследование каждого компонента реакции необходимо для получения более достоверных результатов реакции.

В приготовленные разведения сывороток вносят по 0,05 см³ (одна капля) морганеллезного эритроцитарного диагностикума, гомологичного сероструктуре агглютинирующей сыворотки.

Одновременно на отдельной полистироловой пластине ставят следующие контроли: 1) контроль сывороток для исключения неспецифической агглютинации (0,4 см³ сыворотки в разведении 1:100+0,05 см³ 3,5-~~2~~

4%-ной взвеси нормальных формализированных эритроцитов барана).
2) контроль эритроцитарных диагностикумов для исключения спонтанной агглютинации сенсibilизированных эритроцитов ($0,4 \text{ см}^3$ забуференного физраствора + $0,05 \text{ см}^3$ эритроцитарного диагностикума).

Пластины осторожно встряхивают для смешивания компонентов и оставляют на 3 часа при комнатной температуре. После указанного срока учитывают результаты РНГА.

Во всех лунках полистироловой пластины с контролями реакции должна быть отрицательной (отсутствие гемагглютинации, осадок эритроцитов в виде диска или кольца). При положительной РНГА эритроциты склеиваются, образуя на дне лунок осадок в виде «зонтика».

Активность эритроцитарных морганеллезных диагностикумов учитывают по наибольшему разведению гомологичной морганеллезной агглютинирующей О-сыворотки, в котором получена положительная РНГА. Данное разведение сыворотки принимают за одну гемагглютинирующую единицу (1 ГЕ).

Морганеллезный эритроцитарный диагностикум, имеющий в РНГА гомологичными агглютинирующими сыворотками разных серий титр не ниже 1:6400, для постановки РНАт не пригоден.

Подготовка материала для исследования и постановка РНАт. Исследуемый материал высевают на плотные селективные питательные среды (агар Плоскирева, висмут-сульфит агар и др.). Посевы инкубируют при $37-38^\circ \text{C}$ в течение 18-24 часов, после чего их просматривают, обращая внимание на наличие характерных для морганелл колоний. При необходимости получения чистой культуры для дальнейшей ее родовой и видовой идентификации на скошенный МПА отсеивают с агара Плоскирева серовато-голубоватого цвета, а с висмут-сульфит агара зеленовато-оливкового цвета мелкие полупрозрачные колонии S-формы. Оставшийся материал смывают с чашки Петри $6-8 \text{ см}^3$ стерильного забуференного физраствора. Полученную бактериальную суспензию прогревают в водяной бане при 100°C в течение 15-20 минут и используют для постановки РНАт.

Во все лунки полистироловых пластин наливают по $0,2 \text{ см}^3$ забуференного физраствора. В первую лунку каждого ряда вносят $0,2 \text{ см}^3$ суспензии, исследуемой на наличие морганелл, и готовят ее последовательно двукратные разведения от 1:2 до 1:64 в первых шести лунках каждого ряда. Число рядов лунок с разведениями одного и того же материала должно соответствовать количеству серогрупповых агглютинирующих сывороток и эритроцитарных диагностикумов, используемых в РНАт.

Во все лунки ряда с разведенным исследуемым материалом вносят по $0,2-0,3 \text{ см}^3$ морганеллезной агглютинирующей сыворотки определенной

серогруппы в разведении 4 ГЕ (например, если в РНГА 1 ГЕ соответствовала разведению сыворотки 1:25600, то 4 ГЕ будет соответствовать разведению этой сыворотки 1:6400). Одновременно для контроля сыворотки то же ее разведение в количестве $0,2 \text{ см}^3$ вносят в две лунки с $0,2 \text{ см}^3$ забуференного физиологического раствора на отдельной пластине. В результате получают разведение сыворотки, соответствующее 2 ГЕ.

Пластины осторожно встряхивают для перемешивания компонентов реакции и помещают в термостат при $37-38^\circ \text{C}$ на 1 час. Затем их извлекают из термостата и во все лунки одного ряда добавляют по $0,05 \text{ см}^3$ морганеллезного эритроцитарного диагностикума, соответствующего серогруппе агглютинирующей сыворотки в данном ряду. Одновременно на отдельных пластинках ставят два контроля: 1) контроль гемагглютинирующей способности сыворотки (серогрупповая морганеллезная агглютинирующая сыворотка, используемая в основном опыте в разведении 2 ГЕ и в объеме $0,4 \text{ см}^3 + 0,05 \text{ см}^3$ гомологичного эритроцитарного диагностикума); 2) контроль исследуемого материала для исключения неспецифической агглютинации эритроцитов (в лунки с разведениями суспензии бактерий от 1:2 до 1:64 в объеме по $0,4 \text{ см}^3$ добавляют по $0,05 \text{ см}^3$ 1,5-4%-ной взвеси нормальных формализированных эритроцитов барана). Пластины вновь встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 3 часа. После указанного срока учитывают результаты РНАт.

В контроле сывороток должна наблюдаться агглютинация эритроцитов с образованием в лунках «зонтиков». В контроле исследуемой суспензии бактерий во всех разведениях — отсутствие агглютинации (осадок эритроцитов в виде диска или кольца). При данных результатах контролей реакцию считают положительной в том ряду полистироловой пластины, где эритроциты выпадают в осадок в виде диска или кольца (нет их агглютинации) в разведении исследуемого материала от 1:8 и выше. Положительная реакция только в первых двух лунках ряда, а также в контроле исследуемого материала в разведениях 1:2-1:4 не принимается во внимание ввиду возможности неспецифической агглютинации эритроцитов.

При отрицательной реакции осадок на дне лунок имеет форму «зонтика», что указывает на отсутствие в исследуемом материале морганелл серогрупп, соответствующих использованному эритроцитарному диагностикуму.

Критерисм циркулирования на ферме эпизоотических штаммов морганеллы по результатам РНАт является повторяемость результатов исследования — обнаружение в большинстве проб материала бактерий одних и тех же серогрупп.

Биопроба. Испытуемый штамм морганелл выращивают на МПА при 37-38° С в течение 18-24 часов, смывают стерильным физиологическим раствором и готовят суспензию концентрацией 1 млрд. микробных клеток в 1 см³ по оптическому стандарту мутности. Приготовленную суспензию вводят внутрибрюшинно по 0,5 см³ трем белым мышам массой 14-16 г. Наблюдение за зараженными животными проводят в течение трех суток. В случае гибели двух и более зараженных мышей испытуемый штамм морганелл признают патогенным.

Лабораторная диагностика клебсиелл

Род *Klebsiella* в настоящее время объединяет 4 вида бактерий: *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *K.terrigena*, *K.planticola*. Вид *K.pneumoniae* подразделяется на 3 подвида: *pneumoniae*, *ozaenae*, *rhinoscleromatis*.

Клебсиеллы широко распространены в природе и выделяются из множества объектов внешней среды включая почву, воду (как пресную, так и морскую), злаки, овощи, молочные продукты и т.д. (преимущественно *K.terrigena*, *K.planticola*). *K.oxytoca* в большинстве случаев выделяется из желудочно-кишечного тракта млекопитающих. У человека способны вызывать оппортунистические инфекции, внутрибольничные инфекции у новорожденных, урологических и гериатрических больных. Патогенными для животных и человека являются и бактерии рода *K.pneumoniae*. У человека они вызывают заболевания дыхательных путей: пневмонии, риносклерозы и озены, выделяются при заболеваниях урогенитального тракта, мозговых оболочек, глаз, суставов, позвоночника, при гнойно-септических процессах и острых желудочно-кишечных заболеваниях.

Для ветеринарной практики интерес представляет *K.pneumoniae* подвида *pneumoniae*, т.к. не только является представителем резидентной микрофлоры кишечника, но может играть роль этиологического фактора при пневмониях, метритах, маститах, септических процессах у крупного рогатого скота, свиней, лошадей, обезьян и других видов животных, принимать участие в развитии желудочно-кишечной патологии у молодняка животных.

Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, деление чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным свойствам.

Бактериологическое исследование. Для исследования берут свежие трупы павших или убитых с диагностической целью больных животных целиком, голова, трубчатая кость, доля печени с желчным пузырем, почка, селезенка, сердце, перевязанное лигатурой вблизи аорты, брюшные лимфоузлы, отрезок пораженного участка тонкого отдела кишечника, перевязанного с двух сторон.

Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют фекалии животных с клиническими признаками диареи.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Клебсиеллы представляют собой грамтрицательные палочковидные клетки размером 0,3-1,5x0,6-6,0 мкм. Спор не образуют, но имеют капсулу.

Выделение и идентификация культур клебсиелл

Культивирование. Клебсиеллы являются факультативными анаэробами, хемоорганотрофы, обладающие и дыхательным и броидильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 36-37° С, pH 7,2. Хорошо растут на всех широко используемых в лабораторной практике питательных средах.

Исследуемый материал (за исключением содержимого толстого отдела кишечника и фекалий) высевают в пробирки с МПБ, на МПА, дифференциально-диагностические среды Эндо и Плоскирева.

Соскоб с пораженного участка слизистой оболочки тонкого отдела кишечника (примерно 0,5 г) суспендируют в 10 см³ стерильного физиологического раствора, выдерживают для осаждения крупных частиц 10-15 мин при комнатной температуре и надосадочную жидкость высевают на среды Эндо и Плоскирева. Аналогичным образом производится посев фекалий. Посевы инкубируют при 37° С в течение 18-24 часов. По истечении указанного срока пробирки и чашки Петри с посевами просматривают, отбирают характерные для клебсиелл колонии, готовят из них мазки, которые окрашивают по Граму и по Гинсу (для выявления капсул).

При отсутствии роста на плотных питательных средах, но наличии роста в МПБ и при обнаружении в нем небольших грамтрицательных палочек осуществляют пересев культур из МПБ на плотные питательные среды. Пересевы инкубируют при указанных выше условиях.

Характерные для клебсиелл колонии, состоящие из грамотрицательных, образующих капсулу палочек, отбирают для дальнейших исследований.

Характер роста клебсиелл на питательных средах. В жидких питательных средах клебсиеллы растут в виде равномерного помутнения с образованием осадка, пленки на поверхности среды, а иногда и призматического кольца. Наряду со штаммами, хорошо ферментирующими лактозу, имеются и штаммы со слабой лактазной активностью. Поэтому, в зависимости от степени ферментации лактозы, на дифференциально-диагностических средах колонии могут быть как красные, розовые, и прозрачные с металлическим блеском (т.е. напоминающие лактозонегативные эшерихии), так и прозрачные, бледно-розовые или бесцветные. На среде Плоскирева колонии могут иметь бежевый или желтый оттенок. Во всех случаях колонии имеют гладкую выпуклую поверхность, ровный край, чаще всего слизистую консистенцию.

На МПА клебсиеллы образуют характерные крупные, выпуклые, слизистые, часто сливающиеся колонии. Чаще всего они непрозрачны в проходящем свете, а в коспроходящем свете имеют яркую розово-дымчатую окраску. В мазках, приготовленных из таких колоний и окрашенных по Гинсу, отчетливо выявляется капсула.

Поскольку характер роста на дифференциально-диагностических средах малоинформативен для суждения о принадлежности выделяемых культур к клебсиеллам, выделение возбудителя из исследуемого материала для ускорения дифференциации от эшерихии рекомендуют проводить на 48-часовой агаровой культуре.

Морфология клебсиелл в культуре. В мазках, приготовленных из питательных сред, клебсиеллы обнаруживают в виде неподвижных овальной формы палочек размером 0,3-1,5x0,6-6,0 мкм. Грамотрицательные. Спор лишены, образуют капсулу. В мазках располагаются поодиночке, парами или цепочками.

Идентификация клебсиелл по ферментативным признакам. Выделенные чистые культуры микроорганизмов с характерными для клебсиелл культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами идентифицируют с целью установления родовой, видовой и подвидовой принадлежности на основании изучения ферментативных свойств.

Клебсиеллы оксидазоотрицательные. Индол не выделяют (за исключением *K. oxytoca*). По пробе с метиловым красным, реакции Фортнера, Проскауэра, способности расти на среде Симмонса с цитратом отрицательные. Как правило, по лизиндекарбоксилазе положительные, по орнитиндекарбоксилазе и агрининдигидролазе отрицательные. Некитри-

виды уреазоположительные. Сероводород не образуют. Способны расти в присутствии KCN. Желатину не разжижают. Большинство видов сбраживает все обычно тестируемые углеводы, за исключением дульцитол и эритритол с образованием кислоты и газа. Встречаются штаммы, не образующие газ.

Дифференцирующие признаки видов рода *Klebsiella* представлены в таблице 35, ферментативные свойства, отличающие подвиды вида *K. pneumoniae* — в таблице 36.

Определенные трудности возникают в отличии штаммов *K. pneumoniae* от неподвижных штаммов *Enterobacter aerogenes*, которые очень медленно разжижают желатину. Решающее значение при этом имеют тесты на уреазу (*K. pneumoniae* подвида *pneumoniae* уреазоположительные) и орнитиндекарбоксилазу (*K. pneumoniae* подвида *pneumoniae* имеют отрицательный признак).

Таблица 35 - Дифференцирующие признаки видов рода *Klebsiella*

Тест или субстрат	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>
Циндол	-	+	-	X
Гидролиз лактозы: при 44,5° С	+	-	+	-
при 37° С	-	+	-	-
Рост при 10° С	-	+	+	+
Ферментация: инулина	-	+	X	X
α-меллитозы	+	X	+	-
Сorbitозы	X	+	+	+
Утилизация: Глицерата	-	+	+	-
гидроксибензоата	-	+	+	-
гидрокси-L-пролина	X	X	X	+

Утилизация «+» — 90% и более штаммов позитивны по данному признаку; «-» — 90% и более штаммов негативны по данному признаку; «X» — 11 - 89% штаммов имеют положительный признак.

У клебсилл известно более 80 капсульных (K) антигенов, связанных с капсульной полисахаридной субстанцией.

Лучшее образование последней отмечается при использовании сред, обогащенных углеводами или азотом. Капсулы разных К-антигенов имеют принципиально сходное строение. Основу их полисахаридов составляют галактоза, глюкоза, манноза, фруктоза, рамноза. Сахара связаны между собой глюкуроновыми или реже галактоуроновыми кислотами. Это сходство, по мнению многих исследователей, является основной причиной наличия выраженных перекрестных реакций, затрудняющих серотипирование клебсиелл по К-антигену.

О-антигены клебсиелл (известно более 10; однозначного мнения об отдельном из них у различных авторов нет) также являются полисахаридами.

В отличие от К-антигенов в их составе нет гексуроновых кислот, имеются типичные для О-антигенов глюкозамин, гептоза и другие компоненты. Серотипирование клебсиелл по О-антигену затруднено т.к. требует бескапсульных форм бактерий. Термообработка для этих целей непригодна, т.к. капсула термостабильна. Получение бескапсульных форм путем длительного пассирования культур на 50%-ном желчном бульоне, также вызывает значительные трудности и малопригодно для повседневной лабораторной практики.

Таблица 36 - Дифференцирующие признаки подвидов *K.pneumoniae*

Тест или субстрат	<i>Pneumoniae</i>	<i>Ozaenae</i>	<i>Rhinoscleromatis</i>
Газ из глюкозы	+	X	+
Кислота из: лактозы дульцита	+ X	ср	-
Реакция с метиловым красным	+	+	+
Реакция Фогес-Проскауэра	+	-	-
Цитрат Симмонса	+	X	-
Малонат натрия	+	-	+
Урсаза	+	X	-
Утилизация органических кислот (Кауфман-Петерсон):			
Цитрата	X	X	-
Тартрата	X	X	-
Муката	+	X	-
Лизиндскабоксилаза	+	X	-
Аргининдсгидролаза	-	X	-

Обозначения: «ср» — слабая реакция.

В силу вышеперечисленных методов серотипизации клебсиелл для лабораторной диагностики к настоящему времени отсутствуют. Мало изученным остается и вопрос фаготипирования клебсиелл.

Определение патогенности. Патогенность клебсиелл обусловлена такими факторами вирулентности, как фимбрии, которые подобно фимбриальным антигенам других энтеробактерий способствуют их адгезии на эпителиальных клетках слизистых оболочек. В пользу того, что одним из факторов вирулентности является капсула, свидетельствует тот факт, что она обнаруживается у большинства свежeweыделенных от людей и животных штаммов (бескапсульные штаммы часто выделяются из мочи), а бескапсульные варианты клебсиелл могут восстанавливать капсулу не только при пассировании на углеводсодержащих средах, но и через организм животных. Установлено, что *K.pneumoniae* продуцирует термостабильный и термолабильный токсины. Последний снижает интенсивность торможения агрегации тромбоцитов.

Для определения патогенных свойств *K.pneumoniae* готовят суточные агаровые культуры из штаммов, выделенных из двух внутренних органов и тканей погибших или фекалий больных животных. Каждую из двух культур смывают стерильным физиологическим раствором, готовят суспензии концентрацией 1 млрд микробных клеток в 1 см³ по оптическому стандарту мутности, после чего смешивают их в равной пропорции.

Приготовленной суспензией заражают внутрибрюшинно трех белых мышей живой массой 14-15 г в дозе 0,5 млрд микробных клеток (0,5 см³). Патогенность считают установленной, а изучаемые штаммы *K.pneumoniae* относят к возбудителю болезни, в случае гибели двух и более мышей в течение трех суток после заражения.

При выделении культур *K.pneumoniae* из селезенки, крови сердца, вентрального мозга, головного мозга (не менее чем из двух перечисленных органов и тканей) патогенные свойства этих культур в биопробе на белых мышах не определяют и относят такие культуры к возбудителю болезни.

Лабораторная диагностика протей

Род *Proteus* включает 3 вида: *P. vulgaris*, *P. mirabilis* — часто обнаруживаемые в кишечнике и моче здоровых и больных людей, животных разных видов, в навозе, в сточных водах, в почве, в разнообразных гниющих органических субстратах, и *P. mучofaciens* — малоизученный вид, выделяемый только из личинок шелкопряда непарного.

Патогенны для животных и человека: вызывают инфекции мочевых путей, кишечника. После ожогов, механических травм, хирургических вмешательств могут приводить к образованию септических очагов.

В ветеринарии наибольшее значение имеет способность протеев расти самостоятельно, так и в ассоциации с другими энтеробактериями и условно-патогенными микроорганизмами других семейств, вызывать патологию желудочно-кишечного тракта преимущественно у молодых животных.

Лабораторная диагностика морганелл основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Бактериологическое исследование. Для исследования берут свежие трупы павших или убитых с диагностической целью больных животных целиком, голова, трубчатая кость, доля печени с желчным пузырем, почка, селезенка, сердце, перевязанное лигатурой вблизи аорты, брыжеечные лимфоузлы, отрезок пораженного участка тонкого отдела кишечника, перевязанный с двух сторон лигатурой.

Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют фекалии животных с клиническими признаками диареи.

Микроскопическое исследование исходного материала

Мазки-отпечатки из исследуемого материала окрашивают по Граму и микроскопируют. Протеи имеют форму палочек размером 1-3х0,5-0,8 мкм. Встречаются нитевидные формы. Грамотрицательные.

Выделение и идентификация культур протеев

Культивирование. Протеи — факультативные анаэробы, хемиферментотрофы, обладающие и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 37° С, но способны расти в диапазоне температур от 10 до 43° С. Оптимальная рН среды 7,2 -7,4. Хорошо растут на

тут на всех общих питательных средах, их рост сопровождается неприятным гнилостным запахом.

Пробы фекалий, содержимое тонкого отдела кишечника или соскоб с его слизистой оболочки в количестве не более 0,5 г суспендируют в 10 см³ стерильного физиологического раствора, выдерживают для осаждения крупных частиц при комнатной температуре 10-15 мин и надосажденную жидкость используют для посевов. Фекалии, консервированные глицерином, тщательно в нем размешивают, полученную суспензию разводят стерильным физиологическим раствором в 5-10 раз и высевают надосажденную жидкость после осаждения крупных частиц.

Исследуемый материал высевают в пробирки с МПБ, на чашки с плотными дифференциально-диагностическими средами Эндо, Плоскирева или С висмут-сульфит агаром. Чистая культура роящихся форм протеев может быть получена посевом по Шукевичу (в конденсационную жидкость свежескошенного питательного агара). Для ингибирования роста других видов бактерий и выделения протеев в чистом виде рекомендуется использовать среду П-1, содержащую полимиксин и соли желчных кислот.

Первичные посевы патологического материала инкубируют при 37 - 38° С в течение 24 -36 часов.

Характер роста протеев на питательных средах. При росте на плотных (особенно на влажных и с пониженной концентрацией агара) питательных средах большинство штаммов обладает феноменом «роения» или ползучего роста. При этом наблюдают образование тонкого сплошного пуалеобразного налета, радиально расходящегося от места посева. При выделении чистых культур микроорганизмов с плотных питательных сред возникают затруднения, если в микробной ассоциации присутствует протей, способный к «роению». Для подавления данного феномена при выделении чистых культур других видов бактерий используют среды, содержащие соли желчных кислот (среда Плоскирева, висмут-сульфит агар, агар Мак-Конки, SS-агар и др.), желчь, 0,1%-ный раствор хлоралгидрата, 0,7% агара, а также хорошо просушенные среды.

На среде Плоскирева протей образует крупные (диаметром 2-7 мм), полупрозрачные изолированные колонии правильной круглой формы, слегка выпуклые с желтовато-розовым (перламутровым) оттенком. Среда в зоне роста колоний подщелачивается и приобретает желтизну. На висмут-сульфит агаре через 36-48 часов культивирования колонии протей имеют грязно-коричневый цвет, а после их снятия на среде остается темно-коричневая редукционная зона.

Нероящиеся формы протей на МПА образуют мелкие (диаметром около 1 мм), круглые колонии S-формы сероватого цвета. Аналогичные колонии, но бесцветные или слабо-розового цвета образуются на средах Эндо.

На кровяном агаре отдельные штаммы могут вызывать гемолиз. МПБ вначале образуется равномерное помутнение, а затем осадок.

Морфология клеток протей в культуре. мазках из культур протей представляют собой полиморфные грамотрицательные палочки диаметром 0,4-0,8 мкм и длиной от 1-3 мкм до нитевидных форм различной величины. Кроме того, в мазках можно обнаружить кокковидные и неправильных очертаний инволюционные формы, иногда — сферопласти. Спор и капсул не образуют. Подвижны за счет перетрихально расположенных жгутиков. Подвижность более выражена при температуре культивирования 20-22° С.

Идентификация протеев по ферментативным признакам

Протеи образуют уреазу, сероводород, редуцируют нитраты, гидролизуют желатин, растут в присутствии KCN, ферментируют D-глюкозу с образованием кислоты и газа, оксидазоотрицательные, каталазаположительные, дают положительную реакцию с метиловым красным, не образуют лизиндекарбоксилазу и аргининдигидролазу. Одним из основных признаков протеев и близких к ним фенотипически протей денсий и морганелл, позволяющих отличить бактерии этих родов от других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, является их способность к дезаминированию фенилаланина. Признаки, позволяющие дифференцировать роды *Proteus*, *Providencia* и *Morganella*, представлены в таблице 37.

Таблица 37 - Дифференцирующие признаки родов *Proteus*, *Providencia* и *Morganella*

Тесты	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Morganella</i>
Цитрат Симмонса	P	+	-
Образование H ₂ S	+	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	P	-	+
Гидролиз желатины	+	-	-
Феномен «роения»	+	-	-

Окисление кислоты из:			
ароматы	-	+	+
малеаты	P	-	-
оронаты	-	+	-
аронаты	-	+	-
аробитолата	-	+	-

Серологическая идентификация протеев

Антигенная структура бактерий рода *Proteus* сходна с таковой у других представителей энтеробактерий. У них различают соматические O-антигены и жгутиковые H-антигены.

O-антигены являются липополисахаридобелковыми комплексами, термостабильны. Различают около 49 серологических O-групп.

H-антигены термолабильны, имеют белковую природу. Установлено 19 различных H-антигенов.

Известно, что при кишечных заболеваниях у людей чаще других обнаруживаются *P. vulgaris* и *P. mirabilis* серогрупп 03,010,028, 026 и 30. Подобные данные в области ветеринарной медицины отсутствуют, и поэтому серогрупповая и серовариантная идентификация протеев в ветеринарной диагностической практике не осуществляется. При необходимости серологическая идентификация протеев может быть осуществлена с помощью коммерческих специфических агглютинирующих O- и H-сывороток.

Определение патогенности протеев. Определение патогенности протеев в биопробе не проводят, а выделенные культуры относят к возбудителю болезни в том случае, если они были изолированы из селезенки, крови сердца, костного мозга, головного мозга (не менее чем из двух перечисленных органов и тканей). В противном случае ставят биопробу на больных мышцах. С этой целью готовят суточную агаровую культуру испытуемого штамма, смывают ее стерильным физиологическим раствором, готовят суспензию концентрацией 1 млрд. микробных клеток в 1 см³ по оптическому стандарту мутности. При наличии двух штаммов, выделенных из разных органов, тканей, такие суспензии готовят из каждого из них и смешивают в равной пропорции.

Таблица 38 - Дифференцирующие признаки видов рода *Proteus*

Тест	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mixofaciens</i>
Окисление индола	+	-	-
Реакция Фогеса-Проскауера	-	X	+
Цистрат Симмонса	X	X	+
Окисление дексикарбоксилаза	-	+	-

Образование кислоты из:			
мальтозы	+	-	+
ксилозы	X	+	-
α-метилглюкозида	X	-	+
Просветление среды с тирозином	+	+	-
Образование вязкой пленки	-	-	+

Приготовленной суспензией заражают внутрибрюшинно трехмесячной живой массой 14-16 г в дозе 0,5 млрд. микробных клеток (0,5 см³). Патогенность считают установленной, а изучаемые штаммы протей относят к возбудителю болезни в случае гибели двух и более мышей в течение трех суток после заражения.

Лабораторная диагностика сибирской язвы

Сибирская язва (*Anthrax*) — остропротекающая болезнь, характеризующаяся признаками септицемии, интоксикации, образованием карбункулов. К сибирской язве восприимчивы крупный рогатый скот, лошади, другие однокопытные, верблюды, олени, дикие травоядные всех видов. Менее чувствительны свиньи, плотоядные — малочувствительны.

Возбудителем болезни является грамположительная, спорообразующая палочковидная бактерия — *Bacillus anthracis*, род *Bacillus*.

Лабораторная диагностика основана на выделении и идентификации культуры возбудителя, в случае необходимости проводят обнаружение антигенов возбудителя в исследуемом материале.

Бактериологическое исследование. Материал для исследования Прижизненно у больного животного берут кровь (обычно из уха). Капли крови наносят в виде толстого мазка на предметные стекла, подсушивают, стекла складывают мазками внутрь, помещают между ними синюю бумагу. От трупа животного берут ухо или мазок крови из сосудов уха. От трупа свиней — участки отечной соединительной ткани, заглоточные, подчелюстные и другие лимфатические узлы, при наличии в них изменений. Ухо отрезают со стороны, на которой лежит труп, предварительно перевязав двумя лигатурами, между которыми делают разрез. Место отреза прижигают. Если подозрение возникло в ходе вскрытия трупа (крупный рогатый скот, свиней), вскрытие прекращают, для исследования берут кусочек селезенки, печени, измененные лимфатические узлы. Материал помещают в стеклянную посуду (банки, пробирки). Мазки после высушивания кладут в чашки Петри, последние заворачивают в бумагу, на ней делают надпись «Мазок нефиксирован!». Посуду с материалом помещают в герметичную тару, печатают и нарочным с соответствующими

проводительным документом направляют в лабораторию. Для обнаружения возбудителя сибирской язвы в сырье животного происхождения и объектах внешней среды отбор материала и ход бактериологического исследования регламентирован соответствующими методическими указаниями.

Микроскопическое исследование исходного материала. Проводят путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму, а также одним из методов на капсулу: метиленовым синим Леффлера, по Романовскому - Гимзы, Михину, Ольту, Ребигеру. Учитывая опасность исследуемого материала для бактериолога, рекомендуется фиксировать мазки этиловым спиртом с перекисью водорода, что обеспечивает инактивацию возбудителя. С этой целью подсушенные на воздухе мазки выдерживают 30 минут в фиксирующей жидкости: 180 мл этанола 96° и 20 мл 30%-ного пероксида.

Возбудитель в мазках, окрашенных по Граму, представляет крупную грамположительную палочку (5-10 x 1-2 мкм) с закругленными концами (одиночные клетки). В материале клетки располагаются преимущественно в виде коротких цепочек, попарно. Концы клеток, обращенные друг к другу, имеют обрезанные под прямым углом концы. В материале не свишея форма клеток может быть атипичной: короткие, толстые или вздутые палочки, иногда зернистые со вздутием на конце или середине клетки. В несвежем материале лизис клеток может привести к обнаружению в мазках «теней микробов», представляющих более устойчивые к окислению капсулы возбудителя. В препаратах, окрашенных специальными методами, клетки окружены капсулой, у парных клеток и в коротких цепочках она общая для нескольких клеток. При окраске метиленовым синим Леффлера клетки синего цвета окружены розовым капсулярным материалом, что считается характерным для *B. anthracis*. В мазке, окрашенном по методу Гимзы, капсулы бледномалинового цвета.

В организме животного, в нескрытых трупах возбудитель споры не образует, для их формирования необходимы: доступ кислорода, температура 26-30° С, нейтральная или слабощелочная реакция окружающей среды.

В мазках из материала при микроскопическом исследовании могут быть обнаружены клетки морфологически сходных бактерий, например *C. perfringens* (крупные, грамположительные, капсулообразующие).

Клетки *B. anthracis* могут быть дифференцированы от *C. perfringens* окраской препаратов по Романовскому. При этом капсула *B. anthracis* имеет почти прямоугольную форму, четкий контур, красно-лиловый цвет, а капсула *C. perfringens* имеет овальную форму и голубой цвет.

При наличии сибирезвенных люминесцирующих сывороток препараты окрашивают ими в прямом варианте МФА. Имеющиеся люминесцентные сыворотки дают перекрестные реакции с *B. cereus*. Обнаружение в мазках светящихся клеток позволяет подозревать наличие в материале возбудителя сибирской язвы.

Молекулярные методы

Фирма «Нарвак» выпускает тест-систему для идентификации возбудителя, имеющего ген капсулообразования (*capB*), в ПЦР. Чувствительность метода $1 \times 10^3 - 2 \times 10^3$ мкг/г ткани.

Выделение и идентификация возбудителя сибирской язвы

B. anthracis — факультативный анаэроб, температурный оптимум 36°C , оптимум pH 7,4. К питательным средам неприхотлив. Исследуемый материал высевают на МПБ, МПА или бульон и агар Хоттингера, для выявления способности к капсулообразованию на среду ГКИ, Томова, Буза. На средах Томова, Буза посевы инкубируют в атмосфере 20–40% CO_2 . Одновременно можно делать посев из свежего материала (с минимальным количеством крови) в систему для диск-прицепитации. Контаминированный материал засевают на дифференциально-диагностические среды фенолфталеинфосфатом натрия, среду Kinsley. Посевы инкубируют при 36°C 18–24 часа и учитывают результат. При отсутствии роста посевы выдерживают еще 48 часов.

Характер роста *B. anthracis* на питательных средах. На обычных плотных питательных средах возбудитель формирует крупные шероховатые серо-белые колонии диаметром 2–3 см (R-формы). Центр или часть колоний может быть затемнен, периферия с локонообразными отростками, иногда колоний без отростков и слабо выраженной шероховатостью. Характерную структуру колонии изучают под малым увеличением микроскопа. Колония состоит из локонов («голова Медузы», «львиная грива»), которые в свою очередь образованы переплетающимися цепочками бактерий. Кроме колоний R-формы могут появляться колонии S- и промежуточные O-формы, редко колонии с незначительной узорчатостью — эрозивная форма.

При росте *B. anthracis* в МПБ среда остается прозрачной, на диске виден в виде ватообразных хлопьев (типичный рост), иногда возможен диффузный рост.

На дифференциально-диагностической среде отбирают для изучения колонии бактерий с отрицательной реакцией на щелочную фосфатазу. Для этого в крышку чашки Петри с посевами наливают 1–2 мл 25% водного раствора аммиака. Закрывают чашку (крышкой вниз) выдерживают 1 минуту при комнатной температуре, затем просматривают под

лым увеличением микроскопа. Отбирают для изучения все бесцветные колонии (нет щелочной фосфатазы) и не исследуют порозовевшие колонии.

На средах Томова и Буза колонии S или SM-формы гладкие, блестящие, слизистой консистенции. Среда Томова обладает селективными свойствами, на ней растет *B. cereus*, но не растут *B. subtilis*, *B. megaterium*.

Рост *B. anthracis* в системе для диск-преципитации сопровождается через 16-20 часов образованием в средней части столбика агарового геля тонкой белой линии преципитации (диск). Антигенно-родственные виды бацилл (*B. cereus*) могут образовывать в нижней части агарового столбика (на границе с иммунной сывороткой) более толстую, рыхлую зону преципитации. Для изучения отвивают культуры, давшие при росте зону преципитации.

Морфология и тинкториальные свойства *B. anthracis* в культуре. На подозрительных колониях, бульонных культурах, систем для диск-преципитации (при наличии преципитации) делают мазки и окрашивают по Граму люминесцирующими сыворотками.

В бульонной культуре и колониях клетки возбудителя образуют более длинные цепочки, чем в животных тканях. Палочки при этом слегка утолщены на концах («бамбуковая трость»). Возбудитель на обычных питательных средах капсулу не формирует, но она есть у клеток культур, выращенных на средах Томова и Буза. В мазках из бульонной культуры с диффузным ростом в основном находят отдельно или парно расположенные клетки, редко — короткие цепочки. Результаты люминесцентной микроскопии имеют ориентировочное значение.

При обнаружении в окрашенных препаратах бактерий с характерными для *B. anthracis* морфологическими и тинкториальными свойствами культуры отвивают на МПА, МПБ, можно на систему для диск-преципитации с целью дальнейшего изучения. Смешанные культуры дробно засевают на МПА в чашках Петри или заражают белых мышей для получения чистой культуры возбудителя.

B. anthracis образует споры в питательных средах, бедных белковым азотом, углеводами; быстрее на плотных, чем жидких средах. При 37° С уже через 30-40 часов отмечается интенсивное спорообразование, при 18-20° С — через 48-72 часа. Споры овальной формы, сильно преломляют свет, размеры 0,8-1,0x1-1,5 мкм.

Биопроба. Проводят одновременно с посевом материала на питательные среды. Исследуемый материал суспендируют в небольшом объеме стерильного физиологического раствора, 0,2-0,5 мл взвеси вводят двум белым мышам подкожно в область спины или 0,5-1,0 мл двум морским

свинкам подкожно в область живота. Наблюдение за животными ведут в течение 10 суток, гибель в положительных случаях обычно наступает через 1-3 суток. Павших животных подвергают полному бактериологическому исследованию.

Гибель хотя бы одного из двух зараженных лабораторных животных и выделение культуры возбудителя из его органов является основанием для постановки положительного диагноза.

Если чистая культура возбудителя получена ранее гибели животного зараженных исследуемым материалом, то, не дожидаясь результатов биопробы, проверяют патогенность выделенной бактерии путем заражения двух белых мышей сutoчной бульонной культурой.

При исследовании материала от свиней, с учетом штаммовых вариаций по вирулентности, необходимо заразить до 10 мышей, а наблюдения продолжать за зараженными животными до 10-20 дней.

У штаммов *B. anthracis* вирулентность может варьировать в широких пределах. Для оценки свойств штаммов представляют интерес критерии по определению типа *B. anthracis*, предложенные Dong Shulin (цит. по Буканову И.А. и соавт., 2001). Те или иные свойства штамма связаны с присутствием в клетках плазмид, детерминирующих синтез факторов вирулентности. С точки зрения диагностики существенны следующие фено-типические признаки *B. anthracis*, обуславливаемые плазмидами: наличие капсулы, токсина, патогенность для животных и форма колоний. С целью установления типа штамма испытуемую культуру засевают на плотную и жидкую питательные среды с 50% сыворотки крови барана или кролика с 0,9% NaHCO₃. Посевы инкубируют при 37° С в атмосфере 10-12% CO₂ в течение 24 часов. На плотных средах, в зависимости от характеристик штамма, могут формироваться колонии R-, S- и M-формы, клетки бактерий могут быть капсулированы или нет, в культуральной жидкости могут присутствовать или отсутствовать экзотоксин, культуры могут быть патогенными или непатогенными для животных. Согласно Dong Shulin штаммы по этим критериям подразделяются на четыре типа.

1-й тип. Вирулентный штамм. Колонии M-формы, есть капсула, токсин (культуральный фильтрат при внутрикожном введении кроликам и морским свинкам вызывает образование отека) выявляется в РДП, культура патогенна для животных. Такие свойства обусловлены наличием плазмид рх01 и рх02.

2-й тип. Вакцинный штамм. Колонии R-формы, капсулы нет, токсин есть, культура не патогенна для животных. Имеется плаزمида рх01.

3-й тип. Авирулентный штамм. Колонии M-формы, есть капсула, токсин на нет, культура патогенна для животных. Присутствует плазмида рх01.

4-й тип. Непатогенный штамм. Колонии S-формы, капсулы и токсина нет, культура не патогенна для животных. Плазмиды отсутствуют.

Дифференциация возбудителя сибирской язвы от сапрофитных бацилл. В том случае, когда в мазках из исследуемого материала обнаруживают капсулированные бактерии с типичными для *B. anthracis* морфологическими и тинкториальными свойствами, а при посеве на питательные среды выделяют характерные по культуральным и морфологическим свойствам бактерии, то дальнейшее изучение культуры не проводят и диагноз считают установленным.

При отсутствии четких результатов микроскопического исследования исходного материала и характерных для возбудителя культуральных признаков, не дожидаясь результатов биопробы, исследуют чувствительность выделенной культуры к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья») и сибиреязвенному фагу.

При необходимости дифференциации выделенной культуры от сапрофитных бацилл также дополнительно определяют у нее способность к капсулообразованию в опытах *in vitro*, *in vivo*, рост в аэробных, анаэробных условиях, наличие жгутиков, гемолитическую активность, синтез лецитиназы, уреазы, реакцию Фогес-Проскауера, образование кислоты из арабинозы, ксилозы, гидролиз желатина, крахмала. Самыми надежными методами идентификации *B. anthracis* считаются тест на фагочувствительность, обнаружение в ПЦР-генах, кодирующих синтез токсина и капсулы, наличие патогенных свойств.

Некоторые из перечисленных методов исследования изложены ниже.

Определение вирулентности культур *B. anthracis* на кроликах.

Используют кроликов массой 2-2,5 кг. Исследуемый штамм выращивают на МПБ (24 часа), затем засевают на МПА, агар Хоттингера, культивируют 3-4 дня при 37° С. Путем микроскопии окрашенных мазков контролируют уровень спорообразования.

Когда он достигает 90-100%, бактериальную массу смывают физиологическим раствором и по стандарту мутности готовят взвеси с содержанием 1 млн, 100 тыс. и 1000 тыс. спор в 1 мл. Каждой взвесью в объеме 1 мл заражают подкожно в область живота двух кроликов, наблюдение ведут в течение 10 суток.

Слабо вирулентные и авирулентные штаммы не вызывают гибели кроликов при любой дозе; умеренно вирулентные штаммы вызывают гибель животных при дозах 1 млн. - 100 тыс. спор; высоко вирулентные штаммы обуславливают гибель при дозе 10 тыс. спор.

Метод применяют для изучения штаммов, выделенных из объектов внешней среды.

Метод обнаружения капсулообразования *in vivo*. Бульонную культуру в дозе 0,1-0,2 мл вводят внутрибрюшинно 6-8 белым мышам. Животных убивают через 1,2 и 3 часа, вскрывают, из перитонеального экссудата и органов делают мазки, окрашивают одним из методов на капсулу и микроскопируют.

Метод обнаружения капсулообразования *in vitro*. Испытуемую культуру высевают на среду ГКИ, Шляхова, пробирки закрывают резиновыми пробками, культивируют при 37°C. Через 0,5-2 часа у части, а через 15-18 часов у большинства клеток обнаруживают капсулу.

Испытуемую культуру также можно высевать на плотные среды Томова, Буза. Инкубирование проводят в атмосфере 20-40% CO₂ при 37°C в течение 18-24 часов. При этих условиях на среде Томова возбудитель растет в S-форме и образует капсулу. На среде Буза возбудитель образует гладкие, слизистой консистенции колонии и, в отличие от *V. septicus*, не дает гемолиза.

Определение чувствительности к пенициллину (тест «жемчужин ожерелья»). В чашки Петри разливают обычный МПА и с содержанием 0,5 и 0,05 ЕД пенициллина в 1 см³. Из застывшего агара вырезают квадраты геля (1,5x1,5 см), помещают их на предметные стекла в чашках Петри, засевают при помощи бактериологической петли 3-часовой бульонной испытуемой культурой и помещают в термостат. Через 1-3 часа на поверхность агаровой пластины помещают покровное стекло и препараты изучают в микроскопе с сухой (объектив х 40) и иммерсионной системами. Чувствительные к пенициллину клетки *V. anthracis* принимают форму шара, а цепочки имеют вид «ожерелья», что является следствием L-трансформации клеток в результате нарушения синтеза клеточной стенки. В контроле на обычном агаре клетки *V. anthracis* имеют обычную форму. При отрицательном результате инкубирование продолжают до 48 часов и проводят окончательный учет результатов. Сапрофитные бактерии не чувствительны к пенициллину и при посеве на указанные среды не меняют морфологию клеток.

Таблица 39 - Дифференцирующие признаки *B. anthracis* и некоторых других видов рода

Признаки	Вид бактерий				
	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycoides</i>
1	2	3	4	5	6
Морфология колоний на МПА	Серо-белые, шероховатые колонии, с локонообразными отростками. Под малым увеличением микроскопа края колонии имеют форму «головы медузы»	Белые, круглые, плотные колонии с извитыми нитями по краям	Серовато-белые складчатые колонии	Матово-белые морщинистые колонии с отростками	Серовато-белые Колонии корневидной формы
Характер роста в МПБ	Среда прозрачна, хлопьевидный ватообразный осадок, легко смывающаяся пристеночное кольцо	Помутнение среды, крошковатый осадок, Поверхностная пленка. Пристеночное кольцо	Помутнение среды, после формирования пленки среда просветляется	Помутнение среды, пленки нет, небольшой осадок	Среда прозрачна, на дне трудно разбивающийся осадок
Характер роста в МПЖ	Рост в виде «перевернутой елочки», медленное разжижение	Вдоль укола горизонтальные отростки, быстрое разжижение	Разжижение, на поверхности пленка	Разжижение в виде воронки	Разжижение кратерообразной формы
Характер роста на сыпороточных агаре в атмосфере с повышенным содержанием кислорода	Мукоидные колонии или колонии S-формы	Колонии шероховатого типа	Колонии шероховатого типа	Колонии шероховатого типа	Колонии шероховатого типа

Таблица 39 (продолжение)

1	2	3	4	5	6
Рост на среде в присутствии кислорода	растет	растет	Варьирующие данные. Большинство штаммов растут	не растет	растет
Рост в анаэробных условиях	растет	растет	не растет	не растет	растет
Способность сосулы на сыпороточных средах при повышенном со-	+	-	-	-	-

держании CO ₂					
Наличие жгутиков	-	+	+	+	-
Образование лецитиназы	+ (медленно)	+	-	-	+
Образование гемолизина (эритроциты барана)	-	+	-	-	+
Образование уреазы	-	+	-	-	+
Реакция Фогес-Проскауера	+	-	+	-	+
Образование кислоты из Д-арабинозы	-	-	+	±	-
Образование кислоты из Д-ксилозы	-	-	+	±	-
Гидролиз крахмала	+	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6
Патогенность для белых мышей, кроликов и морских свинок (п.к или в.венно)	+	+	-	-	-
	+	-	-	-	-
Чувствительность к фагу	+	-	-	-	лизуются некоторые штаммы
Чувствительность к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья»)	+	-	-	-	-

Виды *B. megaterium* и *B. mesentericus* объединены в один вид — *B. megaterium*; *B. anthracis* и *B. pseudanthracis* отнесены к *B. cereus*.

Идентификация *B. anthracis* при помощи сибиреязвенного бактериофага (К-ВИЭВ, Гамма МВ А, Fah - ВНИИВМ). Используют для идентификации выделенных чистых культур возбудителя или непосредственно в первичных посевах. В первом случае испытуемую культуру концентрацией 125-500 млн м.к./мл засевают на шесть пробирок со стерильным МПА (без конденсата) равномерно по всей поверхности среза и выдерживают посевы 15 минут при 37° С. Далее в 4 пробирки вносят

одной капле неразведенного фага и ставят их в штатив до стекания капли. В две пробирки фаг не вносят (контроль). Исследование можно проводить в чашках Петри с предварительно подсушенным агаром, разделенным по три квадрата в трех горизонтальных полосах. На три квадрата наносят исследуемую культуру (материал) бактериологической петлей, подсушивают пять минут. Затем на два квадрата наносят неразведенный бактериофаг, третий служит контролем. Посевы инкубируют при 37°C 6-18 часов. Для идентификации возбудителя в первичных посевах аналогичным способом на МПА засевают исследуемый материал и далее поступают, как описано выше.

Учет результатов проводят через 6-8 и 12-18 часов. В контроле должен быть сплошной рост культуры по всей поверхности среды. Положительным результатом является стерильная «дорожка» по ходу стекания капли фага или отсутствие роста в квадрате с фагом.

Обнаружение антигенов *B. anthracis* в патологическом материале при помощи реакции преципитации. Только в РП исследуют загнивший материал. Если доставленное ухо обескровленно, исследуют и свежий материал.

Свежий тканевый материал перед исследованием выдерживают 18-20 часов в термостате, несвежий исследуют сразу.

Способы экстрагирования растворимых антигенов *B. anthracis*.

Горячий способ. 1-2 грамма ткани заливают в соотношении 1:10 0,9%-ым раствором натрия хлорида и кипятят в водяной бане 30-40 минут.

Холодный способ. 1-2 грамма материала растирают в ступке с песком, заливают фенолизированным (0,3% фенола) физиологическим раствором в соотношении 1:10 и экстрагируют при 20°C в течение 16-18 часов. Экстракты фильтруют через асбестовую вату и исследуют как антиген в реакции кольцепреципитации методом наслаивания или подслаивания.

Метод наслаивания. В уленгутовскую пробирку вносят 0,2-0,3 мл преципитирующей сибиреязвенной сыворотки, затем осторожно наслаивают экстракт, чтобы оба компонента не перемешались.

Метод подслаивания. В уленгутовскую пробирку вносят 0,2-0,3 мл исследуемого экстракта. Под него при помощи пастеровской пипетки подслаивают равный объем иммунной сыворотки. Контроль: аналогичным образом ставят РП с преципитирующей сывороткой и стандартным сибиреязвенным антигеном. Положительный результат — наличие бесцветного диска преципитации на границе компонентов в опыте и контроле через 1-2 минуты, но не позднее 15. Положительный результат РП явля-

ется достаточным основанием для положительного диагноза на сибирскую язву.

Обнаружение антигенов *B. anthracis* в кожевенно-меховом сырье проводят в соответствии с «Наставлением по исследованию кожевенного и мехового сырья на сибирскую язву реакцией преципитации».

Питательные среды. Среда ГКИ. К раствору Хенкса добавляют 40% (объем/объем) стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота инактивированной при 56°C 30 минут. Раствор Хенкса можно заменить бульоном Хоттингера (рН 7,2-7,4). Среду используют для обнаружения способности капсулообразования у *B. anthracis*.

Среда Томова. В состав среды входят: 50 мл пептонного агара (10% ный раствор агара, 2,5%-ный раствор пептона, 0,5%-ный раствор натрия хлорида), 100 мл сыворотки крови крупного рогатого скота, 50 мл куриного белка, 25 мл 0,4% гемина в 0,01 N растворе натрия гидроксида, 25 мл 0,01 N уксусной кислоты. В стерильной колбе смешивают сыворотку крови, белок подогревают до 50°C и добавляют к расплавленному пептонному агару, имеющему температуру 50°C. Затем добавляют раствор гемина, уксусную кислоту, компоненты перемешивают и стерильно разливают в чашки Петри. На данной среде возбудитель сибирской язвы растет в S- или SM-форме.

Среда обладает селективными свойствами: растут *B. anthracis*, *B. cereus*; не растут *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. mycoides*.

Среда Kniesely. К расплавленному питательному агару добавляют 40 мкг/мл лизоцима, 30 ЕД/мл полимиксина, 300 мкг/мл натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 40 мкг/мл таллия ацетата. Растворы предварительно стерилизуют фильтрацией, устанавливают рН 7,35. Через 24-48 ч инкубирования при 37° С *B. anthracis* вырастает в виде мелких, гладких колоний.

Другие виды бацилл на этой среде обычно не растут. ЭДТА и ацетат таллия можно вносить в среду до автоклавирования.

Лизоцимовая среда. Первоначально готовят раствор лизоцима, содержащий 10000 ЕД в дистиллированной воде, стерилизуют фильтрацией. 1 мл раствора лизоцима смешивают с 99 мл стерильного питательного бульона и разливают по 2,5 мл в пробирки. При изучении бацилл, патогенных для насекомых, 1 мл лизоцимового раствора (0,1%) смешивают с 99 мл полужидкого агара, который готовят следующим образом. В 1 л дистиллированной воды растворяют 10 г агара, 3 г Na_2HPO_4 , по 5 г дрожжевого экстракта и триптона; фильтруют, устанавливают рН 7,3-7,5 и стерилизуют при 121° С 20 мин. Затем стерильно добавляют раствор глюкозы

на расчета 2 г/л. Глюкозу предварительно стерилизуют в виде 10%-ного раствора при 115° С 20 минут. Используют для идентификации видов рода *Bacillus*.

Дифференциально-диагностическая среда с фенолфталеинфосфатом натрия. К 100 мл питательного агара, расплавленного и имеющего температуру 45-50° С, добавляют следующие растворы: 0,5 мл полимиксина М сульфата, 0,5 мл невигамона, 10 мл гризеофульвина, 10 мл моющего средства «Прогресс», 0,1 мл натрия фенолфталеинфосфата. Компоненты перемешивают, разливают в чашки Петри. Среда пригодна 1-2 сут. при хранении в условиях холодильника.

Через 18-24 ч культивирования посевов в крышку чашки Петри вносят 1-2 мл 25%-ного водного раствора аммиака. Чашку выдерживают (крышкой вниз) при 20° С 1 минуту и учитывают результат. Колонии бактерий с фосфатазной активностью розовеют, остальные колонии, в том числе *B. anthracis*, остаются бесцветными. Среда обладает селективными свойствами.

Приготовление растворов. Полимиксина М сульфат растворяют в физиологическом растворе из расчета 10000 ЕД/мл, невигамон растворяют в 25%-ном водном растворе аммиака, затем разводят стерильным 0,9%-ным раствором натрия хлорида до концентрации 100 мкг/мл. Моющее средство «Прогресс» разводят стерильной дистиллированной водой до концентрации 0,1%. Гризеофульвин растирают в ступке, растворяют в стерильной дистиллированной воде до концентрации 100 мкг/мл. Натрия фенолфталеинфосфат (коммерческий 10%-ный раствор) прогревают на водяной бане при 56° С 30 минут.

Среду используют для выделения из загрязненного материала возбудителя сибирской язвы.

Таблица 40 - Получение необходимой концентрации пенициллина

№	Концентрация разводимого пенициллина	Количество добавляемого МПБ	Полученная концентрация пенициллина (ЕД)	Количество среды			
				100 мл		10 мл	
				Вносят раствор пенициллина (мл)	Концентрация пенициллина (ЕД/мл)	Вносят раствора пенициллина (мл)	Концентрация пенициллина (ЕД/мл)
1	10000 ЕД	10	10000				
2	1000 ЕД	10	1000				

3	мл разв. № 2	9	100	0,5	0,5		
4	мл разв. № 3	9	10	0,5	0,05	0,5	0,5
5	мл разв. № 4	9	1			0,5	0,05

Среда Буза. К 3%-ному голодному (без пептона) агару (рН 7,2-7,4) добавляют 15% дефибрированной крови барана. Используют для культивирования возбудителя сибирской язвы.

Приготовление системы для диск-преципитации. Стандартную преципитирующую сыворотку разливают по 0,5- 1 мл в стерильные бактериологические пробирки. Осторожно, во избежание перемешивания при помощи пастеровской пипетки по стенке пробирки наслаивают 1%-ный агаровый гель (температура 45-50° С) до получения столбика высотой 5-7 мм. После застывания агара на его поверхность наливают 1-1,5 мл жидкой питательной среды (среда ГКИ, бульон Хот-тингера с сывороткой крови). Систему используют в день приготовления.

Агаровый гель (1%-ный, рН 7,0) готовят из агара «Дифко» или обычного агар-агара путем его очистки. В последнем случае 5 г агара помещают в 300 мл дистиллированной воды (рН 7,0), растворяют в кипящей водяной бане. В расплавленный агар добавляют 0,5 г $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, после растворения охлаждают агар до 50° С, добавляют 100 мл водного раствора куриного яичного белка и вновь нагревают в кипящей водяной бане 15-20 минут. Если в течение этого времени яичный белок плохо свертывается, то добавляют еще 0,25-0,5 г хлористого кальция и нагревают раствор до появления хлопьев осадка. Затем горячий раствор фильтруют через смоченный в дистиллированной воде и отжатый ватный фильтр. К профильтрованному агару вновь добавляют раствор яичного белка и всю процедуру повторяют.

Готовый агаровый гель разливают в пробирки (колбы) и стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 минут. Гель пригоден для использования в течение 6 месяцев (хранение при 2-4° С).

Приготовление питательного агара для постановки теста «жемчужного ожерелья». Стерильный МПА разливают в 3 пробирки по 10 мл или в 3 колбы по 100 мл. В две пробирки (колбы) с расплавленным и охлажденным до 45-50°С агаром стерильно вносят пенициллин до концентрации 0,5 и 0,05 ЕД/мл. Третья пробирка является контрольной. Растворы пенициллина на МПБ готовят согласно таблице 40.

Лабораторная диагностика туберкулеза

Туберкулез — хронически протекающая инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных и диких животных, пушных зверей

птицы, характеризующаяся образованием в различных органах специфических узелков — туберкулов, склонных к творожистому распаду. Возбудителями болезни являются бактерии из рода *Mycobacterium*.

Микобактерии представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки, размером 0,2-0,7 x 1,0-10 мкм, иногда ветвящиеся. На одной из стадий роста кислото- и спиртоустойчивые. По Граму окрашиваются с трудом, обычно слабо грамположительные. Патогенные свойства микобактерии представлены в таблице 41.

Диагностика туберкулеза основана на результатах патологоанатомического, бактериологического (включая биопробу) и аллергического методов исследования.

Лабораторная диагностика основана на бактериологическом исследовании. Бактериологическое исследование включает световую микроскопию, выделение чистой культуры и идентификация по культуральным, биохимическим, патогенным свойствам, использование молекулярных и серологических методов.

Бактериологическое исследование

Для исследования прижизненно направляют для исследования бронховидную слизь, молоко; посмертно - бронхиальные, заглоточные, средостенные, предлопаточные, надвымянные лимфатические узлы. Труп птицы (или тушку) направляют целиком — исследуют пораженные печень, селезенку, легкие, яичники. Материал транспортируют в свежем или замороженном виде. В случае необходимости тканевой материал консервируют в 30%-ном водном растворе глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала. Бактериологическое исследование дает возможность выявить возбудитель при условии, что в 1 кубическом см материала содержится минимум

Таблица 41 - Микобактерии, которые могут быть выделены при различной патологии животных

Вид микобактерий	Хозяин	Патология
1	2	3
Туберкулезная группа (медленнорастущие)		
<i>M. africanum</i>	Человек	Туберкулез человека (Африка)
<i>M. tuberculosis</i>	Человек, собаки	Туберкулез человека (распространен повсеместно)
<i>M. bovis</i>	Многие виды животных и человек	Бычий туберкулез
<i>M. magerit</i>	Мыши	Туберкулез мышей: локальные поражения у кроликов, крупного рогатого скота и морских свинок.
Группы Раншон		

<i>1. Фотохромогенные</i>		
(медленный рост - свыше 7 суток инкубации; сапрофиты, однако изредка обуславливают патологию у животных)		
<i>M. kansasii</i>	Олени, свиньи, крупный рогатый скот	Туберкулезоподобные болезни; изолируют из легких и лимфатических узлов
<i>M. simiae</i>	Человек	Легочная патология человека
<i>M. marinum</i>	Морская рыба, водные млекопитающие и амфибии	Туберкулез рыб: гранулематозные и диссеминированные поражения
<i>M. vaccae</i>	Сапрофит	Не патогенен
<i>2. Скотохромогенные</i> (медленнорастущие; обычно сапрофиты; иногда вызывают патологию у животных и человека)		
<i>M. scrofulaceum</i>	Домашние и дикие свиньи Крупный рогатый скот и буйволы	Туберкулезные поражения в цервикальных и кишечных лимфатических узлах
<i>3. Нехромогенные</i> (медленнорастущие)		
<i>M. avium</i>	Птица	Птичий туберкулез. У млекопитающих генерализованная форма встречается редко
	Свиньи	Повреждения цервикальных лимфатических узлов
	Лошади, свиньи и другие животные	Редко поражения кишечника
<i>Таблица 41 (продолжение)</i>		
1	2	3
<i>M. intracellulare</i> (Battay bacillus)	Куры и дикая птица	Птичий туберкулез. Сапрофиты почвы и воды
	Свиньи и крупный рогатый скот	Могут присутствовать в лимфатических узлах кишечника
	Приматы (кроме человека)	Гранулематозный энтерит
<i>M. ulcerans</i>	Кошки	Нодуло-ульцеративные повреждения
<i>M. xenopi</i>	Кошки	Нодуло-ульцеративные повреждения
	Свиньи	Туберкулезные повреждения в лимфатических узлах кишечного тракта
<i>4. Быстрорастущие</i>		
(микобактерии вырастают быстрее 7 суток инкубирования; пигментация варьирует; сапрофиты почвы, воды, растений; регулярно обнаруживаются в кишечнике свиней, жвачных и других животных; могут быть патогенны для животных)		
<i>M. chelonae</i>	Рыбы	Диссеминированные гранулематозные поражения
	Черепашки	Туберкулезоподобные поражения в легких
	Крупный рогатый скот	Туберкулезоподобные поражения в легких
	Кошки и свиньи	Абсцессы и нодуло-ульцеральные поражения в различных тканях

	Обезьяны	Абсцессы в лимфатических узлах или диссеминированные поражения
<i>M. fortuitum</i>	Крупный рогатый скот	Грануломатозные повреждения в лимфатических узлах
	Кошки	Ульцеративные пногрануломатозные поражения кожи
	Собаки	Грануломатозные поражения кожи и легких
	Свиньи	Грануломы в лимфатических узлах, суставах и легких
<i>M. phlei</i>	Кошки	Нодуло-ульцеративные повреждения кожи (редко)
<i>M. mageritensis</i>	Крупный рогатый скот	Грануломатозный мастит
	Кошки	Ульцеративные повреждения кожи

1. Основаны данные Bispring W., Amsberg G (1998); Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (1994); Roberts A.D., Koneman E.W., Kim Y.K (1995); Runyon E.H. (1959), 1987).

2. Согласно последним данным род *Mycobacterium* подразделяется на три группы: 1 — медленно растущие; 2 — быстрорастущие; 3 — некультивируемые и требующие особых питательных сред (Runyon E.H., 1987)

30-100 тыс. микобактерий, т.е. он является наименее чувствительным из всех методов. Морфологически некоторые виды сапрофитных микобактерий сходны с патогенными, поэтому результаты исследования имеют ориентировочное значение.

Мазки делают из мокроты, гноя и т.п. При исследовании органов берут участки без признаков обызвествления. Мазки получают путем разламывания материала между предметными стеклами и фиксируют спиртом-эфиром. Мочу предварительно многократно центрифугируют с наслоением каждый раз новой порции, из осадка готовят мазки. Молоко центрифугируют при 2000-3000 об/мин., в течение 30-40 минут. Мазки делают из верхнего слоя и осадка. После высушивания мазки обрабатывают для удаления жира спирт-эфиром в течение 20-30 минут. Кал (небольшое количество) растирают в стерильной ступке, добавляют для получения жидкой консистенции 25%-ный раствор NaCl. Массу фильтруют через марлю. К 4-5 мл фильтрата добавляют 1-2 мл эфира, центрифугируют при 3000-4000 об/мин в течение 15-25 минут. Из верхнего слоя готовят мазки.

С целью концентрирования клеток микобактерий и повышения эффективности микроскопического исследования применяют также следующие методы.

Метод флотации. В колбу емкостью 250 мл помещают 10-15 мл материала (мокрота, осадок мочи, гной, экссудат, кал), добавляют равный объем 0,5%-ного раствора NaOH. В случае густого материала добавляют двойной объем щелочи. Компоненты встряхивают несколько раз, вносят

50 мл дистиллированной воды и 1 мл толуола (ксилола, бензина), встряхивают смесь 10-15 минут на шуттель-аппарате. Вносят в колбу дистиллированную воду до горлышка и оставляют при комнатной температуре на 1-2 часа.

Образовавшийся на поверхности жидкости сливкообразный слой снимают пипеткой и готовят из этого материала мазки.

Способ Гона. Исследуемый материал растирают в стерильной ступке, смешивают 1:4 с 3-6%-ным водным раствором H_2SO_4 и центрифугируют в течение 10-15 минут. Осадок 2-3 раза отмывают физиологическим раствором. Из осадка готовят мазки.

Способ Аликаевой. Исследуют свежий или малозагрязненный материал. Ткани разрезают на кусочки размером 0,5 x 0,5 см, заливают на 10-20 минут 3-6%-ным раствором H_2SO_4 . Затем кислоту удаляют и заменяют ее стерильным физиологическим раствором (в большом объеме). Через 1-8 минут физиологический раствор удаляют, кусочки ткани заливают в большом количестве физраствора и растирают в ступке. Из гомогената готовят мазки для окраски.

Приготовленные мазки окрашивают по методу Циля-Нильсена. Окрашенные мазки изучают, внимательно просматривая много полей зрения (30-500). В положительных случаях обнаруживают палочковидные, тонкие, прямые бактерии, иногда зернистые, изогнутые, расположенные под углом в виде цифры V, кучками, небольшими скоплениями. Клетки окрашены в красный цвет, размер 0,2-0,5 x 1-4 мкм, фон синий.

Метод прямого флуорохромирования. Для прямого обнаружения микобактерий в материале можно использовать метод люминесцентной микроскопии. Из материала, подготовленного общепринятыми способами, готовят мазки, фиксируют не на пламени, окрашивают раствором флуорохромов (0,1 гаурамина 0,01 г родамина в 100 мл дистиллированной воды) в течение 10-15 минут и осторожно промывают дистиллированной водой; обесцвечивают 3%-ным раствором $HC1$ в 70%-ном этаноле 15-30 с и промывают; обрабатывают раствором, содержащим 1 г кислого фуксина, 1 г лебяжьей уксусной кислоты и 500 мл воды в течение 1-2 минут, затем метиленовой синькой Леффлера — 2 минуты; промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

Клетки микобактерий золотисто-зеленоватые. Более эффективным вариант с подращиванием микобактерий на мембранных фильтрах. С этой целью на скошенную среду Петраньяни помещают полоску мембраны

го фильтра № 3, опустив ее конец в конденсационную жидкость и засевают материалом.

Через три дня инкубации полоску бумаги помещают на предметное стекло, фиксируют на пламени, окрашивают, как описано выше. Микрокопируют в сине-фиолетовом свете с увеличением 7х40. В положительных случаях находят ярко-оранжевые или золотисто-зеленые микроколонии на темно-зеленом фоне.

Молекулярные методы

Фирма «Нарвак» выпускает тест-систему для идентификации и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* в ПЦР.

Выделение и идентификация культур микобактерий

Культивирование. Бактериологическое исследование позволяет выявить 20-100 микобактерий в 1 г исследуемого материала, т.е. он существенно чувствительнее бактериоскопического.

Из каждого лимфатического узла вырезают кусочки объемом около 0,5 см³ на границе здоровой и измененной ткани. Общая масса ткани лимфатических узлов должна быть 6-10 г. Лимфатические узлы из области торакокальального соединения и подвздошной кишки обрабатывают и высевают отдельно.

Исследуемый материал перед посевом на питательные среды подвергают обработке с целью подавления роста сопутствующей некислотоустойчивой микрофлоры, освобождения микобактерий от муцина (в образцах торакобронхоэальной слизи), концентрирования клеток возбудителя. Для достижения перечисленных целей применяют методы, указанные ранее, а также нижеследующие.

Обработка материала щелочью. Более удобна, так как нет очень жестких ограничений времени контакта щелочи с материалом, кроме того, щелочь растворяет муцин, гной и т.д. В колбу с бусами помещают исследуемый материал и 4-6%-ный раствор NaOH в соотношении 1:2 и периодически встряхивают в течении 15-20 минут. Далее щелочь нейтрализуют 50%-ной H₂SO₄, содержащей настойку лакмуса. Кислоту вносят по каплям до момента розово-фиолетового окрашивания жидкости. После нейтрализации взвесь центрифугируют при 2000 об/мин в течении 9-10 минут. Осадок высевают на плотные яичные среды.

Обработка материала трехзамещенным фосфатом натрия. Данная соль угнетает рост некислотоустойчивой микрофлоры и почти не

влияет на микобактерии. Исследуемый материал и 10%-ный раствор трехзамещенного фосфата натрия смешивают в соотношении 1:1, выдерживают в термостате при 37° С в течение 24 часов, нейтрализуют соляной кислотой, центрифугируют и высевают на питательные среды.

Материал, содержащий муцин. Материал смешивают с равным объемом раствора, содержащего тринатрий фосфат и цефиран (В 1000 мл горячей воды растворяют 250 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и добавляют 1,85 мл цефирана (17%-ный), встряхивают в течение 30 минут, центрифугируют и осадок ресуспендируют в 20 мл буферного раствора (37,5 мл 0,067 N калия натрия фосфата и 62,5 мл 0,067 N калия фосфата (конечный pH 6,4) нейтрализующего цефиран и вновь центрифугируют 20 минут. Осадок высевают на питательные среды.

Плотные образцы материала (лимфатические узлы). Материал (неизмельченные образцы) выдерживают 4-16 часов в растворе глицерина (1:1000). Затем ткани и жировую пленку переносят в ступку со стерильным бульоном и индикатором фенолротом, измельчают, добавляют 2-4%-ный NaOH на 20-30 минут. Далее суспензию нейтрализуют 2N HCl, центрифугируют с целью концентрации микобактерий, осадок высевают на питательные среды, готовят окрашенные препараты для микроскопии.

Согласно ГОСТ 26072-89 рекомендуется материал обрабатывать в Гону или Аликаевой.

Для культивирования микобактерий используют различные питательные среды. Наиболее подходят для первичной изоляции среды Ловенштейна-Иенсена, Гельберга, Петраньяни, а также среда Stonebrink для *Mycobacterium bovis*. Селективные свойства средам придает добавление лахитового зеленого (0,025 г/100 мл).

Для своего роста требуют добавления глицерина (4-5%) *M. tuberculosis*, *M. avium* и ряд атипичных микобактерий, однако при этом необходимо учитывать, что глицерин ингибирует натрий пируват (0,4%), стимулирующий рост *M. bovis*.

Селективные свойства сред можно повысить добавлением линколина (2 мкг/мл), циклогексимида (400 мкг/мл). *M. bovis* при выделении материала проявляет микроаэрофильные свойства, не требует глицерина, температурный оптимум 38-40° С, *M. avium* — температурный оптимум 38-41° С, pH 6,8-7,3. *M. tuberculosis* — в первичных посевах рост стимулируется наличием в атмосфере 10-15% CO_2 , температурный оптимум 38° С, pH 6,4-7,0.

Подготовленный тем или иным способом материал засевают в пробирок с плотными средами. Посевы инкубируют при 37-38° С.

наклонном положении. Через 48 часов посевы просматривают, если цвет среды не восстановился, посев повторяют. Пробирки с ростом посторонней микрофлоры выбраковывают, в остальных пробки парафинируют. В последующем посевы просматривают еженедельно до 3 месяцев.

Ускоренные методы культивирования микобактерий (метод микрокультур на стеклах). На двух предметных стеклах готовят мазки из посевного материала. Мазки подсушивают в термостате, обрабатывают 5-10 минут 6%-ным раствором серной кислоты и трижды промывают дистиллированной водой. Затем оба стекла складывают вместе (обратными поверхностями) и помещают в культуральный сосуд, содержащий свежую гемолизированную кровь в разведении 1:4-1:6, инкубируют в течение недели. Один из мазков вынимают, промывают и окрашивают по Цилю-Нильсену или люминесцирующими красителями.

Вирулентные штаммы образуют на стеклах микроколонии в виде кос, углов (наличие корд-фактора) или звездчатых образований.

Сапрофитные и атипичные микобактерий обычно грубее, толще, не образуют сплетений. Метод уступает по чувствительности обычному посеву на питательные среды и может быть использован лишь как вспомогательный.

При обнаружении роста микобактерий для изучения свойств выделенной культуры отбирают колонии, наиболее характерные для возбудителя туберкулеза, бактериальную массу тщательно растирают в 1-1,5 мл стерильного физиологического раствора. Взвесь засевают на яичные среды и пробирку с МПБ.

Особенности роста микобактерий на питательных средах. По скорости роста на питательных средах различают медленнорастущие микобактерий туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*), микобактерий 1,2,3 групп по классификации Раншон, а также быстрорастущие микобактерий. Деление микобактерий на медленно- и быстрорастущие достаточно условно. К медленнорастущим принято относить виды, дающие непрозрачно-видимый рост на питательных средах позднее семи суток культивирования. Кроме классических возбудителей туберкулеза известно много микобактерий, отличающихся главным образом тем, что они не вызывают характерного для туберкулеза заболевания при подкожном заражении морских свинок. Эти микобактерий объединены под общим названием «атипичные микобактерий». Патогенные свойства некоторых из них представлены в таблице 41.

Раншон по скорости роста и пигментообразованию подразделил атипичные микобактерий на следующие группы:

Фотохромогенные — колонии формируются через 2 недели при 37°С и через 3 недели — при комнатной температуре. Образуют желтый или оранжевый пигмент, при культивировании на свету дают более интенсивное окрашивание колоний. Типовой вид — *M. kansasii*. Пигмент образуют кристаллами В-каротина, которые различимы при изучении колоний под малым увеличением, что позволяет достаточно надежно отличить бактерии этой группы от других микобактерий. *M. kansasii* образует колонии от SR до RS, но могут быть и R-формы. *M. marinum* — SR. *M. simiae* — S.

Скотохромогенные. У пигментнообразующих штаммов колонии окрашены в желто-оранжевый цвет независимо от культивирования на свету или в темноте. *M. scrofulaceum* образует колонии S-формы через 2-3 недели культивирования.

Нефотохромогенные бактерии. Колонии формируются через 3-10 суток или позднее. Колонии обычно кремовые, иногда полупрозрачные. S-формы, реже SR- и R-формы. Старые культуры некоторых штаммов могут быть желто-оранжевыми, но окрашивание не зависит от наличия света.

Весьма сходны виды *M. avium* и *M. intracellulare* (комплекс *avium-intracellulare*). Образуют звездчатые микроколонии. *M. avium* растет при 42-45°С. *M. intracellulare* не дает роста в течение трех недель инкубирования.

Умеренно, и быстрорастущие микобактерии. Колонии формируются в течение 7 суток при 37 и 25°С. Адаптированные культуры могут давать макроскопически видимые колонии через 1-2 суток, рост первичных культур может быть замедленным (до двух недель). Дифференцирование от других микобактерий по признаку пигментообразования согласно Фелдону их не удается, так как на это сходство оказывают влияние микобактериальные факторы. При дифференциации принимают во внимание способность к росту при температуре более 45°С и ускорение роста при оптимальной температуре.

При учете результатов посева исследуемого материала на питательные среды пробирки, в которых рост микобактерий появился в течение первой недели инкубирования, из дальнейшей работы исключают как недержавшие сапрофитные быстрорастущие микобактерии.

Для основных патогенных видов микобактерий характерен следующий тип роста на питательных средах.

M. tuberculosis. В первичных посевах макроскопически видимый рост наблюдается обычно на 20-30 сутки. В жидких питательных средах рост характеризуется появлением на поверхности сухой, складчатой пленки.

поднимающейся по стенкам сосуда, среда остается прозрачной — **зугонический рост**. В средах с твином-80 с потерей гидрофобности наблюдается диффузный рост. На плотных средах характерен интенсивный рост в виде узелковоподобного, морщинистого, сухого налета цвета слоновой кости. Колонии R-формы, морщинистые, суховатые, имеют неровный край, центр обычно приподнят (вирулентные штаммы). Могут встречаться S-варианты культуры.

M. bovis. Первичный рост на плотных средах наблюдается на 20-60 сутки (субкультуры на 20-30 сутки). В жидких питательных средах происходит рост на поверхности среды в виде единичных островков, постепенно сливающихся в пленку — **дисгонический рост**. На плотных средах растет в виде мелкоморщинистого, сухого, сероватого налета. Колонии мелкие, сухие, блестящие, полушаровидные, гладкие, с неровными краями, цвета слоновой кости, иногда встречаются складчатые колонии.

Таблица 42 - Отличия микобактерий от представителей других родов

Признаки	РОДЫ			
	<i>Mycobacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>
Морфология	Палочки, иногда разветвленные нити, редко воздушный мицелий	Плеоморфные палочки, часто булавовидные, расположенные под углом либо полисадом	Мицелий, с возрастом распадающийся на палочки и кокки; обычно присутствует слабо развитый воздушный мицелий	Скудный мицелий, распадающийся на неправильные палочки и кокки, воздушный мицелий отсутствует
Кислотоустойчивость	Обычно в высокой степени кислотоустойчивы	Иногда слабо кислотоустойчивы	Часто частично кислотоустойчивы	Часто частично кислотоустойчивы
Кислото- и спиртоустойчивость	По крайней мере, некоторые клетки в молодых культурах кислото- и спиртоустойчивы	Отрицательные	Отрицательные	Отрицательные
Степень окрашивания по Граму	Слабая	Выраженная	Обычно выраженная	Обычно выраженная

Таблица 42 (продолжение)

	1	2	3	4	5
Время роста при температуре 37°С		2-60	1-2	1-5	1-3
Устойчивость к окислению					
Устойчивость к спирту					
Устойчивость к нагреванию		Обычно устойчивы	Чувствительны	Устойчивы	Чувствительны

Образование арилсульфатазы	Положительные: иногда медленное	Отрицательные	Нетипично	Отрицательные
----------------------------	---------------------------------	---------------	-----------	---------------

M. avium. Растет на яичной среде с салицилатом натрия. Первичный рост на плотных средах отмечают на 15-30 сутки (субкультуры на 10-15 сутки). В жидких питательных средах растет диффузно, на поверхности среды образуется влажная жирная пленка, на дне сосуда — рыхлый осадок. На плотных средах растет в виде гладкого маслянистого налета. Колонии округлые, слизистые, мягкие, серовато-белые, с возрастом могут желтеть. Могут иметь пуговицеобразное возвышение с кратерообразным углублением.

Идентификация микобактерий на уровне рода. Исследуют отношение к окраске по методу Циля-Нильсена, Грама, морфологию клеток, кислотоустойчивость, отмечают скорость роста (появление массовых скопических видимых колоний), чувствительность к пенициллину, образование фермента арилсульфатазы, что позволяет дифференцировать микобактерий от коринебактерий, нокардий, родококков (табл. 43).

Идентификация основных патогенных видов микобактерий по культуральным и ферментативным свойствам. В лабораторных культурах микобактерий выращивают на яичных средах, яичных средах с салицилатом натрия (Среда содержит 1000 мкг/мл салицилата натрия) и МПБ при трех температурных режимах (20-25° С; 37-38° С; 45° С), по 2-3 пробирки на каждый режим. Культуры микобактерий, растущие на яичной среде с салицилатом натрия или МПБ, образующие пигмент, растущие при 22° С дальнейшему исследованию не подвергают. Остатки культур исследуют в биопробе. В случае необходимости выделенные культуры микобактерий изучают более детально.

При дифференциации возбудителей туберкулеза от сапрофитных микобактерий принимают во внимание, что последние имеют более толстые, грубые, неравномерно окрашивающиеся клетки, а также, в отличие от патогенных микобактерий, после окрашивания по методу Циля-Нильсена обесцвечиваются гипохлоритом (гипохлоритный метод: раствор гипохлорита 0,01%) и имеют формамидазу (формамидазный метод). В случае использования гипохлоритного метода мазки, углекислого калия. Через 2-3 часов оба раствора объединяют, фильтруют через бумагу и осадок растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

У выделенных культур исследуют скорость, тип роста и форму колоний в средах, содержащих глицерин, образование пигмента, верхнюю

температурный предел роста, синтез ниацина, ингибцию роста ТСН, голубым толуидиновым, редукцию нитратов, образование уреазы, пирозинамидазы, зависимость роста от натрия пирувата и др. (табл. 42, 43).

Методики постановки некоторых дифференциальных тестов изложены ниже. Для проведения ниацинового теста используют чистую культуру, выращенную на среде Левенштейна-Иенсена. Бактериальную массу заливают 1-2 мл дистиллированной воды и пробирки помещают в наклонном положении на 20-30 минут. Затем смешивают 1 мл экстракта, 1 мл 10%-ного раствора BrCN и 1 мл спиртового анилинового раствора. Положительный результат — интенсивное желтое окрашивание в течение 3 минут. Могут быть использованы коммерческие ниациновые тест-бумажки (Difco).

Редукция нитратов. В пробирку помещают несколько капель стерильной дистиллированной воды и петлю молодой культуры микобактерий. В качестве контроля берут пробирку без микобактерий. Добавляют 2 мл раствора NaNO_3 (0,01 М раствор NaNO_3 в 0,022 М фосфатном буфере, рН 7,0). Встряхивают и выдерживают в водяной бане при 37° С в течение 2 часов. Затем добавляют одну каплю разведенной 1:2 концентрированной HCl , две капли 0,2%-ного водного раствора сульфаниловой кислоты, две капли 0,1%-ного водного N — (1-нафтил) этилендиамина дигидрохлорида. Положительный результат — окрашивание от розового до красного цвета.

Таблица 43 - Дифференциация основных патогенных видов микобактерий по культурально-биохимическим свойствам

Свойство	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>
Скорость роста	3-8 недель	3-8 недель	2-6 недель
Тип роста колоний на гли-церинных средах	Эугонический, колонии R-типа	Дисгонический, колонии R-типа	Эугонический, колонии R-типа
Окрашивание пигмента	-	-	-
Водной температурный предел роста	42° С	42° С	44° С
Растет ли в глицерине	+	-	+
Зависимость роста от натрия пирувата (0,4%)	-	+	-
Уреазный тест	+	-	-
Т-ингибция (10 мг/куб.см)	-	+	-
Окраска толуидиновым реактивом	+	+	-
Редукция нитратов	+	-	-
Уреаз	+	+	-
Аминоксидлаза	+	-	+

Тест на уреазу. Смешивают 1 часть агара с мочевиной и 9 частей стерильной воды, 4 кубических см наливают в пробирку. Затем в субстрат вносят петлю молодой культуры микобактерий. Инкубируют при 37° С в течение 3 суток. Положительный результат — окрашивание от розового до фиолетового.

Тесты ингибиции. Проводят в отношении пиромидин гидрата (PMN), гидразида тиофен-2-карбоновой кислоты (TCN). Указанные соединения вносят в среду Левенштейна-Йенсена до финальной концентрации 10 мг/мл. Толуидиновый голубой добавляют в среду Петраньяни в концентрации 0,023%.

Тест на деаминирование пиразинамида. Базовая среда буфер «Dubos», содержащая 0,1 г пиразинамида, 2,0 г пировиноградной кислоты и 15 г агара на 1000 мл. Среду разливают по 15 мл в пробирки, автоклавируют при 121° С в течение 15 минут, охлаждают в вертикальном положении. Агар инокулируют молодой культурой микробактерий и инкубируют при 37° С в течение 4 дней. Затем добавляют 1 мл свежеприготовленного 1%-ного водного раствора сульфата аммония железа и помещают пробирки в холодильник на 4 часа. Положительная реакция — розовая полоска в агаре.

В случае необходимости видовой дифференциации в целом в пределах группы медленнорастущих микробактерий прибегают к более подробному изучению их культуральных и биохимических свойств (табл. 38).

Таблица 44 - Дифференцирующие признаки некоторых медленнорастущих видов *Mycobacterium*

	Примечание									
	Устойчивость к окислению	Устойчивость к кислотам	Устойчивость к холоду	Устойчивость к нагреванию	Устойчивость к высушиванию	Устойчивость к замораживанию	Устойчивость к ультрафиолетовому излучению	Устойчивость к различным факторам		
								Устойчивость к антибиотикам	Устойчивость к дезинфицирующим средствам	Устойчивость к сульфаниламидам
«M. tuberculosis complex»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
«M. bovis complex»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
«M. avium complex»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. tuberculosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. bovis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. avium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. paratuberculosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. tuberculosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. bovis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. avium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. paratuberculosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. tuberculosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. bovis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. avium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. paratuberculosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

д — 89% положительных; (-) — отрицательная реакция

Примечание к таблице 44: «M. bovis complex» включает M. bovis, BCG и M. africanum. «M. terrae complex» включает M. terrae, M. nonchromogenicum и M. triviale. «M. avium complex» включает M. avium и M. abscessus. Новый подвид, не описанный в «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology», M. avium subsp. silvaticum предложен в 1990 г. (Thorel et al.). Те же авторы предложили считать M. paratuberculosis другим подвидом — M. avium subsp. paratuberculosis, но имеющихся данных недостаточно, чтобы можно различать эти подвиды. Вид M. flavescens — быстрорастущий и может быть ошибочно принят за M. avium. M. szulgai может быть фотохромогенным в условиях роста при 25° С.

Биопроба. Используют для выявления возбудителя в исследуемом материале и дифференциации видов микобактерий по спектру патогенности. Биопроба отличается высокой чувствительностью. Заражением морских свинок можно выявить возбудитель при наличии в материале 5-6 клеток микобактерий. Для обнаружения M. tuberculosis и M. bovis используют морских свинок, кролики устойчивы к заражению M. tuberculosis. Для выявления M. avium в опыт берут кур не моложе 150 дней.

Используют кроликов массой 2 кг, морских свинок — 300-350 г. Биопробу на туберкулез производят следующим образом. При заражении животных тканевым материалом последний после обработки и нейтрализации измельчают, выдерживают до осаждения крупных частиц, надосадочную жидкость используют для заражения.

Соотношение материала и жидкости берется с таким расчетом, чтобы на 1 см³ конечной взвеси приходилось около 1 г ткани. Для заражения исследуемой культурой бактериальную массу снимают с поверхности плотной питательной среды и помещают в предварительно взвешенную емкость (банка, пенициллиновый флакончик), на аналитических весах определяют

массу бактерий и, исходя из полученных результатов, добавляют стерильный физиологический раствор в количестве, обеспечивающем содержание 1 мг бактерий в 1 мл. Бактериальная масса должна быть тщательно разведена до получения гомогенной суспензии.

С целью обнаружения микобактерий в исследуемом материале подопытных вводят в дозе 1-2 мл двум морским свинкам подкожно в область курам — в подкрыльцовую вену. Через 30 суток зараженных животных исследуют туберкулиновой пробой. У морских свинок удаляют на боку шерсть и вводят внутрикожно ППД — туберкулин для млекопитающих в дозе 25 ТЕ в объеме 0,1 мл. Курам вводят 0,1 мл ППД туберкулина — для птиц внутрикожно в бородку. У морских свинок реакцию учитывают через 48 часов, у кур через 30-36 ч.

При определении вида микобактерий культурой заражают двух морских свинок подкожно, двух кроликов и двух кур внутривенно в дозе 1 мг/мл. Критерии дифференциации микобактерий по результатам заражения различных животных представлены в таблице 45.

Таблица 45 - Дифференциация микобактерий по результатам заражения различных животных

Вид животного	Вид микобактерий и результат заражения		
	бычий	человеческий	птичий
Морские свинки	Генерализованный туберкулез через 21-90 дней. На месте введения культуры материала образуется язва, регионарный лимфоузел увеличен, кахексия животных. В регионарных лимфатических узлах выявляют казеозные очаги, селезенка и печень увеличены с сероватыми или желтоватыми участками.		Абсцессы на месте введения культуры и увеличение регионарных лимфатических узлов.

Кролики	Генерализованный туберкулез через 21-90 суток с преимущественным поражением легких; в печени и селезенке	Чаще поражения отсутствуют, могут быть единичные очажки в легких, редко в почках	Сепсис. Гибель через 11-30 суток
Куры	Нет заболевания и гибели		Гибель в течение 30, реже 60-90 суток. На вскрытии обнаруживается множество серо-желтых бугорков в печени, селезенке, содержащих микобактерии

По данным ученых более точная дифференциация основных патогенных видов удастся при следующих способах и дозах заражения культуры микобактерий (табл. 46).

Таблица 46 - Дифференциация возбудителей туберкулеза в опыте на животных

Вид животных, доза микобактерий для заражения	Вид микобактерий		
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>
Мясная свинка (0,01 мг подкожно)	++	++	+
Мышь (0,01 мг/внутривенно)	+ ²⁾	++	++
Куры (0,1 мг/внутривенно)	-	-	++

«++» — генерализованный туберкулез; «+» — локальный туберкулез; «-» — отрицательные результаты возможны только при точном соблюдении дозы культуры для заражения.²⁾ «+» — локальный туберкулез.

Обнаружение и идентификация патогенных микобактерий при помощи полимеразной цепной реакции

Трудоемкость изоляции и идентификации патогенных микобактерий заставляет применять принципиально новые методы обнаружения возбудителей, в частности полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Зарубежные и отечественные исследователи испытали ряд диагностических тест-систем для обнаружения ДНК патогенных микобактерий при помощи ПЦР в биогенном материале, а также для идентификации уже выделен-

ных культур микобактерий. Авторы считают, что ПЦР может быть использована для контроля благополучия молодняка крупного рогатого скота по туберкулезу и выявления зараженных животных путем регулярных исследований носовой слизи животных. При исследовании посевной убойного материала ПЦР уступает по эффективности биологическому методу диагностики.

Серологическая диагностика туберкулеза

В качестве дополнительного метода исследования применяют реакцию связывания комплемента (РСК) с туберкулезным антигеном. Серологические исследования проводят согласно наставлению по диагностике туберкулеза у животных, утвержденного ГУВ МСХ СССР. РСК используют для подтверждения результатов положительной аллергической пробы и отбора животных для диагностического убоя.

Питательные среды

Среда Stonebrinks для *M. bovis*. Компоненты. Солевой раствор натрия пируват — 5 г, K_2HPO_4 — 2 г, дистиллированная вода — 300 мл.

Смесь красителей: кристаллвиолет — 100 мг, малахитовый зеленый — 800 мг, дистиллированная вода — 100 мл; 20 свежих куриных яиц.

Приготовление среды: устанавливают pH солевого раствора добавлением раствора Na_2HPO_4 на уровне 6,5. Раствор разливают в емкости по 100 мл. Оба раствора стерилизуют при 121 °С в течение 15 минут. Дрожжи высушивают и помещают на 30 минут в 75%-ный изопропанольный спирт. Подсушивают яйца на воздухе под ультрафиолетовыми лучами, вскрывают, содержимое помещают в емкость с раствором и гомогенизируют. Полученную смесь разливают по 12 мл в пробирки, которые в наклонном положении выдерживают 40-60 минут в водяной бане при 80 °С. Остужают 30 минут и инкубируют при 37 °С 24-48 часов для активирования влаги в среде.

Модифицированная среда Дюбо-Смита. Компоненты: K_2HPO_4 — 4 г, Na_2HPO_4 — 6,25 г, MgSO_4 — 0,01 г, CaCl_2 — 0,0005 г, ZnSO_4 — 0,0001 г, CuSO_4 — 0,0001 г, лимоннокислое аммонийное железо — 0,05 г, витамин B₁₂ — 1 г, гидролизат казеина — 80 мл, спиртовой экстракт *M. tuberculosis* — 20 мл, сыворотка крови крупного рогатого скота — до 20%, пенициллин — 50 ЕД/мл, агарДифко — 15 г, дистиллированная вода — до 1000 мл.

Применяют для культивирования *M. paratuberculosis*.

Среда Петраньяни. В стерильную колбу со стеклянными шариками вносят 250 мл свежего цельного молока, 6 г картофельной муки, 1 г

тона, одну мелко нарезанную картофелину размером с куриное яйцо. Помешивая, выдерживают колбу с содержимым в кипящей водяной бане 10 минут, охлаждают до 60° С и вносят 1 желток и содержимое 4 свежих яиц, 12 мл стерильного глицерина, 6 мл 2%-ного (на дистиллированной воде) раствора малахитового зеленого. Компоненты перемешивают, фильтруют через двойной слой марли, разливают по стерильным пробиркам и свертывают в наклонном положении в аппарате Коха при 85° С 30 минут. Д последующие двое суток прогревают до 70° С по 15 минут. Готовая среда светло-зеленого цвета. Хранят на холоде.

Среда Левенштейна-Иенсена. Готовят солевой раствор следующего состава: в 600 мл дистиллированной воды растворяют первоначально 2,4 г одноосновного фосфата калия, далее последовательно 0,24 г сульфата магния, 3,6 г L-аспаргина, 12 г химически чистого глицерина. Раствор стерилизуют текучим паром 120 минут, добавляют 30 г картофельного крахмала, разливают в колбы по 150 мл и нагревают в кипящей водяной бане до загустения смеси. Затем готовят яичную массу. В литровую термо колбу с бусами асептично вносят содержимое 20-22 куриных яиц (свежих), перемешивают, фильтруют через марлю. К 1000 мл яичной смеси добавляют 300 мл стерильного 2%-ного раствора малахитового зеленого и перемешивают. К 1 л яичной смеси с малахитовым зеленым добавляют 600 мл 2%-ного раствора с крахмалом, выдерживают около 1 часа до исчезновения пузырьков, асептично разливают по 8-10 мл пробирки и в скошенном положении в аппарате Коха прогревают при 80-85° С 40 минут. Далее среду выдерживают в термостате для контроля стерильности. Хранят на холоде. Если среду используют для определения лекарственной устойчивости микроорганизмов, крахмал не добавляют.

Яичная среда Гельберга. Пять свежих куриных яиц моют, обтирают спиртом, слегка обжигают, вскрывают. Асептично извлекают два желтка и помещают их в стерильную колбу с бусами, встряхивают. Добавляют 50 мл 2%-ного раствора, 50 мл молока, 50 мл картофельного отвара, 2,5 мл 10%-ного стерильного раствора лимонной кислоты. Компоненты перемешивают, добавляют 3,5 мл 2%-ного стерильного раствора малахитового зеленого и вновь содержимое колбы тщательно перемешивают. Смесь фильтруют через стерильную марлю и по 4-6 мл разливают в пробирки. Стерилизуют в аппарате Коха при 85° С 60 минут однократно. Готовую питательную среду для контроля стерильности выдерживают 48 часов в термостате. Используют в течение недели после изготовления при хранении на холоде.

Приготовление картофельного отвара. Очищенный и нарезанный картофель заливают двойным количеством воды (вес/вес), кипятят 15 минут,

отстаивают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 110 мл и стерилизуют при 120° С 20 минут.

Приготовление молока. Снятое коровье молоко разливают по 110 мл в колбы, стерилизуют первый день при 105°С 10 минут, второй - 15 минут кучим паром. Раствор малахитового зеленого (2%-ный) стерилизуют при 120° С 20 минут. Кристаллическую лимонную кислоту (10 г) растворяют в 100 мл дистиллированной воды, разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют 20 минут при 120° С.

Приготовление солевого раствора. Берут K_2HPO_4 — 1 г, натрия диоксидносернистого — 1 г, магнeзии серноокислой — 1 г, пептона — 2,6 г, глицерина химически чистого — 30 мл, воды дистиллированной — до 1000 мл. Каждый компонент растворяют в небольшом количестве воды, потом добавляют глицерин и добавляют дистиллированную воду до 1000 мл. Смесь подогревают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы по 110 мл и стерилизуют 20 минут при 105° С.

Картофель Павловского. Белый картофель тщательно моют, нарезают ломом, насухо вытирают, очищают, прокаленным ножом срезают оба конца картофеля. Специальным стерильным буром вырезают из картофеля цилиндр длиной 5-6 см и шириной в соответствии с диаметром пробирки. Цилиндры по диагонали разрезают на 2 клина и опускают последовательно в 5%-ную стерильную глицериновую воду на 1-2 часа.

Далее клинья подсушивают при помощи стерильной фильтровальной бумаги и пинцетом опускают в пробирки Р_у с перетяжкой, содержащей в нижней части 5%-ную стерильную глицериновую воду (рН 7,0-7,2). При этом следует учесть, чтобы нижняя часть картофельного клина касалась жидкой среды. Пробирки стерилизуют при 110° С 10 минут. Сразу после стерилизации пробирки размещают в наклонном положении поверхностью вверх, что позволяет сохранить их влажными. Стерильность контролируют термостатированием.

Среда Петрова. Смешивают 500 г мясного говяжьего фарша с 500 мл 15%-ной глицериновой воды и выдерживают на холоде 24 часа. После употребления фильтруют. Асептически извлекают содержимое в чашку Петри, помещают в мерный цилиндр и перемешивают. Далее готовят 1%-ный раствор генцианвиолета и выдерживают 24 часа в термостате.

Для изготовления сред в одну часть мясного настоя вносят 2 части 1%-ной смеси и 1 мл раствора генцианвиолета на каждые 100 мл среды. Компоненты тщательно перемешивают, разливают по пробиркам и стерилизуют первый день при 85° С, а два последующих дня — при 75° С по 10 минут. Готовую среду контролируют на стерильность, выдерживая в термостате 3-5 дней.

Яично-картофельная среда Виноградова. Вымытый, очищенный и нарезанный мелкими кусочками картофель заливают водой (1:2) и варят при 120° С 1,5 часа. Горячий отвар фильтруют через марлю. В фильтрат вносят 1% пептона, 0,5% натрия хлорида, 5% глицерина. Смесь стерилизуют в автоклаве и используют по мере необходимости. При изготовлении среды к 1 части картофельного отвара добавляют 2 части яичной смеси, перемешивают, разливают по пробиркам, прогревают при 90° С. Затем в каждую пробирку вносят 0,5-1,0 мл МПБ с глицерином или картофельно-го отвара и повторно стерилизуют при 100° С два дня по 45 минут.

Среда Дорсе. Вымытые куриные яйца помещают на 10-15 минут в соду с этиловым спиртом, затем обжигают на пламени горелки, содержащее беситично переносят в колбу с известным весом и доливают 10% (вес/вес) дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают, фильтруют через стерильную марлю, разливают по пробиркам и свертывают в наклонном положении при 70-75° С 60 минут. Контролируют на стерильность, выдерживая в термостате трое суток.

Среда Международной лиги борьбы с туберкулезом. Среда Левентовича-Иисена без крахмала. Пробки в пробирках герметизируют парафином, хранят при 4° С. Среда пригодна для использования в течение года.

Кислотная яичная среда № 1а. В 600 мл дистиллированной воды растворяют 6,3 г KH_2PO_4 , 0,3 г $MgSO_4$, 12 мл глицерина и автоклавируют при 110° С 15 минут. К раствору асептически добавляют 1100 мл полной яичной смеси, 3 мл 1N HCl, 11 мл раствора малахитового зеленого (2%-ный, вес/объем) и 100 000 ЕД натриевой соли пенициллина. Среду разливают по пробиркам, прогревают при 75-78° С 45 минут.

Кислотная яичная среда № 1в. Готовится аналогично среде 1а, но вместо глицерина добавляют 7 г натрия пирувата.

Кровяная среда. Непосредственно перед посевом дистиллированной водой разводят 1:2 стерильную цитратную кровь, разливают по 3 мл в пробирки и вносят раствор пенициллина из расчета 2 ЕД/мл.

Синтетическая среда Вишневского. Берут 3 г аспарагина, 7 г щавелевокислого аммония, 5 г двухосновного фосфорнокислого магния, 0,5 г сернисто-кислого магния, 0,05 г сернисто-кислого железа, 40 мл глицерина и дистиллированной воды до 1000 мл. Подщелачивают до pH 6,8-7,2, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют 30 минут при 120° С.

Среда Данкина. Используют для культивирования *M. paratuberculosis*. На 5%-ном глицериновом бульоне выращивают 10-15 суток культуру *M. paratuberculosis*. Путем фильтрации через бумажный фильтр отделяют бактериальную массу, переносят ее в ступку с 10 мл глицерина и 100 мл печеночного

экстракта Дедляу. Смесь несколько минут кипятят, отстаивают и надосадочную жидкость сливают в мерный сосуд, добавляют содержимое куриных яиц. Перемешивают и вносят 2,5% (объем/объем) 1%-ного водного раствора ген-цианвиолета. Фильтруют через стерильную марлю, разливают по пробиркам и помещают в аппарат для свертывания. Стерилизуют дробно, первый день при 80° С до уплотнения среды и второй подряд по 60 минут при 80° С.

Печеночный экстракт по Дедляу. В 1000 мл воды вносят 400 г измельченной печени, стерилизуют 120 минут текущим паром и фильтруют через марлю. Устанавливают рН — 7,0. Фильтрат разливают по емкостям и стерилизуют при 100° С по 20 минут в течение трех дней.

Среда Ренжара. Используют для культивирования *M. paratuberculosis*. Смешивают 4 части печеночного (рН 7,3) и 8 частей телячьего бульона (рН 7,3), добавляют 3% агар-агара. После растворения агара смесь фильтруют, вносят 5% глицерина и 1 часть глицериновой вытяжки. Среду стерилизуют при 115° С 20 минут. Среду охлаждают до 55° С. Добавляют 1 часть сыворотки крови крупного рогатого скота, прогретой при 60° С, разливают по пробиркам и скашивают.

Приготовление вытяжки из *M. phlei*. Бактериальную массу *M. phlei*, выращенную на глицериновом бульоне, фильтруют через бумажный фильтр, 5 г биомассы растирают с 30 мл 20%-ного раствора глицерина в дистиллированной воде, встряхивают, прогревают при 110° С в течение 1,5 часа. Центрифугированием отделяют жидкую часть, которую используют для приготовления среды.

Приготовление спиртового экстракта из *M. phlei* (микобактерии). Культуру микобактерий Тимофеевой травы выращивают в МПБ (4% глицерина, 10% глицерина, рН 7,2) в течение 3-4 недель, фильтруют через бумажный фильтр. Осадок промывают стерильной дистиллированной водой, прогревают в аппарате Коха при 80° С в течение 30 минут, высушивают в эксикаторе над CaCl₂ или в термостате при 45° С и растирают в порошок. 20 г порошка вносят в 150 мл этанола и трехкратно экстрагируют с перемешиванием в колбе с обратным холодильником. Все порции экстракта объединяют и оставляют на ночь.

Надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр, сливают в колбу, сгущают при пониженном давлении до формирования вязкой желтовато-оранжевой жидкости, которую смешивают с 80 мл 50%-ного водного раствора глицерина на дистиллированной воде. Устанавливают рН 7,4 и прогревают в кипящей водяной бане 10 минут. Затем жидкость помещают в делительную воронку и оставляют на ночь. Экстракт хранят при комнатной температуре.

Лабораторная диагностика паратуберкулеза

Паратуберкулез — хронически протекающая инфекционная болезнь животных, преимущественно крупного рогатого скота и овец, характеризующаяся медленно развивающимся продуктивным энтеритом, периодической диареей и прогрессирующим исхуданием.

Возбудитель — *Mycobacterium paratuberculosis*. Первичный диагноз ставят на основании эпизоотологических, клинических данных. Диагноз обязательно подтверждают результатами патологоанатомического вскрытия убитых с диагностической целью животных, бактериоскопическим и гистологическим исследованием материала. В хозяйствах, неблагополучных по паратуберкулезу крупного скота, больных животных (болезненная форма) выявляют аллергической пробой с туберкулином для птиц и исследованием сыворотки крови в РСК.

Лабораторная диагностика паратуберкулеза основана на результатах бактериологического, серологического и гистологического исследований.

Бактериологическое исследование. Для исследования берут фекалии (шпательками слизи (не менее 10 см³) и полосками крови.

Для посмертного бактериологического и гистологического исследования отбирают 305 различных участков тонкого отдела кишечника и 2-4 регионарных лимфоузлов. При этом отбирают измененные участки кишечника (с утолщениями стенки, с выраженной складчатостью слизистой оболочки), и увеличенные лимфоузлы. Отрезки кишечника и лимфоузлы необходимо помещать в разные банки.

Для бактериологического исследования отобранный материал можно консервировать стерильным 30%-ным водным р-ром глицерина или замораживать. Материалы для гистологического исследований обязательно фиксируют в 10%-ном растворе формалина. Отрезок измененного кишечника промывают кипяченой водой, накладывают на один конец лигатуру, наполняют раствором глицерина, затем завязывают второй конец и помещают в банку с глицерином.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят микропрепараты из слизистой кишечника и лимфатических узлов путем растирания материала между двумя предметными стеклами. Препараты окрашивают по методу Циля-Нильсена. Исследуют 50 и более полей зрения в несколь-

ких препаратах. В окрашенных мазках клетки возбудителя видны как короткие, красного цвета палочковидные бактерии, размером 0,6-2,0 x 0,5 мкм, располагающиеся единично, парами, в виде «палисада». При клиническом течении болезни только приблизительно в 25-30% случаев возможно выявление возбудителя в препаратах фекалий.

Интерпретация факта обнаружения кислотоустойчивых бактерий в материале должна быть достаточно осторожной, т.к. это могут быть и неprofitные микобактерии. Поскольку выделение возбудителя с фекалиями происходит периодически, бактериоскопическое исследование при отрицательном результате необходимо повторять.

Выделение и идентификация культур *M. paratuberculosis*

Культивирование. Обработка исследуемого материала перед исследованием. В качестве исследуемого материала наиболее подходят мезентериальные лимфатические узлы и илеоцекальный клапан, так же исследуют фекалии.

Фекалии (10 см³) растирают в ступке, смешивают 1:10 с 5%-ным раствором щавелевой кислоты, встряхивают во флаконе, ставят на 30 минут на водяную баню (37° С), центрифугируют (2500-3000 об/мин) в течение 15 минут. Осадок отмывают стерильным физиологическим раствором. Материал бактериологической петлей высевают в 5-6 пробирках с питательной средой, содержащей микобактин, а также в среду Левинштейна-Иенсена. Кусочки лимфатических узлов и отдельно соскобы слизистой оболочки подслизистого слоя измельчают ножницами в ступках. Материал из лимфатических узлов заливают 3%-ным раствором H₂SO₄ в соотношении 1:10, слизистой — 6%-ным H₂SO₄ и выдерживают 10-15 минут. Жидкость сливают, материал на 5-10 минут заливают стерильным физиологическим раствором, удаляют жидкость, ткань растирают в небольшом объеме физиологического раствора и высевают на питательную среду, как описано выше.

В США принята следующая схема обработки материала перед исследованием. Лимфатические узлы, илеоцекальный клапан. Ткань лимфатических узлов или мукозу (4 г) заливают 40 мл 0,1% цефирана и встряхивают в течение 30 минут. Взвесь фильтруют через марлю, центрифугируют. Супернатант ресуспенсируют в 40 мл 0,15%-ного цефирана, отстаивают 20 минут, осторожно удаляют супернатант. В каждую пробирку с выбранной питательной средой высевают 0,1 мл седимента. Фекалии. 1 грамм суспендируют в 40 мл дистиллированной воды, встряхивают 30 минут при комнатной температуре, отстаивают 60 минут. Помещают 5 мл супернатанта в 40 мл дистиллированной воды, содержащей 0,3% цефирана. Смесь выдерживают

инот 24-36 часов при комнатной температуре. Супернатант удаляют, осадок высевают на питательные среды.

Посевы инкубируют при 37° С в аэробных условиях до 16 недель. При отсутствии роста просматривают еженедельно.

В питательные среды (Данкина, Ренжара) добавляют ростовой фактор микобактин (0,3 мг/мл), его можно заменить экстрактами из микобактерии других видов, которые вносят в среду в количестве 1-4%. Наибольшее количество ростового фактора содержится в экстрактах из *M. phlei*.

Для ингибиции роста грибов в среды рекомендуется добавлять амфотерицин «В» до конечной концентрации 5 мкг/мл.

Особенности роста *M. paratuberculosis* на питательных средах. На оптимальной питательной среде (яичной) в первичных посевах колонии формируются через 18-100 дней культивирования.

Колонии мелкие, постепенно их размер достигает 2-4 мм, они бесцветные, плоские с неровными краями и ядром в центре. Позднее колонии приобретают бугристый вид. В субкультурах возбудитель растет быстрее (от 3 недель до 2 месяцев). На жидких средах (МПБ с глицерином, синтетические среды) образует на поверхности нежную беловатую пленку, которая через 3-4 месяца утолщается и спускается на дно колбы.

Морфология и тинкториальные свойства *M. paratuberculosis* в культуре. В препаратах из культур, окрашенных по методу Циля-Нильсена, находят мелкие, кислотоустойчивые (красного цвета) палочковидные клетки шириной около 0,5 и длиной 1 мкм.

Ферментативные свойства возбудителя. *M. paratuberculosis* не аккумулирует ниацин, не образует уреазу, синтезирует никотинамидазу, пирролсульфатазу, не образует β-галактозидазу, кислую фосфатазу, пероксидазу, арилсульфатазу, не редуцирует нитраты.

Патогенные свойства *M. paratuberculosis*. У лабораторных животных *M. paratuberculosis*, в отличие от возбудителя туберкулеза, заболевания не вызывает.

Серологическая диагностика

Применяют РСК с метаноловым экстрактом из *M. paratuberculosis* в качестве антигена. Сыворотки крови инактивируют при 61- 62° С в течение 10 минут, исследуют в разведении 1:10. Комплемент берут в дозе на два интервала выше его титра. Время 1-й и 2-й фаз РСК — 20 мин при 37- 40° С в водяной бане. Задержку гемолиза на два и более креста оценивают как положительный, на один крест — сомнительный результат. В противном случае сыворотку исследуют повторно через 15-20 дней.

Исследуют для этих же целей ELISA-тест, РДП.

Из современных методов диагностики применяют ПЦР для обнаружения ДНК возбудителя в фецес.

Лабораторная диагностика листериоза

Листериоз — инфекционная болезнь, протекающая с признаками поражения центральной нервной системы, половых органов (аборт, маститы), молочной железы (маститы), в виде общего лихорадочного заболевания. К листериозу восприимчивы овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики, куры, гуси, утки, индейки, а также человек. В настоящее время листериоз рассматривают как одну из важных пищевых инфекций.

Возбудитель листериоза — *L. monocytogenes*, грамположительная, спорообразующая, палочковидная подвижная бактерия, относящаяся к роду *Listeria*. Аборт у овец может вызывать вид *L. ivanovii*.

Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование. Для исследования направляют при наличии маститов в лабораторию направлять молоко из пораженных долей вымени, в случае абортов — плаценту (котиледоны), истечения из половых органов. Трупы мелких животных посылают целиком, от крупных животных голову (головной мозг), части печени, селезенку, пораженные участки легких. В случае необходимости материал консервируют 30%-ным водным раствором глицерина. Для целей серологической диагностики от больных и подозрительных по заболеванию животных берут пробы крови (сыворотку).

Микроскопическое исследование исходного материала. Для увеличения концентрации клеток целесообразно подращивание при температуре 37° С в течение 5-6 часов. Мазки из исследуемого материала окрашивают по Граму. В препаратах листерий видны как полиморфные, чаще палочковидные, иногда кокковидной формы грамположительные бактерии размером 0,6 x 2 мкм. Капсул и спор не образуют. При наличии соответствующих реагентов проводят выявление и идентификацию листерий методом флуоресцирующих антител или иммунопероксидазным методом. Разработаны тест-системы для обнаружения ДНК возбудителя полимеразной цепной реакцией.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Листерии — факультативные анаэробы, температурный диапазон 4-45° С, оптимум — 30-37° С; оптимальный pH питательных сред 7,2-7,4, диапазон pH 5,6-9,6. С целью выявления способности к образованию жгутиков культивирование необходимо проводить при 20-25° С. Все штаммы листерий растут на средах с 10% NaCl, на агаре Мак-Конки, в присутствии 0,025% ацетата таллия, 0,01 хлорида 2,3, 5-трифенилтетразолия, 0,04% теллурита таллия, но не растут в присутствии шанида калия и 0,02% азида натрия.

Исследуемый материал высевают на МПА, МПБ, печеночный агар и бульон с добавлением 1% глюкозы и 2-3% глицерина, кровяной агар. Из паренхиматозных органов делают обильные множественные посевы или предварительно готовят суспензию на стерильном физиологическом растворе (1:5), которую высевают на среду. У абортированных плодов посевы производят из органов и содержимого желудка. Используя способность листерий к размножению при низких температурах, параллельно с обычными посевами можно сохранять материал при 4° С в холодильнике (в 30%-ном глицерине) в течение 30 дней и при отрицательных первичных посевах через каждые 10 дней из материала делают повторные посевы. Кроме того, используя это же свойство листерий, можно производить посевы из паренхиматозных органов, головного мозга на питательный бульон и посевы инкубировать при 4° С в течение 1-6 месяцев с периодическим их просмотром и высевом на плотные среды. В жидкие питательные среды в этом случае рекомендуется добавлять для подавления роста сопутствующей микрофлоры 15-25 ЕД/мл полимиксина.

Молоко, истечения из половых органов и другой контаминированный материал высевают на селективные среды: среда с теллуритом калия и флоримцином или полимиксином, среды с теллуритом калия, МПБ с 10% натрия хлорида. Кроме того, может быть использована среда с ацетатом таллия и налидиксовой кислотой, среда с налидиксовой кислотой, глюкозатом калия, триафлавином и налидиксовой кислотой. При использовании двух первых сред 1-2 мл исследуемого материала засевают в две колбы со 100-200 мл среды обогащения. Посевы в одном сосуде культивируют при 37° С, в другом при 4° С. Из первой колбы ежедневно, на протяжении 7 суток, отсевают 0,1 мл на плотную среду, инкубируют и исследуют в коспроходящем пучке света характер выросших колоний. Обратец, инкубируемый при 4° С, исследуют аналогичным образом через каждые 7 дней в течение 2 месяцев. При посеве на агар с триафлавином и налидиксовой кислотой инкубирование проводят при 37° С в течение 14-16 часов.

Для исследования контаминированного материала (слизь влагалищная, из матки, фекалии и др.) помещают в пробирки с 5 мл бульона для листерий, из тканей и фекалий готовят в бульоне 10%-ную суспензию. Бульон с материалом хранят при 4° С. В первые четыре недели посевы производят еженедельно, путем внесения 0,2 мл суспензии в пробирку с 5 мл бульона для листерий, содержащего триацетат калия и инкубируют 48 часов при 25° С. Для получения изолированных колоний производят посев бактериологической петлей из верхней части суспензии на селективные плотные среды для листерий.

Рекомендуют высевать контаминированный материал на МПБ с 0,01% таллурита калия и 15 ЕД/мл флоримицина с последующей отливкой культуры на МПА с 0,004% налидиксовой кислоты или первоначально посевы делать на обычный МПБ и затем отливать культуру на МПА с 3,75% роданистого калия или МПА с 0,01% теллурита калия и флоримицина. Посевы инкубируют при 37° С в обычной атмосфере. Просматривают посевы ежедневно в первые 3-4 дня, наблюдая до двух недель. Культивирование посевов при 5-10% CO₂ обеспечивает лучший рост листерий. В последнее применение для изоляции листерий получили Оксфорд-агар и PALCAM-агар.

Следует отметить, что метод холодого обогащения при 4° С и длительности инкубирования посевов неудобен, несмотря на его высокую эффективность и обычно рекомендуется проводить инкубацию первичных посевов в жидкой накопительной среде при 30° С в течение 24 часов с последующим высевом на селективный агар. Жидкая среда обогащения в качестве селективных факторов содержит акрифлавин, налидиксовую кислоту, циклогексимид.

Характер роста *L. monocytogenes* на питательных средах. При росте возбудителя в первые сутки сопровождается легким равномерным помутнением среды. Через 4-7 суток на дне пробирки образуется белый осадок. Диссоциированные культуры могут вызывать образование на поверхности среды пленки, хлопьевидный или крошковидный осадок на дне пробирки.

На плотных средах первичные посевы обязательно просматривают в интервалом в несколько дней в косопроходящем пучке света. Колонии листерий мелкие, росинчатые, круглые, выпуклые, прозрачные, диаметром 0,2-3 мм, с голубоватым оттенком и мелкозернистой структурой (S-форма), в проходящем свете имеют сине-зеленый цвет. На красном (овечьем) агаре образуется узкая зона гемолиза. Могут наблюдаться SR-формы. Колонии R-формы нередко состоят из нитевидных структур. Гемолитическая активность выражена слабо. На Оксфорд-агаре возбудитель

листерий имеют черный цвет и окружены черным ореолом. На PALCAM-агаре колонии серо-зеленые с черным вогнутым центром, черным ореолом на красном фоне агара. На полужидком агаре (0,2%) возбудитель растет вначале по уколу в виде серо-белого хлопьевидного штыря с последующим распространением по всему столбику питательной среды. Смешанные культуры очищают дробным рассевом на плотные питательные среды или путем заражения белых мышей.

Морфология листерий в культуре. Морфологию клеток изучают в препаратах, окрашенных по методу Грама, а также проводят идентификацию выделенной культуры методом флуоресцирующих антител. В молодых культурах преобладают клетки палочковидной формы, в старых могут наблюдаться нитевидные клетки, в выращенных при 37° С — кокковидной формы. В 2-5-дневных культурах часть клеток начинает окрашиваться грамотрицательно.

Идентификация листерий на уровне рода и вида. Виды рода *Listeria* сходны по ряду признаков с бактериями, объединенными в условную, не имеющую таксономического значения, группу «Грамположительные неспорообразующие палочки правильной формы». И на первом этапе исследования нередко приходится дифференцировать листерий от бактерий родов *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Kurthia*, *Caryophanon*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, входящих в данную группу. Для этой цели необходимо после определения морфологии и тинкториальных свойств клеток провести культивирование идентифицируемой культуры в аэробных и анаэробных условиях и определить ее способность выделять каталазу. По типу дыхания и каталазной активности все бактерии данной группы можно разбить на три подгруппы: аэробы — виды родов *Kurthia*, *Caryophanon*, *Renibacterium*; каталазопозитивные факультативные анаэробы или микроаэрофилы — виды родов *Listeria* и *Brochothrix*; каталазонегативные факультативные анаэробы — виды родов *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*. Для дифференциации листерий от лактобацилл дополнительную культуру можно высеять на МРС-среду, на которой в отличие от молочнокислых бактерий листерий не растут или растут очень плохо.

И качестве дополнительных тестов для дифференциации листерий от брохотриксиков рекомендуется посев испытуемой культуры (бульонная, смыв агаровой) в количестве 2-4 капель в индикаторные среды: с лакмусом, нейтральротом в смеси с метиленовым синим, метилротом, консаротом амидочерным. Пробирки после встряхивания инкубируют вместе с незасеянными контрольными пробирками при 37° С. Результат читают через 3, 6, 24 и 48 часов. Листерий через 3-6 часов обесцвечивают среду с нейтральротом и метиленовым синим, лакмусом. Встряхи-

вать пробирки нельзя, так как цвет может частично восстановиться. Если среда с метилротом обесцвечивается через 3-6 часов, но восстановления цвета не наблюдается. Среда с конгоротом и амидочерным обесцвечиваются позднее (6-48 часов), и цвет среды не восстанавливается. Среды с пелотриксами указанные среды не обесцвечивают.

Так же исследуют способность культуры расщеплять салицилин и другие фенолы. Листерий разлагают с образованием кислоты оба субстрата. В дальнейшем дифференциацию родов *Listeria* и *Brochothrix* проводят по наличию жгутиков и способности к росту при 37° С. Для этого выращивают культуру в оптимальной питательной среде при 20-25° С и 37° С. Листерии обладают подвижностью при 20-25° С, но неподвижны при 37° С. Бактерии рода *Brochothrix* не растут при 37° С и не образуют жгутиков при обоих температурных режимах. В косопроходящем пучке света колонии наиболее сходного с листериями вида *B. thormosphacta* отличаются от колоний листерий. Кроме того, *B. thormosphacta* не гидролизует гиппурат и не образует кислоты из многих сахаров, расщепляемых листериями.

В конечном итоге для дальнейшего изучения отбирают культуры бактерий с типичными для листерий культурально-морфологическими и тинкториальными свойствами, являющиеся подвижными при 20-25° С и каталазоположительными.

Важным таксономическим признаком как для родовой, так и для видовой идентификации листерий является обнаружение в ходе исследования культуры патогенных свойств. При видовой идентификации из-за высокого фенотипического сходства между штаммами *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* и *L. welshimori* исследуемые штаммы в первую очередь проверяют на патогенность для мышей и гемолитическую активность.

Критерии дифференциации отдельных видов листерий по ферментативным свойствам и патогенности представлены в таблице 1. У исследуемой культуры необходимо определить гемолитические свойства на кровяной агар, скрытую гемолитическую активность в САМ-тесте со *S. aureus* или *R. equi*, гидролиз гиппурата, восстановление пуртата, образование кислоты из маннита, L-метил-D-маннозида, L-рамнозы, D-ксилозы и патогенность для белых мышей.

Целесообразно использование микротеста системы API (Listeria O-Meritex) и ее аналогов. Рекомендуется для изучения ферментативных свойств делать посев бульонной культуры на среды с глюкозой, маннитом, салицином, трегалазой, дульцитом, инулином, раффозой,

ной. Посевы инкубируют при 37°C в течение 10 суток. Для листерий (*L. monocytogenes*) характерно расщепление с образованием кислоты без газа глюкозы, мальтозы, дульцита, раффинозы, рамнозы.

Идентификация листерий при помощи бактериофагов. Используют два фага (L 2 А и L 4А), позволяющих идентифицировать до 85% штаммов *L. monocytogenes*. Лиофилизированные фаги растворяют в МПБ и используют в течение 5-10 суток при условии хранения в холодильнике (2-6° С). Методика их применения в соответствии с рекомендациями авторов следующая. Испытуемую культуру выращивают 16-18 часов при 37° С, затем засевают в МПБ с глюкозой (0,5%). Доза культуры должна быть такой, чтобы после посева среда опалесцировала. Далее подрашивают 4 часа при 37° С, высевают газоном на 2%-ный подсушенный МПА в чашках Петри, выдерживают в термостате при 37° С в течение 1-1,5 часов (крышка должна быть слегка приоткрытой).

Таблица 47 - Дифференцирующие признаки видов рода *Listeria*

Признаки	<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. murrayi</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. wells-bimeri</i>
Озонитин	-	-	+ ¹⁾	+ ²⁾	-	+	-
СААР-тест (<i>S. aureus</i>)	-	-	-	+	-	+	-
СААР-тест (<i>R. equi</i>)	-	-	+	-	-	-	-
Формовые кислоты из маннита	+	-	-	-	+	-	-
Синтез маннозида		+	-	+		-	+
Ракоины	-		-	+	d	-	D
Секреты	-	-	+	-	-	+	+
Восстановление гипшурата	-	+	+	+	-		
Восстановление нитрата	-	-	-	-	+		
Патогенность для мышей	-	-	+	+	-	-	-

Примечание к таблице 47

1) Знак «+» означает, что признак не исследован. Вид *L. denitrificans* перенесен в отдельный род *Yersinia*.³⁾ Обычно широкая зона или многочисленные зоны. 2) Некоторые штаммы отрицательные.

3) Обозначения: «d» — 11-80% штаммов положительные.

Далее на газон с культурой бактериологической петлей наносят раздельно по одной капле бактериофагов и каплю стерильного бульона (контроль), отмечая карандашом зону каждого фага и контроля. Расстояние между каплями должно быть не менее 1 см. Посевы инкубируют при 22-

23° С в течение 16-24 часов. В положительном случае на месте нанесения фага образуется прозрачная зона лизиса. Допускается наличие единичных колоний или сплошного нежного роста (вторичная культура) при интенсивном росте культуры на остальной площади питательной среды. Достоверности результатов целесообразно проводить 2-3 параллельных исследования. Нелизируемые культуры идентифицируют по общим характеристикам.

Для обнаружения *L. monocytogenes* также рекомендуется реакция растаивания титра фага (РНФ).

Серологическая идентификация листерий. Идентификация листерий в РА. Листерий имеют О- и Н-антигены, которые могут встречаться в различных комбинациях. Известно не менее 16 сероваров *L. monocytogenes*, но большая часть случаев заболеваний связана с сероварами 1/2а, 1/2в. Антигенная структура листерий представлена в таблице.

Распределение серотипов по видам рода *Listeria* следующее: *L. monocytogenes* — 1/2А, 1/2В, 1/2С, 3А, 3В, 3С, 4А, 4АВ, 4С, 4Д, 4Е, 4Ж, 4И, 4К, 4Л, 4М, 4Н, 4О, 4П, 4Р, 4С, 4Т, 4У, 4Ф, 4Х, 4Ц, 4Ч, 4Ш, 4Щ, 4Ъ, 4Ы, 4Ь, 4Э, 4Ю, 4Я, 4«7»; *L. ivanovii*-5; *L. innocua*-4АВ, 6А, 6В; *L. weishimeri*-6А, 6В; *L. seeligeri*-1/2В, 4С, 4Д, 6В. Как видно, *L. monocytogenes* имеет одну или несколько антигенных детерминант, общих с другими видами листерий. В РФ диагностические лаборатории используют листериозные агглютинирующие сыворотки. Поливалентная сыворотка содержит антитела против антигенов Н — АВ и О — II, V, VI, VII, IX и агглютинирует все известные серовары листерий. Типовые сыворотки позволяют идентифицировать листерий 1-го серотипа, которые содержат антигены О и Н, и 2-го серотипа, имеющего О-антигены V и VI. Серологическую идентификацию проводят в РА на стекле.

Идентифицируемую культуру выращивают на МПБ при 37° С в течение 24 часов, затем засевают на две пробирки скошенного МПА, инкубируют при 18-20° С в течение 24-30 часов, смывают стерильным физическим раствором и устанавливают концентрацию приблизительно 15 млрд микробных клеток в 1 мл.

На первом этапе приготовленный антиген исследуют в РА на стекле поливалентной сывороткой, смешивая каплю сыворотки и каплю антигена, сыворотки и физиологического раствора (контроль). Учет проводят в течение трех минут. При наличии спонтанной агглютинации антигена в контроле опыт повторяют с применением в качестве антигена 24 часовую бульонную культуру, выращенной при комнатной температуре. Для дальнейшего исследования берут культуры, давшие положительную реакцию. Идентифицированные культуры листерий.

**Таблица 48 - Антигенная структура *L. monocytogenes*,
L. greyi, *L. murrayi***

СЕРОТИП	СЕРОВАР	ПАТОТИПЫ					ПАТОТИП
		I	II	III	IV	V	
1	1a	I	II	III			A B
	1b	I	II	III			A B
2	2a	I	II	III			B D
3	3a	II	III	IV			A B
	3b	II	III	IV	XI	XII	A B C
	3c	II	III	IV	XI	XII	A B C
4	4a	III	V	VI	VII		A B C
	4ab	III	VII	VI	IX	X	A B C
	4b	III	VII				A B C
	4c	III	V	VII			A B C
	4d	III	VII	VIII			A B C
	4e	III	VII	VIII	IX		A B C
	5	III	VII	VI			A B C
	7	III			XI	XII	A B C
	6a(4f)	III	VII	VII	IX		A B C
	6a(4g)	III	VII	VI	XI	XII	A B C
<i>L. greyi</i>		III			XI	XII	B
<i>L. murrayi</i>		III			XI	XII	B

На втором этапе определяют серогруппу (серотип) культуры при помощи серогрупповых (типовых) сывороток 1-го и 2-го серотипов (серотипов). Исследование проводят, как описано выше. По данным отечественных авторов абсолютное большинство изолированных штаммов листерии относятся к серотипу 1.

Идентификация листерии методом флуоресцирующих антител (МФА). Метод может быть использован как для обнаружения листерии в исследуемом материале, так и для идентификации выделенных культур. Используют флуоресцирующие сыворотки против сероваров 1,4a, 4b. Применяют, в зависимости от наличия флуоресцирующих сывороток, прямой и непрямой методы МФА. Из паренхиматозных органов готовят суспензию на физиологическом растворе 1:5, после осаждения крупных веществ из нее готовят мазки. Мазки из головного мозга, помимо фикса-

ции спиртом, дополнительно обрабатывают ацетоном (2-3 раза по 1 минуте) для удаления жировых компонентов, дающих неспецифическое окрашивание. Культуры листерии исследуют в 18-24-часовом возрасте.

Идентификация листерии также может быть проведена с помощью иммунопероксидазного метода. Антитела из диагностических сывороток в этом случае метят пероксидазой. Мазки готовят из головного мозга, паренхиматозных органов, фиксируют в химически чистом этаноле, в качестве субстрата используют 0,05%-ный раствор 3,3'-диаминобензидаина тетрагидрохлорида (ДАВ).

Имеются сообщения об успешном использовании в диагностике листериоза ПЦР.

Биопроба. Заражение лабораторных животных применяют для обнаружения патогенных листерии в исследуемом материале, а также для определения патогенных свойств выделенных культур. Для обнаружения листерии в материале из паренхиматозных органов или головного мозга готовят суспензию и в дозе 0,3-0,5 мл вводят белым мышам массой 14-16 г (2-3 головы) подкожно или внутрибрюшинно. Внутрибрюшинная инъекция кортизона (5 мг) повышает чувствительность животных. Наблюдение ведут в течение 10 суток. При положительных результатах гибель обычно наступает на 2-6 сутки, в большинстве случаев в паренхиматозных органах находят некротические очажки. Павших животных подвергают полному бактериологическому исследованию. С целью определения патогенных свойств выделенных культур также используют белых мышей, кроликов, морских свинок, куриные эмбрионы.

При титрации на мышах LD_{50} вирулентных штаммов листерии колеблется в пределах 10-1000 м.к. Заражение в желточный мешок 10-дневных куриных эмбрионов культуры в дозе 10 м.к. приводит к их гибели в течение 2-5 дней. Биопроба на кроликах с параллельным контролем количества моноцитов позволяет дать оценку специфичности результата. Количество моноцитов в положительных случаях увеличивается в несколько раз. Кроликов заражают внутривенно в дозе 0,5-1 млрд м.к. Наблюдения — 14 суток. Для дифференциации патогенных культур листерии от возбудителя рожи также проводят копьюктивальную пробу на морских свинках или кроликах (Anton's-тест). На конъюнктиву глаз морской свинки или кролика наносят две капли бульонной культуры. В положительном случае через 24-96 часов развивается гнойный конъюнктивит, *E. rhusiopathiae* такую патологию не вызывает.

Серологическая диагностика. Исследуют животных, подозреваемых в заболевании листериозом, а также животных из групп, где диагностирован листериоз уже установлен. Применяют пробирочную РА, РНГА и РИ

Серологические исследования дополняют другие методы диагностики лихорадки и позволяют обнаружить переболевших, скрытых больных, бактерионосителей. Особенностью отечественной серологической диагностики является то, что серовары с 1/2а по 3с, используемые в международной классификации, объединены в первую серогруппу, а остальные — во вторую.

В РА используют антигены 1-го и 2-го сероваров в соответствии с назначением по их применению. В качестве контрольных применяют соответствующие позитивные (1-й и 2-й серовар) сыворотки. Сыворотки исследуют параллельно с двумя указанными антигенами. РА ставят в объеме 1 мл с сыворотками крови крупного рогатого скота в разведениях 1:160-1:320; коз, овец, свиней — 1:80-1:160; кроликов — 1:20-1:40. РА с контрольной позитивной сывороткой ставят в разведениях до ее предельного титра, с контрольной негативной — в тех же разведениях, что и с исследуемыми сыворотками. Кроме того, ставят контроль каждого антигена с физиологическим раствором. Пробирки выдерживают при 37° С в течение 18-20 часов, затем 2 часа при комнатной температуре и учитывают результат. За положительный результат принимают положительные показания РА у крупного рогатого скота и лошадей в титре 1:320; овец, свиней, коз — 1:160; кроликов — 1:40. Отрицательные сыворотки рекомендуется исследовать дополнительно после обработки 2-меркаптоэтанолом (2-МЭ) или солянокислым цистеином. После такой обработки ставят РА по вышеуказанной схеме и за положительный результат у крупного рогатого скота и лошадей принимают титры 1:40; овец, коз и свиней — 1:20; кроликов — 1:10.

Обработка сывороток 2-МЭ. 2-меркаптоэтанол разводят до титра в соответствии с указанием на этикетке. Сыворотки крови разводят физиологическим раствором: крупного рогатого скота и лошадей — 1:20; овец, коз, свиней — 1:10; кроликов — 1:5. К 1 см разведенной сыворотки добавляют 1-2 капли раствора 2-МЭ, пробирки закрывают резиновыми пробками и выдерживают 60 минут в водяной бане при 37° С. После этого исследуют в РА сыворотки крови крупного рогатого скота и лошадей в разведении 1:40; овец, коз, свиней — 1:20; кроликов — 1:10. Обработка сывороток солянокислым цистеином. Растворяют 35,1 мг цистеина в 1 мл 0,2 М NaOH. Сыворотки крови крупного рогатого скота и лошадей разводят физиологическим раствором 1:10; овец, коз, свиней — 1:5; кроликов — 1:3. К 0,5 мл цистеина, пробирки закрывают резиновыми пробками и выдерживают при 37° С в течение 18-20 часов. Затем исследуют сыворотки крупного рогатого скота и лошадей в разведении 1:40; овец, коз, свиней — 1:20; кроликов — 1:10. Для исследования сывороток крови в РСК ис-

пользуют листериозный антиген для РСК, реакцию ставят в объеме 1:10. Для контроля используют позитивные листериозные сыворотки и инертные исследуемого вида животного. Комплемент в бактериологической системе титруют в присутствии инактивированных сывороток (1:10) исследуемого вида животных, который исследуют. Режим инактивации сыворотки — 30 минут при 56-57° С сыворотки крупного рогатого скота и свиней, лошадей и овец — при 58-59° С, кроликов при — 60° С. Реакцию считают положительной при задержке гемолиза на 3-4 креста, сомнительной — на 2 креста. Сыворотки крови от сомнительно реагирующих животных исследуют повторно через 2-3 недели.

Реакция связывания комплемента. Используют листериозный антиген ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии для исследования сыворотки крови всех видов животных. РСК ставят в объеме 2,5 мл по стереотипной схеме с сыворотками, разведенными 1:10. Для контроля применяют нормальные сыворотки крови от заведомо здоровых животных и позитивные от переболевших листериозом животных. Первую фазу РСК проводят при 37-38° С в течение 20 минут, вторую также при 37-38° С 20 минут. Учет результатов проводят сразу после изъятия проб из водяной бани и окончательно через 14-18 часов выдержки проб при комнатной температуре. За положительный результат принимают задержку гемолиза на три-четыре креста, сомнительный — задержку гемолиза на один-два креста. Сыворотки крови животных, дающие сомнительную РСК, исследуют повторно через 2-3 недели и при повторении задержки гемолиза не менее чем на два креста результат оценивают положительно.

При постановке РНГА используют диагностикум Омского НИИ профилактической патологии и вирусологии риноринитов и респираторно-очаговых болезней.

Питательные среды. Оптимальными питательными средами для культивирования листерий считаются МПА или печеночный агар и МПА с 1% глюкозы и 2-3% глицерина (рН 7,2-7,4), а также кровяной агар. В отсутствие необходимости для первичного выделения листерий используют питательные среды, содержащие вещества, ингибирующие рост сопутствующей микрофлоры.

Среда с теллуридом калия. В 1000 мл расплавленного МПА (рН 7,2-7,4) добавляют 10 мл 2%-ного водно-глицеринового раствора теллурида калия и 50-100 мл стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота. Компоненты перемешивают и среду сливают в чашки Петри. Питательная среда обладает селективными свойствами по отношению к *L. monocytogenes*.

Среда с теллуридом калия, полимиксином, флоримидином. В 1000 мл расплавленного МПА (рН 7,2-7,4) добавляют 10 см 2%-ного водно-глицеринового раствора теллурида калия, 0,3-0,5 мл раствора флоримидина или полимиксина (500 тыс. ЕД препарата разводят в 10 мл физиологического раствора). Листерий восстанавливают теллурид калия до металлического теллура, благодаря чему их колонии приобретают черный цвет. При исследовании растительных субстратов рекомендуется использовать МПА с 0,0035% триафлавина и 0,001% налидиксовой кислоты, а также МПБ с 3,75% калия родонистого и МПБ с 10% натрия хлорида.

Среда с ацетатом калия и налидиксовой кислотой. Питательный бульон (Оксид), содержащий: глюкоза — 0,2%; талия ацетат — 0,2%; налидиксовая кислота — 40 мкг/мл. Кристаллическую налидиксовую кислоту (0,05 г) растворяют в 0,5 мл 1N NaOH, после растворения добавляют 0,5 мл дистиллированной воды, после чего вносят до необходимой концентрации в среду. Стерилизуют при 121° С в течение 15 минут.

Бульон для листерий с KCNS. Пептон — 20 г; глюкоза (декстроза) — 1 г; NaCl — 5 г, Na₂HPO₄ — 2,5 г, дистиллированная вода — 1000 мл, рН — 7,3. Среду стерилизуют при 121° С в течение 15 минут. До стерилизации в среду добавляют 3,74% тиоцианата калия.

Среда с тиоцианатом калия и налидиксовой кислотой. Питательный бульон (Оксид), содержащий калия тиоцианата 3,75%, налидиксовой кислоты — 100 мкг/мл. Среду стерилизуют при 121° С в течение 15 минут. Налидиксовую кислоту добавляют в виде раствора к стерилизованной среде.

Триафлавин-налидиксовый агар. Триптозный агар (Дифко) — 41 г; налидиксовая кислота — 0,04 г; дистиллированная вода — 1000 мл. Кристаллическую налидиксовую кислоту (0,8 г) растворяют в 10 мл 1N NaOH и объем доводят до 100 мл дистиллированной водой; 5 мл раствора налидиксовой кислоты добавляют к среде до концентрации 40 мкг/мл. Стерилизуют после этого этапа среду при 120° С в течение 15 минут, охлаждают до 70° С и добавляют раствор триафлавина до конечной концентрации 10 мкг/мл. Раствор триафлавина (0,5%-ный, водный) готовят предварительно.

Обогащительный бульон. Питательная основа — триптиказо-соевый бульон с дрожжевым экстрактом, селективными факторами являются соевосвязанный акрифлавин — 0,02-0,01 г/л, налидиксовая кислота — 0,05 - 0,01 г/л, циклогексимид — 0,05-0,01 г/л.

Оксфорд-агар. К питательной основе добавляют (г/л) эскулин — 1,0, сульфат железистого аммония — 0,5, хлорид лития — 15,0, циклогексимид

— 0,4, колистин — 0,02, акрифлавин — 0,005, цефотстан — 0,002, фузоцидин — 0,01.

PALCAM-агар. В питательный агар вносят (г/л) эскулин — 0,8; перманганат калия — 0,5; хлорид лития — 15,0; акрифлавин — 0,005; полимиксин В — 0,01; цефтазидим — 0,02; фенилрот — 0,08.

Агар Мак-Брайда для листерий. Пептон — 10 г; мясной экстракт — 3 г; NaCl — 5 г; ангидрид глицина — 10 г; LiCl — 0,5 г; фенилэтанол — 2,5 г; агар — 15 г; дистиллированная вода — 1000 мл; pH — 7,3. Среду стерилизуют 15 минут при 121° С. К охлажденной до 45-50° С среде добавляют 5% крови барана.

Индикаторные среды для идентификации листерий. Посевы инкубируют при 37-38° С, результаты учитывают через 3, 6, 24 и 48 часов.

Среда с лакмусом. В 100 мл бульона Хоттингера или МПБ (pH 7,3) добавляют 1 мл настойки лакмуса, стерилизуют при 110° С 30 минут. Возбудитель листериоза обесцвечивает среду через 3-6 часов. При учете результатов пробирки не встряхивать.

Среда с метиловым красным. В 100 мл бульона Хоттингера или МПБ добавляют 0,3 мл стерильного 0,1%-ного водного раствора метилового красного. Цвет среды лимонно-желтый. В положительных случаях среда обесцвечивается через 3-6 часов. Восстановление исходного цвета среды не отмечается.

Среда с конгротом. В 100 мл бульона Хоттингера или МПБ вносят 1 мл стерильного 0,1%-ного водного раствора конггота. Цвет среды красный. Возбудитель листериоза обесцвечивает среду через 6-48 часов. Восстановления цвета среды нет.

Среда с амидочерным. В 100 мл бульона Хоттингера или МПБ добавляют 0,3 мл стерильного 0,1%-ного водного раствора амидочерного. Цвет среды черный с фиолетовым оттенком. В положительных случаях обесцвечивание среды отмечается через 6-48 часов. Восстановления цвета среды нет.

Среда с нейтральротом и метиленовым синим. В 100 мл бульона Хоттингера или МПБ вносят по 1 мл 0,1%-ных водных стерильных растворов нейтрального ральрота и метиленовой сини. Цвет среды зеленый или зеленовато-голубоватый. При учете результатов (через 3-6 часов) пробирки встряхивать.

Лабораторная диагностика рожи свиней

Рожа свиней — инфекционная болезнь, характеризующаяся при острых течении септицемией и воспалительной эритемой кожи; при хроническом

эндокардитом и артритами. Спорадически может встречаться у лошадей, крупного рогатого скота, овец, северных оленей, собак, диких млекопитающих, птиц, восприимчив человек.

Возбудитель болезни — грамположительная палочковидная бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*, относящаяся к роду *Erysipelothrix*.

Лабораторная диагностика болезни основана на результатах бактериологического серологического исследования.

Бактериологическое исследование. В лабораторию направляют труп животного целиком или сердце (при хроническом течении - обязательно), печень, селезенку, почку, трубчатую кость. При артритах берут синовиальную жидкость. При необходимости материал консервируют 30%-ным стерильным водным раствором глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из материала готовят мазки, окрашивают по Граму, а также люминесцирующими реактивами сыворотками. При хроническом течении обязательно делают мазки с поверхности измененных клапанов сердца. В мазках, окрашенных по Граму, в положительных случаях обнаруживают грамположительные, прямые или слегка изогнутые тонкие палочки размером 0,2-0,3 мкм шириной, 2,5 мкм длиной с закругленными концами, без спор и капсул. Клетки располагаются единично, группами, в виде коротких цепочек, некоторые под углом друг к другу.

В препаратах из пораженных клапанов сердца свиней (хроническое течение) возбудитель имеет нитевидную форму с тенденцией клеток к обесцвечиванию.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Культивирование. Возбудитель болезни — *E. rhusiopathiae* является факультативным анаэробом, в первой генерации ведет себя как микроаэрофил. Температурный оптимум 36-37° С, оптимум pH 7,4-7,8. Культуры в S-форме лучше растут при 33° С и pH 7,6-8,2; R-формы — при 37° С и pH — менее 7. Посев исследуемого материала может быть произведен на МПА, МПБ, оптимальными средами являются кровяной агар, среды с 5-10% сыворотки крови и 0,2-0,5% глюкозы.

Контаминированный материал, особенно при исследовании миндалин на носительство возбудителя, высевают на селективные среды: среда РМН, среда МВА, среды, содержащие 0,1% азида натрия и 0,001% кристалвиолета. Рекомендуется в этом случае делать посев на среду ESB с последующей пересевом на среду МВА. Жидкий материал рекомендует-

ся центрифугировать, а седимент ресуспендировать в среде ESB. Тем временем не является лимитирующим фактором, рекомендуется инкубировать образцы тканей в флаконах с бульоном при 4-5° С в течение 4-7 недель, субкультуры засеять на среду MBA. Этот метод особенно подходит для выделения возбудителя из миндалин и кишечных лимфатических узлов. Прямой посев материала на плотные среды обычно менее эффективен и дает удовлетворительные результаты при использовании плотных селективных сред с кровью или сывороткой крови.

Характер роста возбудителя на питательных средах. На плотных средах возбудитель через 24-48 часов формирует мелкие (0,2-1,5 мкм) круглые, выпуклые, прозрачные колонии с гладкой, блестящей поверхностью и ровными краями (S-форма). R-колонии менее выпуклые, с неровными краями и тусклой поверхностью. Кроме R-колоний могут встречаться промежуточные SR-формы. На кровяном агаре через 24 часа обычно формируются негемолитические колонии, спустя 48 часов может появиться узкая зона α -гемолиза. При посеве в МПДЖ и культивировании в течение 3-5 дней при 22° С возбудитель растет в виде «лампового грибка» без разжижения желатины. Для просмотра посевов на плотных питательных средах лучше пользоваться стереоскопическим микроскопом.

В МПБ рост возбудителя сопровождается очень слабым помутнением среды без пристеночного кольца, пленки. Через 48-72 часа на дне пробирки появляется осадок, поднимающийся при встряхивании в виде комочка. На среде ESB посевам рекомендуется инкубировать не менее 48 часов.

Морфология *E. rhusiopathiae* в культуре. В мазках из колоний S-формы преимущественно находят палочковидные клетки (прямые или слегка изогнутые) размером 0,2-0,4 x 0,5-2,5 мкм, не обладающие подвижностью; из колоний R-формы — клетки типичной морфологии, также цепочки из клеток и нити, которые могут достигать 4-15 мкм. Для выявления жгутиков культуру высевают уколом в полужидкий агар и инкубируют посевам 24 часа при 37° С. При обнаружении в первичных посевах культур с типичными для эризипелотриксос культуральными морфологическими и тинкториальными свойствами их отправляют на дальнейшего изучения.

Ферментативные свойства эризипелотриксос. Род *Erysipelothrix* включает два вида: *E. rhusiopathiae* и *E. tonsillarum*, однако по ферментативным свойствам эти виды неразличимы и могут быть дифференцированы только путем изучения гомологии ДНК. Пока единственным значимым фенотипическим отличием *E. tonsillarum* является принадлежность

всех известных штаммов этого вида к седьмому серовару. Следовательно, идентификация на родовом и видовом уровне представляет собственно видовую идентификацию *E. rhusiopathiae*. Некоторые критерии дифференциации эризипелотрикссов от сходных групп бактерий представлены в разделе «Листерия».

У выделенных культур определяют способность образовывать каталазу, оксидазу, сероводород, уреазу, гидролизовать эскулин, ферментировать углеводы. Для выяснения сахаролитической активности применяют 1%-ную пептонную воду с добавлением 5-10% стерильной сыворотки крови лошади или кролика. Образование сероводорода целесообразно проводить посевом на среду Клиглер с учетом результата через 24 часа, хотя можно использовать и бумажки, пропитанные уксуснокислым свинцом.

Возбудитель не вырабатывает каталазу, оксидазу, уреазу, не гидролизует эскулин, образует сероводород.

E. rhusiopathiae расщепляет с образованием кислоты без газа глюкозу, фруктозу, декстрин, левулезу, галактозу, фруктозу, мальтозу; слабое образование кислоты регистрируется в средах с маннозой, иногда сахарозой. Обычно возбудитель не образует кислоты из сорбита, маннита, инозита, дульцита, рамнозы, сорбозы, глицерина, эритрита, амигдалина, салицина, треталозы, инулина, мелицитозы, раффинозы, гликогена, ксилита, эскулина, целлобиозы. Индол не образует и не редуцирует нитраты. Желатин не разжижает, не утилизирует цитраты, тест Фогес-Проскауера — отрицательный. Негидролизует гиппурат натрия, твин-20, 40, 80. Вирулентные штаммы *E. rhusiopathiae* образуют гиалуронидазу, но обычно этот тест в диагностической практике не используют.

Согласно «Методическим указаниям по лабораторным исследованиям свиней» (1984) во внимание при идентификации возбудителя принимают образование сероводорода, каталазы, расщепление глюкозы, фруктозы, сахарозы, маннита.

Серологическая идентификация эризипелотрикссов. Ранее вид дифференцировали на серотипы от А до О. Штаммы типа А считали ответственными за острое и сверхострое течение эризипелоида; штаммы типа В обычно ассоциируются с хроническим течением эризипелоида. Типы А и В подразделяют на подтипы, причем у здоровых свиней чаще находят С и Н, но могут быть типы А и В; у крупного рогатого скота — С и Д; у рыб — С, Д, Е. Штаммы, не имеющие типового антигена, обычно относятся к типу N. В настоящее время на основании антигенных вариаций соматического (термостабильного) антигена *E. rhusiopathiae* подразделяют на

22 серовара, причем до 80% всех изолятов составляют штаммы сероваров 1 и 2.

В повседневной лабораторной практике проводят видовую серологическую идентификацию *E. rhusiopathiae* в РА на стекле. С указанной целью испытуемую культуру выращивают 24 часа при 37° С на плотной питательной среде. На предметное стекло наносят каплю лечебной противорожистой иммунной сыворотки в разведении 1:50, в ней бактериологической петлей суспендируют выросшую бактериальную массу и учитывают результат. Серологическую идентификацию *E. rhusiopathiae* можно проводить на различных стадиях изучения культуры при помощи прямого метода флуоресцирующих антител с применением рожистых люминисцирующих сывороток.

Биопроба. Используют для выделения культуры возбудителя из исследуемого материала, а также определения вирулентности выделенных культур. В первом случае из паренхиматозных органов готовят суспензию в физиологическом растворе 1:10, которую вводят двум белым мышам массой 16-18 г подкожно в дозе 0,1-0,2 мл. Суточной бульонной культурой мышей заражают аналогичным образом и в той же дозе. Наблюдения за животными осуществляют в течение 5 суток. Гибель в положительных случаях наступает на 2-4 сутки, при заражении слабовирулентными штаммами — в более поздние сроки. Павших животных подвергают бактериологическому исследованию. Кроме того, рекомендуется заражать мышей бульонной культурой возбудителя интраперитонеально в дозе 0,4 мл. Гибель наступает на 1-4 сутки после заражения. Может быть использован для идентификации возбудителя тест пассивной защиты мышей с применением противорожистой лечебно-профилактической иммунной сыворотки. В случае необходимости вирулентность изолятов определяют на свиньях, используя для заражения метод кожной скарификации. С целью дифференциации от листерий культура может быть проверена в кератоконъюнктивальной пробе на морских свинках (см. «Листерии»).

Питательные среды. Для выделения культур лучше всего использовать питательные среды с 5-10% сыворотки крови и 0,2-0,5% глюкозы. При исследовании материала контаминированного посторонней микрофлорой, целесообразно пользоваться селективными средами.

Селективная среда ESB. В 1000 мл стерильного питательного бульона вносят 50 мл сыворотки крови лошади, 400 мг канамицина, 50 мг пеницилина, 25 мг ванкомицина. Среда пригодна для использования в течение 12-14 дней хранения при 4° С.

Селективная среда МВА. В 1000 мл питательного агара добавляют 0,4 г азид натрия. Стерилизуют при 121° С 15 минут и асептически вносят 50 мл сыворотки крови и 20 мл крови лошади.

Лабораторная диагностика лептоспироза

Лептоспироз — инфекционная, природно-очаговая болезнь многих видов животных и птиц, проявляющаяся лихорадкой, гемоглинурией, желтушным окрашиванием и некрозами слизистых оболочек и кожи, атонией желудочно-кишечного тракта, абортами, рождением нежизнеспособного потомства, снижением продуктивности животных. Возбудители лептоспироза представляют собой извитые, подвижные, грамотрицательные бактерии размером 0,1х6-12 мкм, один или оба конца которых имеют форму крючка.

Лептоспиры относятся к порядку *Spirochetales*, семейству *Leptospiraceae*, роду *Leptospira*, который содержит два вида: *L. interrogans* — патогенный вид, *L. biflexa* — свободноживущие лептоспиры. В настоящее время на основании анализа генома в роде *Leptospira* выделяют 12 видов: *L. interrogans*, *L. kirshneri*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. inadoi*, *L. fainei*, *L. borupetersenii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. wolbachii*, *L. alexanderi*, *L. biflexa* и 3 генотипов, обозначаемых цифрами. По антигенной структуре лептоспиры подразделяют на 230 серовариантов, объединенных в 25 серогруппы.

Лабораторная диагностика лептоспироза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование. Для исследования прижизненно берут кровь и мочу. Кровь для бактериологического исследования берут в фазе лептоспиремии, на 1-7-е сутки болезни при наличии лихорадки. Приблизительно 5 мл крови набирают в стерильные пробирки с 0,5 мл 10% раствора натрия цитрата. Для серологических исследований кровь берут не ранее недели после клинических проявлений болезни или через 60 дней после введения вакцины.

Мочу собирают в чистую посуду (пробирки, банки и т.д.) и в кратчайшие сроки подвергают микроскопическому исследованию, при 30-40°С в течение 3 часов, 25-30°С — 4-5 часов, 20-25°С — 6-8 часов, 16-18°С — 10-12 часов (Малахов Ю.А. с соавт., 1985). Эффективнее микроскопически исследовать мочу в первые 20-30 минут после взятия, а также нейтрализовать ее N/10 HCl или N/10 NaOH. Если моча предназна-

на для получения культур возбудителя и должна быть транспортирована. Рекомендуется разводить ее 1:10 1%-ным сывороточным альбумином крупного рогатого скота.

Для посмертной диагностики берут трупы мелких животных, серые кусочки паренхиматозных органов, почку, транссудат из грудной и брюшной полостей. Перикардиальную жидкость, мочевой пузырь с ее содержимым, спинномозговую жидкость. Если наблюдаются аборт, берут абортирванный плод или желудок плода с содержимым и паренхиматозные органы.

Воду из источника для обнаружения лептоспир берут в объеме 1-1,5 л в стерильные колбы с ватно-марлевыми пробками.

Патологический материал должен быть взят и исследован в течение 1 ч. в летнее время и 10-12 ч. при условии хранения его в охлажденном состоянии.

Таблица 49 - Основные возбудители лептоспироза у животных (Bergey, 1984)

Вид животного	Серогруппы лептоспир
Крупный рогатый скот	<i>Canicola, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe, Tarassovi.</i>
Мелкий рогатый скот	<i>Grippytyphosa, Hebdomadis, Pomona, Sejroe, Tarassovi</i>
Лошадь	<i>Canicola, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Pomona, Tarassovi</i>
Свиньи	<i>Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona</i>
Собаки	

Таблица 50 - Лептоспиры, поражающие животных в России

Лептоспиры	Вид животных		
	Свиньи	Крупный рогатый скот	Мелкий рогатый скот
Основные	<i>Pomona, Tarassovi</i>	<i>Hebdomadis, Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa</i>	<i>Grippytyphosa, Pomona, Tarassovi</i>
Редко встречающиеся	<i>Hebdomadis, Canicola, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Canicola, Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Canicola, Icterohaemorrhagiae</i>

Микроскопическое исследование исходного материала. В исследуемом материале лептоспиры обнаруживают в неокрашенном состоянии при помощи темнопольной микроскопии, реже — в окрашенных препаратах.

Темнопольная микроскопия. Для лабораторных исследований применяют сухие системы с увеличением 400-500 раз. Готовят препарат «развешенная капля». Толщина предметных стекол не должна быть больше 1-1,2 мм, покровных — 0,2 мм, в противном случае препарат не оказывается в фокусе конденсора. Стекла должны быть без царапин, чистые, обжигенные. На верхнюю линзу конденсора помещают каплю дистиллированной воды, конденсор поднимают до уровня поверхности предметного столика, чтобы вода контактировала с предметным стеклом. В капле исследуют не менее 50 полей зрения.

При оптимальной настройке микроскопа лептоспиры в препарате видны на темном фоне как спиралеобразные, тонкие серебристо-белые нити с перичными завитками в виде тесно примыкающих друг к другу зерен. Концы лептоспир утолщены и оба или один загнуты, размер клеток 0,1 x 0,25 мкм. В жидкой среде лептоспиры движутся, вращаясь то в одну, то в другую сторону вокруг длинной оси, поступательно перемещаясь загнутым концом вперед. В вязких средах движение может происходить по типу Волнового, винтового и змеевидного. В препаратах из нативного материала часто могут присутствовать клетки, потерявшие способность к движению.

Кусочки паренхиматозных органов растирают в ступке с небольшим количеством физиологического раствора (1:2-3), центрифугируют для осаждения крупных частиц в течение 10 минут при 3000 об/мин или отстаивают 1-2 часа при 4-6°C. Исследованию подвергают надосадочную жидкость. Мочу исследуют сразу после взятия и центрифугирования (10-12 тыс. об/мин, 30 минут).

Нитратную кровь центрифугируют при 2-3 тыс. об/мин в течение 15 минут, отсасывают надосадочную жидкость, повторно центрифугируют ее в течение 30 минут при 10-15 тыс. об/мин, осадок исследуют. При этом необходимо учитывать, что артефактные структуры, напоминающие лептоспиры (нити фибрина, оболочки эритроцитов и др.), неподвижны.

Приготовление и микроскопия окрашенных препаратов лептоспир. Лептоспиры плохо воспринимают красители. Могут быть использованы следующие методы окраски.

Окраска по Романовскому-Гимза. Мазки фиксируют спирт-эфиром (1:1) или метанолом — 3 минуты, окрашивают 8-12 часов красителями

(0,5 мл краски и 10 мл нейтральной дистиллированной воды). Лептоспир в препарате имеют светло-розовый цвет.

Окрашивание риванолом или аурамином по В.С. Киктенко. Используют для окраски препаратов из культур лептоспир. Тонкий мазок фиксируют легким нагреванием, наносят раствор 3%-ной серной кислоты и подогревают мазок в течение 1 минуты, промывают водой. На препарат наносят риванол или аурамин (1:1000), высушивают. Лептоспир приобретает зеленоватый оттенок (риванол) или золотистый (аурамин) цвет.

Импregnация серебром по В. Babudieri. Мазок фиксируют жидкостью Руге в течение 1-2 минут, промывают водой, наливают на препарат раствор танина и прогревают до появления паров, промывают в проточной, затем дистиллированной воде. На несколько секунд на мазок наливают раствор азотнокислого серебра, а затем заменяют раствор на свежий и подогревают до появления коричневой окраски с металлическим оттенком, промывают препарат в проточной воде. При микроскопии лептоспир имеют черный цвет на светло-коричневом фоне.

Жидкость Руге: ледяная уксусная кислота — 1 мл, формалин (40%-ный) — 2 мл, дистиллированная вода — 100 мл.

Раствор танина: танин — 5 г, фенол — 1 г, дистиллированная вода — 100 мл.

Раствор азотнокислого серебра: к 1%-му раствору азотнокислого серебра в дистиллированной воде добавляют по каплям 10%-ный раствор аммиака до исчезновения первоначально выпавшего осадка и прояснения раствора. Раствор хранят в склянке темного стекла.

Импregnация лептоспир серебром в гистологических срезах по Дюдити. Кусочки органов (корковый слой почек, печень) толщиной 0,5-10 мм фиксируют 24-48 часов в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина, затем переносят в 96%-ный этанол на 24 часа, выдерживают 1 часа в дистиллированной воде, трехкратно заменяя ее на свежую.

На следующем этапе материал помещают в 1-3%-ный раствор азотнокислого серебра на дистиллированной воде на 3-6 суток при 37° С. Материал промывают в дистиллированной воде 2-5 минут, переносят на 2 минуты в небольшое количество раствора редуцирующей смеси и затем в основной редуцирующий раствор (пирогалловая кислота — 4 г, формалин чистый — 5 мл, дистиллированная вода — 100 мл) в банке темного стекла, выдерживают в растворе 24-48 часов при комнатной температуре. Редуцирующую смесь берут из расчета 20-25 мл на кусочек ткани. Эффективность экспозиции контролируют приготовлением единичных срезов через каждые 12-16 часов.

При изготовлении срезов материал промывают в дистиллированной воде 1-2 часа. Затем последовательно обрабатывают 96%-ным этанолом 24 часа, новой порцией 96%-ного этанола 24 часа и снова 24 часа свежим спиртом. Далее материал помещают в спирт-метил (спирты этиловый и метилсалициловый поровну) до опускания кусочков на дно сосуда, затем помещают на ночь в метилсалициловый спирт.

Материал переносят в парафиновую кашу (парафин и ксилол поровну) на 30 минут при 57°C, далее в парафин на 60 минут при 57°C и в свежий парафин при 57°C на 60 минут.

Парафин быстро остужают, вырезают блок с кусочком органа и наклеивают на деревянный кубик. На сапном микротоме готовят тонкие срезы, наклеивают на предметное стекло, депарафинируют в трех бюксах с ксилолом по 10-15 минут и заключают под покровное стекло в бальзам. Готовые препараты хранят в темноте.

Микроскопическая картина: лептоспир — черные, ткань — беловато-желтая. После импрегнации серебром лептоспир обычно имеют форму с 1-2 изгибами или змеевидную форму.

Индикацию лептоспир в исследуемом материале можно проводить методом флуоресцирующих антител.

Выделение и идентификация лептоспир. Культивирование. Лептоспир — аэробы, температурный оптимум 28-30°C, рН 7,2 - 7,6, концентрация натрия хлорида в среде — 0,05%, рост на питательных средах замедленный, первичные посевы на жидких питательных средах выдерживают до трех месяцев. Культуры чаще вырастают через 7-20 дней, редко — через 2-3 месяца.

Первичные посевы материала обычно производят на жидкие питательные среды. Для длительного хранения культур могут быть использованы полужидкие среды, с целью исследования физиологии, антигенной структуры — плотные среды.

Кровь высевают в количестве 3-5 капель в 5-7 пробирок с жидкой питательной средой. Посмертно посевы производят из крови сердца, ткани почек (из коркового слоя), печени, у абортированных плодов — также из инертного желудка. Рекомендуются материал, контаминированный посторонней микрофлорой (моча), пропускать через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и засеивать в среды, содержащие 5-флуороурацил в концентрации 200 мкг/мл. Посевы производят пастеровскими пипетками в 3-5 пробирок.

При поддержании лептоспир в лаборатории культуры пересеивают пастеровскими пипетками, причем объем исходной культуры должен состав-

лять приблизительно 0,1 объема свежей среды, так как при малой и средней дозе рост бывает замедленным и скудным. Интервал пересевов культур 10-15 суток.

С целью длительного хранения без лиофилизации культуры лептоспир в пробирках заливают вазелиновым маслом, держат в темноте при комнатной температуре. В таких условиях лептоспиры сохраняют жизнеспособность до трех месяцев.

Характер роста лептоспир на питательных средах. При разведении в жидких питательных средах лептоспиры практически не изменяют внешнего вида среды, поэтому наличие роста устанавливают при посеве исследованной среды из всех засеянных пробирок в препарате «растворенная капля» методом темнопольной микроскопии через каждые 3-5 дней на протяжении трех месяцев.

В полужидких питательных средах рост в виде интенсивно окрашенного кольца обнаруживается невооруженным глазом на расстоянии 3-5 мм ниже поверхности среды. Культуры на полужидких средах используют для длительного хранения.

На плотных питательных средах (с 1% агара, 10% сыворотки крови) лептоспиры образуют колонии S-, O-, R-формы. Колонии патогенных и сапрофитных лептоспир могут быть разнообразными: росинчатые, круглыми диаметром 2-4 мм, кольцевидными, астровидными, с отчетливым центром, неправильной формы. Различают три фазы развития колоний: период поверхностного роста, период внедрения в агар, период глубокого вставания. В конечной фазе могут формироваться крупные колонии 3-4 см в диаметре колонии. Колонии патогенных лептоспир вырастают на 6-20-е сутки, чаще на 7-8-й день, сапрофитные — 3-6-й день. Колонии S-формы — круглые, прозрачные, дисковидные, с тонкой периферической каймой. Колонии R-формы имеют неправильную хлопьевидную конфигурацию.

Для очистки загрязненных культур рекомендуется осуществлять фильтрацию через пластины марки «СФ» с последующим засевом фильтрата в жидких питательных средах.

Также может быть использован дробный рассев на поверхность питательных сред в чашках Петри. Субкультуры из колоний высеивают на жидкие среды.

Свежевыделенные штаммы лептоспир можно сохранять без пересевов в течение года, если получено хорошее накопление, а культура разлита по ампулам, которые запаивают и хранят при 20° С. Культуры в пробирках, под слоем вазелинового масла, в темноте, при комнатной температу-

туре сохраняют жизнеспособность до трех месяцев. Аналогичным образом на среде Терских удобно сохранять лептоспиры до 5-8 недель.

Морфология клеток лептоспир в культуре. Морфология лептоспир в культуре и исходном материале различий не имеет. Препарат из культур (помимо темнопольной микроскопии в живом состоянии) можно, в случае необходимости, окрашивать, хотя лептоспиры слабо воспринимают красители.

В колониях на плотных питательных средах через 10-14 суток культивирования лептоспиры подвижны и хорошо делятся, позднее в центре колонии находят густо переплетенные мертвые лептоспиры, а по периферии — молодые, делящиеся.

Дифференциация патогенных и сапрофитных лептоспир по биологическим свойствам

В практической работе существует задача разграничения патогенных (*L. interrogans*) и сапрофитических (*L. biflexa*) лептоспир. Для этой цели используют следующие критерии (табл. 51).

Таблица 51 - Дифференциация паразитических и сапрофитических видов лептоспир

Признаки	<i>L. interrogans</i>	<i>L. biflexa</i>
Патогенность	+	-
Рост при температуре 13° С	-	+
Ингибция роста 8-азагуанином (15 мкг/мл)	+	-
Изменение клеток в 1М растворе NaCl в округлые формы при 20-30° С	+	-
Выделение липазы	некоторые серовары	+
Содержание Г + Ц в ДНК, моль%	35,3-39,9	38-41

Серологическая идентификация лептоспир. Выделенные штаммы первоначально идентифицируют в реакции микроагглютинации на уровне серологических групп, а далее в пределах установленной серогруппы определяют серовар. Техника постановки реакции микроагглютинации при определении серогрупповой принадлежности лептоспир изложена в соответствии с «Методическими указаниями по применению групповых агглютинирующих лептоспирозных сывороток». Реакцию применяют для контроля диагностических штаммов лептоспир с сыворотками первого набора и выделенных штаммов с сыворотками второго набора. В качестве агглютиногена используют живые 5-10-суточные культуры в жидких питательных средах с накоплением 70-100 лептоспир на поле при увеличении 20х10х1,5.

В России применяют групповые агглютинирующие лептоспиринные сыворотки в виде двух наборов (1-й: серогруппы Гриппотифоза, Помона, Инорогеморрагия, Каникола, Тарассови, Батавия, Гебдомадис, Сейро, Милл, Пирогенес, Лутумпалис, Баллум, Аустралис, Яваника, Циноптери, а также вышеперечисленные сыворотки, а также Целледони, Панама, Андиана, Семаранга, Шермани).

На физиологическом растворе готовят разведения диагностических сыворотки 1:50, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16 000, 1:32 000. В 0,1 мл каждого разведения сыворотки добавляют 0,1 мл исследуемой культуры. Контроль: 0,1 мл физиологического раствора и 0,1 мл культуры лептоспир. Смесь компонентов выдерживают при 30-37°C в течение часа.

Результат учитывают путем темнопольной микроскопии препарата «раздавленная капля». Оценку проводят в крестах: + + + — агглютинированы 100% клеток, + + + — агглютинированы 75% клеток, + — агглютинированы 50% клеток, + — агглютинированы 25% клеток, — агглютинация отсутствует. Исследуемую культуру относят к серогруппе лептоспир, с сывороткой против которой она дает реакцию на два-четыре креста до 50-100% ее титра.

После установления серогрупповой принадлежности штамма проводят аналогичное исследование со штаммами и антисыворотками к ним, представляющими все серотипы данной серогруппы.

Если в РМА не удастся получить четких указаний на принадлежность штамма к определенному серовару, то применяют реакцию перекрестной адсорбции.

Техника иммуно-адсорбционного анализа. Необходимо приготовить иммунную сыворотку на изучаемый штамм. С этой целью проводят иммунизацию кроликов внутривенно изучаемой культурой лептоспир, содержащей 70-100 клеток в поле зрения (x 400) по схеме 1,2 и 2 мл с интервалом в трое суток и 3 мл с интервалом в пять суток. На девятое сутки после заключительной инъекции пробы сыворотки крови исследуют в РМА, титры обычно составляют 1:30 000 и более. Для стандартных условий опыта иммунные сыворотки разводят до получения единицы титра — 1:3000 (в РМА с формализированным антигеном) при интенсивности реакции в этом титре не более чем два креста.

При получении антигенов лептоспир культуры культивируют во флаконах емкостью 100-250 мл со средой Ферворта-Вольфа при 30° С в течение 1-2 суток до накопления 80-150 микробных клеток в поле зрения (x 400). Лептоспир культуры инактивируют формалином (0,5%), осаждают центрифугированием (10 000 об/мин, 20 минут), затем осадок из флаконов объединяют

центрифугируют повторно (10 000 об/мин, 10 минут). К осадку лептоспир, полученному из 100 мл исходной культуры, добавляют 0,1 мл физиологического раствора, суспендируют и добавляют еще 0,8 мл физиологического раствора. В этот объем антигена вносят 0,1 мл антисыворотки со стандартным титром (1:3000). Стаканы со смесью компонентов, во избежание испарения жидкости, закрывают резиновыми пробками и выдерживают при 37°C или при 2-3°C в течение 24 часов. Далее смесь центрифугируют (10 000 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость осторожно (не взмучивать!) отсасывают. Она представляет из себя адсорбированную сыворотку. Эту сыворотку в разведении 1:30 проверяют в РМА с формоингибированной культурой-адсорбентом на наличие остаточных антигенов (антигенов не должно быть!). В случае необходимости адсорбцию повторяют. При отсутствии антигенов к лептоспир-адсорбенту сыворотку исследуют в РМА с гомологичными и гетерологичными антигенами. С указанной целью адсорбированную сыворотку разводят 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000, принимая во внимание, сыворотка в процессе адсорбции уже была разведена 1:10 (0,9 мл антигена + 0,1 антисыворотки). Титр стандартной сыворотки (1:3000) принимают за 100%. Соответственно в процентах выражают каждое разведение этой сыворотки и в виде процентов изображают результаты исследования. Если эталонный штамм полностью (или более чем на 90%) адсорбирует антитела из сыворотки против изучаемого штамма, то изучаемый штамм считают идентичным эталону. Серогруппу или серовар можно установить, используя моноклональные антитела соответствующей специфичности.

Возможна серологическая идентификация лептоспир методом флуоресцирующих антител в исследуемом материале или в культурах на уровне вида.

В нативном материале и в культуре лептоспиры можно идентифицировать на уровне вида, серогруппы и серовара при помощи ПЦР.

Биопроба. Проводят с целью выделения культур лептоспир из исследуемого материала, определения патогенных свойств культуры или ее освобождения ее от посторонней микрофлоры.

Для заражения используют суспензию паренхиматозных органов (почка, печень) от абортированных плодов, сперму, кровь, мочу. Кровь целесообразно брать на стадии лихорадки. Позднее можно исследовать первую порцию утренней мочи. Паренхиматозные органы измельчают в ступке со стерильным физиологическим раствором, после отстаивания используют надосадочную жидкость. Любым материалом лабораторных животных заражают сразу же после его получения.

Заражают кроликов-сосунков (10-20-дневный возраст), молодых свинских свинок (масса не более 200 г), золотистых хомячков (20-30-дневный возраст), сусликов, белых и серых мышей. Крольчатам материал вводят подкожно или внутрибрюшинно в дозе 2-3 мл, хомякам — 0,5-1,0 мл. Морские свинки наиболее чувствительны к лептоспирам *Icterohaemorrhagiae*, несколько меньше — к *Pomona* и малочувствительны к другим лептоспирам.

За животными наблюдают в течение 15 суток, в случае гибели животных подвергают бактериологическому исследованию, при отсутствии гибели часть животных убивают и исследуют через 4-5 суток, остальных — через 14-16 суток. В последнем случае исследуют сыворотку крови, полученную с разведения 1:10 в РМА. Заключение о результатах биопробы делают на основании показаний серологической реакции.

Для проверки патогенных свойств выделенных лептоспир заражают различными дозами (0,1-1,0 мл) 5-7-дневной бульонной культуры внутрибрюшинно крольчат и золотистых хомячков (0,1-1,0 мл). Штаммы, вызывающие гибель животных от дозы 0,1 мл, оценивают как высокопатогентные, 1,0 — слабовирулентные.

Серологическая диагностика. Серологическую диагностику в основном осуществляют при помощи реакций микроагглютинации (РМА), иммуноадсорбции (РИА), ELISA.

Реакция микроагглютинации. В качестве антигенов используют 3-4-дневные живые культуры в жидкой питательной среде с накоплением 100 клеток в поле зрения при увеличении микроскопа 20x10x15, более густые — разводят питательной средой до указанной концентрации. Культуры определенных серогрупп лептоспир диагностическим лабораториям предоставляет Всероссийский научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.

Таблица 52 - Штаммы лептоспир, используемые

для постановки РМА

Серогруппа	Серовар	Рекомендуемые штаммы
Pomona	Pomona	Pomona
Tarassovi	tarassovi	Perepelicin (Mifis Jhson)
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V (Valbuzzi)
Hebdomadis	kahura (borincana, hebdomadis)	Kabura (HS-22, hebdomadis)
Sejroe	polonica (sejroe, wolffi, hardjo)	493 Poland (M-84, 3705, hardjo)
Mini		

Icterohaemorrhagiae	szwajizak	Szwajizak
Canicola	copenhageni (icterohaemorrhagiae)	M-20, Wajinberg (RgA)
Bataviac	canicola	Hond Utrecht IV
Iconica	djatzi (bativiac)	HS-26 (Van Tienon)
Australis	poi (javanica)	Poi (Veldrat Bataviac 46)
Autumnalis	australis (brislava)	Ballico (lez Bratislava)
Odium	autumnalis (rachmat)	Akijami A (Rachmat)
Cynopteri	balum (castellonis)	Mus 127(CaseteUon3)
Pyrodenes	pyrodenes	Salinem
Panama	cynopteri	Vleermuis 3568 (3522C)
Celledoni	panama	CZ-214-K
Shermani	celledoni	Celledoni
Djasiman	shermani	LT-821
Sarmin	djasiman	Djasiman
Louisiana	sarmin	Sarmin
Ranarum	louisiana	LSU-1945
Manhoa	ranarum	ISF
	manhoa	L105

Культуры лептоспир, используемые в качестве антигенов при определении этиологической структуры и обследовании импортируемого скота приведены в таблице 52. В хозяйствах с установленной этиологией и при транспортировке животных в пределах страны используют культуры серотипов *Pomona*, *Tarassovi*, *Canicola*, *Hebdomadis*, *Sejoroe*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*.

Смородки крови исследуют в разведениях 1:100, 1:500, 1:2500 с учетом объема антигена, при необходимости определяют предельный титр. Разведенную сыворотку на 0,85%-ном растворе натрия хлорида разливают по 0,1 мл в различное количество лунок планшеты в зависимости от объема используемых антигенов. Затем в лунки вносят по 0,1 мл антигена. Контролем является культура лептоспир + физиологический раствор (агглютинации не должно быть). Компоненты перемешивают встряхиванием, выдерживают час при 30-37°C, затем учитывают результат путем микроскопии препарата из содержимого каждой лунки при увеличении $\times 100$. Клинки не покрывают покровным стеклом и наносят на предметное стекло бактериологической петлей диаметром 3 мм.

Результат оценивают по следующим критериям: (++++) — агглютинированы 100% лептоспир; (+++) — агглютинированы 75% лептоспир; (++) — агглютинированы 50% лептоспир; (+) — агглютинированы 25% лептоспир; (—) — агглютинация отсутствует. Агглютинация проявляется

в образовании конгломератов из 3-5 до нескольких десятков лейкоцитов при возможном лизисе клеток в малых разведениях сыворотки. Как положительный результат оценивают агглютинацию минимум на 2 креста.

Животных с титром РМА 1:50 у невакцинированных, 1:100 и выше у вакцинированных оценивают как зараженных или возможных лейкоцитарных носителей. Если в РМА при однократном исследовании реагирует по крайней мере более чем 20% обследованных животных, то хозяйство признают неблагополучным по лептоспирозу. Положительные реакции с антигенами *Autumnalis*, *Cynopteri*, *Bataviae*, *Pyrogenes*, *Australis* рассматривают как серогрупповые, поскольку лептоспиры указанных серогрупп обычно у сельскохозяйственных животных не обнаруживаются. Их признают возбудителями только в случае выделения чистой культуры или положительной РМА.

Возбудителями лептоспироза признаются лептоспиры серогрупп, для которой антитела выявлены в большем титре. При положительной РМА лептоспирами необычных серогрупп проводят повторное исследование животных через 10-12 суток в РМА.

В США титр РМА 1:100 рассматривают как основание для подозрения в заболевании животного, 1:200 и более — как положительный результат, 1:800 и более — как показатель активной инфекции.

При получении равных титров сыворотки с лептоспирами нескольких серогрупп или высоких титров к лептоспирам, ранее неизвестным возбудителям у с/х животных, для выяснения их этиологической роли прибегают к иммуноадсорбционному анализу. Техника иммуноадсорбционного анализа изложена ранее применительно к серологической идентификации выделенных культур лептоспир. В качестве адсорбента применяют 5-7-суточные культуры, выращенные в жидкой питательной среде, инактивированные 0,3%-ным формалином в течение 10 часов, осажденные центрифугированием в течение 30 минут при 1000 об/мин. Осадок ресуспендируют в 0,9 мл физиологического раствора, смешивают с 0,1 мл исследуемой сыворотки, выдерживают 48 часов при 1-5°C, центрифугируют, надосадочную жидкость (адсорбированную сыворотку) исследуют на наличие антител к штамму-сорбенту, а далее следуют со всеми штаммами в РМА, с которыми сыворотка реагирует до адсорбции. Антитела к возбудителю из сыворотки при абсорбции с терологичными лептоспирами не удаляются.

Питательные среды для культивирования лептоспир. Фосфатные буферные растворы. Маточные растворы: а). KH_2PO_4 — 9,078 г растворяют в 1000 мл дистиллированной воды; б). $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 11,89

растворяют в 1000 мл дистиллированной воды. Растворы хранят при 2 - 4°C до 30 суток. Рабочий буферный раствор готовят следующим образом: 79 мл раствора Б смешивают с 21 мл раствора А и 900 мл дистиллированной воды. Контролируют рН буфера и в случае необходимости подкисляют однозамещенным фосфорнокислым калием или подщелачивают двузамещенным фосфорнокислым натрием до рН 7,2 - 7,4. Готовый раствор стерилизуют при 120°C в течение 30 минут.

Водно-сывороточная среда. Разлитый во флаконы фосфатный буферный раствор (рН 7,2 - 7,4) автоклавируют при 115°C 30 минут. К охлажденному буферному раствору добавляют 5 - 10% инактивированной при 56 - 58°C в течение 1 часа сыворотки крови кролика или барана, фильтруют через фильтр Зейтца и разливают в пробирки. Для проверки на стерильность среду выдерживают при 37° С в течение 3 - 5 суток.

Среда Ферворта в модификации W. Wolff. 1). Растворяют 1 г пептона в 1 л дистиллированной воды и кипятят. 2). Добавляют 200 мл раствора Рингера и вновь кипятят. 3). Добавляют 100 мл фосфатного буфера рН 7,2 и кипятят. 4). Добавляют N-раствор фосфорной кислоты (2 мл). 5). После пятиминутного кипячения смеси и охлаждения ее фильтруют через бумажный фильтр и вновь кипятят 30 минут. 6). Разливают в пробирки по 3 мл, прогревают пробирки 30 минут при 100°C. 7). Добавляют в каждую пробирку по 0,3 мл кроличьей сыворотки, содержащей небольшую примесь гемоглобина (гемолизированных эритроцитов). 8). Инактивируют 30 минут при 56°C в водяной бане. 9). Проверяют стерильность: выдерживают среду в термостате при 37° С в течение 24 часов.

Полужидкая среда Флетчера. К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 2 г агара и кипятят 10 минут. Затем разливают по 5 мл в пробирки и автоклавируют при 0,8 атм 30 минут. После охлаждения в каждую пробирку вносят по 0,5 мл стерильной сыворотки крови кролика или барана, инактивируют при 56-58° С 30 минут. Проверяют на стерильность в течение 3 - 5 суток при 37°C.

Среда Кортхофа. Бидистиллированной воды — 500 мл, пептона Витте — 400 мг, натрия Хлорида — 700 мг, NaHCO_3 — 10 мг, калия хлорида — 30 мг, кальция хлорида — 20 мг, KH_2PO_4 — 90 мг, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 480 мг. Раствор прогревают 20 минут при 100°C, фильтруют через бумажный фильтр, прогревают в течение 30 минут при 100°C. После охлаждения добавляют 8% свежей кроличьей сыворотки. Разливают в пробирки по 8 мл. Приращивают в водяной бане при 56° С в течение 1 часа.

Среда Стюарта. D-аспарагина (M/10) — 2 мл, H_4Cl (M/10) — 10 мл, MgCl_2 (M/10) — 4 мл, NaCl (M/10) — 66 мл; глицерина — 1 мл, водного

раствора фенола красного (0,02%) — 10 мл, дистиллированной воды — 91 мл. Смесь кипятят 30 минут, добавляют 16 мл фосфатного буфера (рН 7,6) и вновь прогревают при 100°C в течение 1 часа. Охлаждают и разливают 5-10% стерильной кроличьей сыворотки. Разливают асептически в пробирки по 4-5 мл в каждую и прогревают в водяной бане при 60°C в течение 1 часа.

Цветная питательная среда для определения ферментации углеводов по А.С. Самедову. К 100 мл дистиллированной воды добавляют 10 мг 10% экстракта пекарских дрожжей и раствор стерилизуют в течение 20 минут в автоклаве. Затем к этой смеси добавляют 250 г одного из углеводов и устанавливают рН 7,0-7,2. После этого добавляют 1 мл раствора Андрее. Готовую среду разливают в стерильные бактериологические пробирки по 3-5 мл и вторично стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 минут. Перед посевом лептоспир в эту среду добавляют инактивированную кроличью сыворотку из расчета 5% к объему среды (рН среды 7,4). Посевы заливают вазелиновым маслом. В случае ферментации углеводов среда окрашивается в светло-малиновый цвет.

Плотная среда Кокс. В 90 мл дистиллированной воды растворяют 1 г агара Дифко, 0,2 г триптозофосфатного бульона Дифко, автоклавировать, охлаждают до 50°C, добавляют 10 мл стерильной сыворотки крови человека и 1 мл 5-10%-ного раствора гемоглобина. Раствор гемоглобина готовят путем лизиса одного объема эритроцитов в 20 объемах дистиллированной воды и фильтрования через фильтр Зейтца. В среде устанавливают рН 7,5; прогревают в водяной бане при 56°C 30 минут, разливают в чашки Петри.

Среда Канарейкиной С.К. и Черкулан П. В 90 мл дистиллированной воды растворяют 50 мл натрия хлорида, 1 г агара Дифко, 1 г триптического перевара Хоттингера. Смесь кипятят 3-5 минут, добавляют 10 мл фосфатной смеси (см. выше), вновь кипятят, устанавливают рН, автоклавируют при 120°C в течение 15 минут. Далее смесь охлаждают до 50°C, добавляют 10 мл инактивированной кроличьей сыворотки и 1 мл гемоглобина (см. выше).

Среда Еллингаузена и Куллода. Раствор «а»: H_4Cl — 1,1 г, $\text{MgCl}_6\text{KH}_2\text{O}$ — 3,72 г, NaCl — 38,50 г, дистиллированная вода — 1 л. Раствор «б»: Na_2HPO_4 — 16,6 г, KH_2PO_4 — 2,172 г, дистиллированная вода — 1 л. К 700 мл дистиллированной воды добавляют 50 мл раствора «а» и 200 мл раствора «б». Затем добавляют L-цистин — 180 мг, ZnSO_4 — 2,2 г, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 2,4 мг, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 40 мг. Смесь встряхивают и фильтруют. Вносят витамин B_{12} — 160 гамм и тиамин-НСI — 160 гамм. Добавляют дистиллированной воды до окончательного объема среды.

а) Затем раствор стерилизуют при 121°C 15 минут. После охлаждения добавляют 20%-ный олеино-альбуминовый комплекс (ОАС) — 1% к объему среды. Он может быть заменен V фракцией бычьего альбумина (1%) и твином-80 (0,1%).

Среда Бабича М.А., Дигальцева Ю.М. и Фоменко А.С.

А. Основа среды (95-97% общего объема среды) — $1/50$ М фосфатный буфер, который автоклавирован при 127°C в течение 1,5 часов.

Б. Альбуминовая фракция сыворотки крови овец. Готовится методом выщелачивания; диализированный раствор альбумина фильтруют через пластыни «СФ» и добавляют к основе среды 150-250 мг% (в пересчете на сухое вещество).

В. Фактор роста — состоит из нативного экстракта печени овец с включением витаминов, микроэлементов и биоактиваторов. В процессе изготовления нативного экстракта печени к нему добавляют: хлористого магния — 25 мг/л; молибденового натрия — 1 мг/л, хлористого цинка — 1 мг/л, карбамида — 10 мг/л, никотиновой кислоты — 2 мг/л, калиевой соли щелочилоуксусной кислоты — 2 мг/л, тиамина — 20 мг/л, рибофлавина — 0,1 мг/л, кобаламина — 0,02 мг/л. Этот фактор добавляют к основе среды в количестве 0,5-1%.

Твин-альбумин сывороточная среда Эллиса. В 998 мл дистиллированной воды растворяют Na_2HPO_4 — 1 г, KH_2PO_4 — 0,3 г, NH_4Cl — 1 мл, глицерин — 1 мл; растворяют компоненты, устанавливают рН 7,4, удаляют 140 мл среды, вносят 1,5 г очищенного агара, стерилизуют (121° С, 30 мин), охлаждают до 50° С, добавляют 140 мл основной среды, фильтруют через мембранные фильтры с размером пор 0,22 микрон и разливают по пробиркам. Приготовление растворов компонентов среды: в 100 мл стерильной дистиллированной воды растворяют отдельно $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,4 г, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 1,0 г, глицерина — 10,0 мл, NH_4Cl — 25 г, витамин В₂ — 0,02 г, тиамин — 0,5 г, MgSO_4 — 0,3 г. Растворы до использования можно хранить до 30 суток при 4—5° С. Ex tempore готовят следующие растворы компонентов. В дистиллированной воде разводят $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г/100 мл H_2O , твин-80 — 20 мл/180 мл H_2O , твин-40 — 30 мл/180 мл H_2O , 5-флюорацил — 1,0 г/100 мл H_2O , налидиксовая кислота — 1,0 г/100 мл H_2O , $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,016 г/100 мл H_2O .

Приготовление основной среды: в 50 мл стерильной дистиллированной воды растворяют 10,0 г бычьего альбумина, 1,0 г лактальбумина-натрионата, затем вносят растворы тиамина — 1 мл, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 1 мл, MgSO_4 — 1 мл, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1 мл, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 1 мл, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1 мл, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 10 мл, витамина В₁₂ — 1 мл, твина-80 —

9 мл, твина-40 — 3-5 мл. После растворения компонентов устанавливают рН 7,4, вносят дистиллированную воду до 96 мл и 4 мл кровяной сыворотки, инактивированной при 56° С (30 минут), флюорантин 20 мл, налидиксовой кислоты — 20 мл.

Среда с 5-флюороацилом. В питательную среду (жидкую, полужидкую, плотную) вносят 100 - 400 мкг/мл 5-флюороацила.

Лабораторная диагностика клостридиозов

В род *Clostridium* относят палочковидные микроорганизмы (0,2x1,5-20,0), плеоморфные, в молодых культурах окрашиваются по методу Грама положительно, подвижные, образуют овальные или сферические споры, каталазоотрицательные, облигатные анаэробы.

Патогенные клостридии подразделяют на нейротоксигенные (*C. botulinum*, *C. teteni*), гистотоксигенные (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. colinum*) и энтеротоксемические (*C. perfringens*).

Таблица 53 — Патогенные клостридии

Вид клостридий	Вызываемая патология
<i>C. perfringens</i> тип А	Пищевые отравления у человека и животных; газовый отек человека и животных; некротизирующий мастит КРС; энтерит собак, некротизирующий энтерит кур.
<i>C. perfringens</i> тип В	Дизентерия ягнят, жеребят; энтеротоксемия молодых различных видов животных.
<i>C. perfringens</i> тип С	Геморрагическая энтеротоксемия овец, поросят. Теленосы, жеребят; некротический энтерит цыплят.
<i>C. perfringens</i> тип Д	Энтеротоксемия овец («мягкая почка»), коз, телят.
<i>C. perfringens</i> тип Е	Энтеротоксемия овец и телят.
<i>C. chauvoei</i>	Эмфизематозный карбункул КРС, реже буйволов, овец и коз.
<i>C. septicum</i>	Злокачественный отек КРС, овец, свиней; браздот овец.
<i>C. novyi</i> тип А	Злокачественный отек КРС, овец.
<i>C. novyi</i> тип В	Некротический гепатит овец.
<i>C. novyi</i> тип С	Хронический остоменилит буйволов.
<i>C. novyi</i> тип D (<i>C. haemolyticum</i>)	Бациллярная гемоглобинурия КРС.
<i>C. sordellii</i>	Газовая гангрена КРС, овец, лошадей.

<i>C. colinum</i>	Язвенный энтерит молодняка птицы (цыплята, индюшата)
<i>C. teteni</i>	Столбняк животных, человека
<i>C. botulinum</i> (типы А-F)	Ботулизм животных, человека
<i>C. botulinum</i> тип G	Ботулизм человека.
<i>C. argentinense</i>)	

Лабораторная диагностика инфекционной энтеротоксемии животных

Энтеротоксемия - остропротекающая инфекционная болезнь овец, телят, поросят, пушных зверей, птицы, характеризующаяся тяжелой интоксикацией. Возбудитель - *C. perfringens*, продуцирующий токсины типов В, С, D реже А и Е.

Лабораторная диагностика основана на обнаружении токсина в содержимом кишечника, выделении культуры возбудителя и определении токсигенных свойств.

Бактериологическое исследование

Для исследования в лабораторию направляют труп животного целиком или наиболее пораженные отрезки тонкого отдела кишечника (с содержимым), перевязанные с обоих концов, а также часть печени, селезенку и почку, экссудат брюшной полости, отечной подкожной клетчатки, трубчатую кость, мезентериальные лимфоузлы. Патматериал берут не позже 3-4 часов после гибели животного. От больного животного для исследования направляют фекалии (150-200г).

Микроскопическое исследование исходного материала. Из мукозы кишечника, органов готовят мазки, окрашивают по Граму. При микроскопии в положительных случаях находят крупные, короткие (0,6- 0,8х 1,2-1 мкм) со слегка закругленными концами, грамположительные, палочковидные клетки, имеющие капсулу. Необходимо принимать во внимание наличие *C. perfringens* в кишечнике клинически здоровых животных.

Обнаружение токсина в исследуемом материале. Объектом исследования является содержимое тонкого отдела кишечника. Результат исследования зависит от времени исследования после смерти животного, так как токсины возбудителя лабильны. В идеале исследование должно быть начато в пределах 30 минут после взятия материала и, во всяком случае, не позднее 3-4 часов. Токсические субстанции *C. perfringens* пред-

ставлены в таблице 85. Содержимое кишечника суспендируют в равном объеме стерильного физиологического раствора, встряхивают, центрифугируют для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость можно обрабатывать пенициллином и стрептомицином для подавления микрофлоры. Надосадочную жидкость целесообразно стерилизовать фильтрацией через мембранные фильтры. Наличие муцина затрудняет фильтрацию. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии животных и анаэробной бактерии ягнят» (1984) содержимое кишечника после разведения физиологическим раствором рекомендуется выщерживать при 20-22° С 1 час, фильтровать через ватно-марлевый фильтр и центрифугировать при 3000 об/мин в течение 20 минут.

Обнаружение токсинов. Фильтрат в объеме 0,4 мл вводят внутривенно двум мышам. У мышей в положительном случае в течение 10-15 минут возможно развитие шока, летальный исход в течение 10 часов. Согласно «Методическим указаниям...» в лабораториях РФ наличие токсина рекомендуется выявлять введением 0,5 мл фильтрата внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам массой 16-18г или 1,0-1,5 мл мышлику массой 1,8-2,0 кг с наблюдением за животными в течение 12 часов. При более поздней гибели, особенно если материал не подвергался стерилизации, необходимо бактериологически исследовать трупы животных, чтобы исключить сопутствующую инфекцию. Экспресс-индикация токсинов в фекалиях проводят в ИФА РНГА, латекс-агглютинацию, но чаще используют РН.

Токсические субстанции (α , β , ϵ , i) *C. perfringens* различных типов (A, B, C, D, E)

Тип <i>C. perfringens</i>	A	B	C	D	E
Наличие токсина	α	α, β, ϵ	α, β	α, ϵ	α, i

- α -токсин (альфа-токсин) - лецитиназа (фосфолипаза), разрушает мембрану клеток, вызывая на кровяном агаре зону неполного гемолиза
- (β -токсин (бета-токсин) - обладает летальным и некротизирующим действием, легко разрушается
- ϵ -токсин (эпсилон-токсин) - выделяется как протоксин, активизируется в кишечнике под влиянием протса
- i -токсин (йота-токсин) - выделяется как протоксин, активизируется трипсином, обладает летальным и некротизирующим действием

Идентификация токсинов *S. perfringens*. После обнаружения токсина его идентифицируют в реакции нейтрализации во внутрикожном тесте на морских свинках альбиносах или внутривенном (внутрибрюшинном) на белых мышах. Тест на мышах считается менее информативным, так как его результаты более подвержены неспецифическим воздействиям.

Внутрикожный тест на морских свинках. Смешивают 0,5 мл токсического материала с 0,2 мл питательного бульона и 0,1 мл анитоксической сыворотки. Общий объем должен составлять 0,8 мл. Если смешивают более чем одну сыворотку, то уменьшают количество бульона при сохранении общего объема смеси 0,8 мл. Аналогичные смеси готовят и трипсинизированным фильтратом: в фильтрат добавляют 1% трипсина (Дифко 1:250) и выдерживают один час при 37° С. Трипсин активирует энтерон-прото-ксин и разрушает бета-токсин. Смесь инъецируют внутрикожно морским свинкам в объеме 0,2 мл. Реакцию учитывают через 24 и 48 часов (табл. 47).

Тест нейтрализации на мышах. Смеси готовят так же, как для теста на морских свинках, и инъецируют двум мышам. Результат учитывают в течение трех дней. О наличии или отсутствии токсина судят по смерти или инвалидизации животных. При наличии токсина в достаточном количестве смерть, обычно наступает в течение 10 часов. Схема постановки реакции нейтрализации представлена в таблице 54.

Таблица 54 - Схема постановки реакции нейтрализации на морских свинках

Смеси фильтрата и анитоксических сывороток		Тип токсина				
		А	В	С	Д	Е
Бульон	Бульон	+	+	+	±	+
Фильтрат	Сыворотка типа А (анти-альфа)	-	+	+	(-)*±	±
	Сыворотка типа А + С (антиальфа и анти-бета)	+	(-)*±	-	(-)*±	±

Трипсинизи- рованный фильтрат	Сыворотка типа A + C + D (анти-альфа, анти-бета, анти-эпсилон)	-	-	-	+
	Бульон	±	+	(-)±	+
	Сыворотки типа A (анти-альфа)	-	+	(+)±	+
	Сыворотки типа A + D (анти-альфа, анти-эпсилон)	-	(-)±	(-)±	-
	Сыворотки типа A + C + D (анти-альфа, анти-бета, анти-эпсилон).	-	-	-	-
	Сыворотка типа A + E (анти-альфа, анти-йота). Обычно не ставят из-за редкого присутствия йота-токсина	-	+	(-)±	+
Идентифицируемый токсин		α	$\beta+$	β	δ

(-) * — почти всегда отрицательная, так как эпсилон-токсин находится в форме протоксина, почти всегда отрицательная, так как бета-токсин разрушается трипсином.

Таблица 55 - Схема теста нейтрализации на мышцах и интерпретация его результатов

Испытуемая жидкость (мл)	Типовая антисыворотка (мл)	Объем смеси, вводимый мышам (мл)	Количество мышей
0,9	0,3 A	0,4	2
0,9	0,3 B	0,4	2
0,9	0,3 C	0,4	2
0,9	0,3 D	0,4	2
0,9	0,3 E	0,4	2
0,9	Нет	0,4	2

Интерпретация результатов, полученных в течение трех дней:

1. Антитоксин A нейтрализует только гемологический токсин.
2. Антитоксин B нейтрализует токсины A, B, C и D.
3. Антитоксин C нейтрализует токсины A и C.
4. Антитоксин D нейтрализует токсины A и D.
5. Антитоксин E нейтрализует токсины A и E. Эти данные представлены в таблице 56.

Таблица 56 - Идентификация токсинов *C. perfringens* в реакции нейтрализации

Антитоксическая сыворотка	Тип токсина				
	A (альфа)	B (альфа, бета, эпсилон)	C (альфа, бета)	D (альфа, эпсилон)	E (альфа, йота)
A антиальфа	-	+	+	+	+
B антиальфа, -бета, -эпсилон	-	-	-	-	+

Антиальфа, -бета	-	+	-	+	+
Антиальфа, -эпсилон	-	+	+	-	+
Антиальфа, -йота	-	+	+	-	-

Гибель: - гибель отсутствует

В соответствии с «Методическими указаниями...» в лабораториях РФ реакцию нейтрализации рекомендуется проводить путем смешивания в отдельных пробирках 1 мл антитоксических сывороток (А, С, D, E), содержащих в 1 мл 10АЕ и 1 мл фильтрата. В пятой пробирке смешивают фильтрат и физиологический раствор. Компоненты инкубируют 30 минут при 37° С и по 0,5 мл смеси вводят двум белым мышам внутривенно (внутрибрюшинно) или морским свинкам (кроликам) по 0,2 мл внутривенно. Результат учитывают в течение двух суток при гибели контрольных мышей или образовании некроза у контрольных животных и интерпретируют по схеме, представленной в таблице 57.

Таблица 57 - Определение типа токсина *C. perfringens* в реакции нейтрализации

Тип <i>C. perfringens</i>	Токсин в исследуемом материале	Антитоксическая сыворотка				Контроль
		А	С	D	E	
А	альфа	-	х	х	х	+
С	бета	+	-	+	+	+
В	эпсилон	+	+	-	+	+
Д	йота	+	+	+	-	+

Примечание к таблице 57

- 1) - животные пали, у морских свинок и кроликов некроз на месте введения;
- 2) - животные живы, у морских свинок и кроликов некроз отсутствует;
- 3) - результат не учитывается

Выделение культуры *C. perfringens*, определение ее токсигенных свойств. *C. perfringens* является относительно аэротолерантным видом анаэробных клостридий. Температурный оптимум для типов А и D составляет 45° С, В и С — 37-45° С.

Согласно «Методическим указаниям...» в лабораториях РФ рекомендуется посев из содержимого кишечника и паренхиматозных органов делать на среду Кита-Тароцци с подавлением роста сопутствующей микрофлоры следующими способами. Применяют метод частых пересевов выросшей культуры с интервалом 2-3 часа на свежую среду Кита-Тароцци или засеянные пробирки прогревают при 65° С в течение 10 минут и затем культивируют 18 часов при 38° С. Рост *C. perfringens* в среде Кита-Тароцци — быстрой (3-8 часов), характеризуется помутнением, бурным га-

зобразованием, образованием гомогенного или слизистого осадка. Выросших культур делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. Клетки *C. perfringens* в мазках из культуры выглядят как короткие, толстые, грамположительные палочки с обрубленными концами, жгутиков не имеют. В старых культурах клетки образуют центральные и субтерминальные споры. При незначительной контаминации культурой посторонней микрофлорой производят дробный высев на глюкознокровяной агар Цейсслера. Посевы инкубируют при 37-38° С в течение 24 ч.

C. perfringens на кровяном агаре формирует колонии трех типов диаметром 2-5 мм: S — гладкие, M — слизистые, R — махровые. Гладкие колонии первоначально напоминают капельки росы, затем прозрачность исчезает, колонии приобретают белую или сероватую окраску. Форма плоская, рельеф выпуклый, поверхность блестящая, гладкая, края ровные. M-колонии формируют капсулообразующие клетки, они сходны с S-колониями, но имеют слизистую консистенцию. Шероховатые колонии — неправильной формы, края фестончатые. По мере пребывания в воздухе колонии всех типов приобретают зеленоватый оттенок, что является характерным признаком. Колонии окружены зоной гемолиза, полного или частичного. Зона гемолиза может быть двойной: вокруг — полный гемолиз (действие гемолизина), на отдалении — неполный (действие лецитиназы). Среда в процессе роста *C. perfringens* становится про-коричневой.

Из типичных колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении характерных для *C. perfringens* по морфологии и тинкториальным свойствам клеток культуру отвивают на агаре Кита-Тароцци, выращивают 8-16 часов при 37-38° С и определяют в пробе на мышцах наличие токсина (методику см. выше).

Если предполагается наличие *C. perfringens* типов E и D, токсин обнаруживают постановкой опыта на животных переводят из состояния протоксина в токсин. Предварительно культуру подщелачивают до pH 8,0-8,2, добавляют 0,25% трипсина или 0,5% панкреатина и выдерживают, встряхивая, при 37-38° С. При наличии токсина типа С токсичность снижается, E сохраняется, D и E — увеличивается. Тип токсина устанавливают по реакции нейтрализации, как указано выше. В настоящее время фирма Tech Inc. выпускает диагностический набор для иммуноферментного выявления токсинов возбудителя в содержимом кишечника. Перспективно применение для идентификации токсичных штаммов *C. perfringens* в диагностике.

С целью идентификации выделенных культур на видовом уровне изучают их ферментативные свойства. Для *C. perfringens* характерно наличие лецитиназы, желатиназы, казеиназы, способности расщеплять с образованием кислоты глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, свертывать молоко за 8-10 часов, при этом образуются прозрачная сыворотка и рыхлый створок казеина. Принимают во внимание, что штаммы типа А расщепляют инулин, но инертны по отношению к глицерину, типа Д утилизируют глицерин, но не инулин, типы В и С не разлагают оба эти углевода. Также используют тест-системы API 20A, Anacrotest 23 и др. *C. perfringens* — единственный вид клостридий, образующий капсулу, жгутиков не имеет.

Характер патологоанатомических изменений у морских свинок, зараженных подкожно, описан в разделе «Злокачественный отек».

Лабораторная диагностика браздота овец

Браздот — остропротекающая неконтагиозная болезнь овец, характеризующаяся геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычуга, двенадцатиперстной кишки, перерождением паренхиматозных органов, сильным образованием газов в желудке и кишечнике. Возбудителями являются *C. septicum*, *C. novyi* типа В, нередко выделяют *C. sordellii* и *C. perfringens*. В Западной Европе и США как самостоятельные нозологические единицы выделяют северный браздот (Nordic Bradsot), вызываемый *C. septicum*, который характеризуется геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычуга; инфекционный некротический гепатит овец, крупного рогатого скота, свиней (германский браздот), вызываемый *C. novyi* типа В. Кроме того, *C. novyi* типа D рассматривают как причину бациллярной гемоглинурии крупного рогатого скота в Америке и Австралии, *C. novyi* типа С — как возбудитель остеомиелита буйволов, а *C. novyi* типа А возбудитель газовой гангрены.

Лабораторная диагностика браздота овец основана на выделении и идентификации культур возбудителей (*C. septicum*, *C. novyi*).

Бактериологическое исследование

Для исследования в лабораторию направляют паренхиматозные органы, измененные участки стенки сычуга, отечную ткань, трубчатую кость, сосуды грудной и брюшной полостей, инфильтрат подкожной клетчат-

ки, участок двенадцатиперстной кишки, перевязанный лигатурами. Материал берут только от свежих трупов.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из материала готовят мазки, окрашивают по Граму и Муромцеву. Клетки *C. septicum* видны в препарате как крупные грамположительные палочки (0,6-1,0-10 мкм) с закругленными концами, располагающиеся одиночно, иногда в виде коротких цепочек. Клетки *C. septicum* имеют форму положительных палочек размером 0,6-0,8x3-8 мкм, характерным знаком считается наличие нитевидных форм в мазках-отпечатках с окрашенных покровов. Споры у перечисленных возбудителей овальные субтерминальные или центральные.

Выделение и идентификация возбудителей браздота

Культивирование. *C. septicum* и *C. novyi* — строгие анаэробы, чувствительны к кислороду, оптимум pH — 7,6-7,8, температура — 38° С.

Посевы производят из отечной подкожной клетчатки, подмышечной сычуга, паренхиматозных органов, экссудата грудной и брюшной полости в среду Кита-Тароцци, глюкозо-кровяной агар в чашках Петри.

Учитывая, что возбудители строгие анаэробы, целесообразно, по возможности, применять среды, содержащие цистеин, натрия тиосульфид для создания оптимального окислительно-восстановительного потенциала сред. Чашки с посевами инкубируют в анаэрокате. Время инкубирования 24-48 часов.

Характер роста возбудителей на питательных средах. *C. septicum* на среде Кита-Тароцци характеризуется интенсивным помутнением и образованием газа. На глюкозо-кровяном агаре возбудитель образует кружевные сплетения в виде «нитей-арабески» с зоной гемолиза. В агаре столбиком (1%-ный) формирует колонии диаметром 1-2 мм с уплотненным центром и радиально отходящими нитевидными перепутанными отростками. В глубине более плотной среды (2%-ный) колонии чечевицеобразной формы, иногда с отростками, розовато-желтоватого цвета. При росте в мозговой среде образует газ.

C. novyi в жидкой питательной среде растет с ее помутнением и образованием однородного или хлопьевидного осадка, газообразованием слабое. *C. novyi* тип В (*C. gigas*) на глюкозо-кровяном агаре формирует крупные, шероховатые колонии с неправильными бахромчатыми краями и отростками, образующими на периферии параллельные петли. Внутренняя структура колоний обычно неоднородна (мозаичность, кристаллы).

тии *S. novyi* типов А, В, С нередко проявляют тенденцию к образованию дочерних колоний. Колонии окружены зоной гемолиза. Колонии *S. novyi* типа D чаще мелкие, рассыпчатые. В агаре высоким столбиком с глюкозой колонии *S. novyi* напоминают кусочки ваты с уплотненным, более темным (коричневатым, желтоватым) центром или имеют форму линзы.

Морфология клеток возбудителей в культуре. В мазках из культуры клетки *S. novyi* крупные, грамположительные прямые или слегка изогнутые палочки (0,6-1,4x2-17 мкм) с закругленными или обрубленными концами, перитрихи. клетки располагаются единично или парами. Споры овальные, центральные или субтерминальные, лучше образуются на средах, бедных утилизируемыми углеводами и другими питательными веществами. В старых культурах клетки возбудителя окрашиваются грамотрицательно.

S. septicum — полиморфная, грамположительная палочковидная бактерия размером 0,6-0,8x2-35 мкм, располагается единично или парами. В старых культурах окрашивается грамотрицательно, капсулу не образует, перитрих, споры центральные или субтерминальные.

Идентификация *S. novyi* и *S. septicum* по ферментативным свойствам. При обнаружении в посевах бактерий с типичными для *S. novyi* и *S. septicum* культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами их отвивают для получения чистых культур и определяют наличие лецитиназы, липазы, желатиназы, казеиназы, индола, способность расщеплять глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу (табл. 58). Используют для идентификации тест-системы (см. выше).

Таблица 58 - Ферментативные свойства *S. septicum* и *S. novyi*

Вид бактерий	Признаки								
	Лецитиназа	Липаза	Желатиназа	Казеиназа	Индол	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза
Виды ШДН	-	-	+	+	-	+	+	-	+
Виды типа А	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Вид В	+	-	+	+	V	+	-	-	+
Вид С	-	+	+	-	+	+	+	-	нд.
Вид D (интестинальный)	+	-	+	+	+	+	-	-	-

Вспомогательный признак: нд — нет данных.

Дополнительными характеристиками *S. novyi* являются токсигенные свойства. *S. novyi* типов А и В синтезируют токсин «альфа», который обладает детальным и некротизирующим действием. *S. novyi* типов В и D

(*C. haemolyticum*) продуцируют бета-токсин, причем тип D в большем количестве, а тип В — в меньшем. *C. novyi* типа С указанные токсины образует. В реакции нейтрализации *C. novyi* типов А и В за счет альфа-токсина неразличимы. В рутинной диагностической практике реакцию нейтрализации не используют.

Биопроба. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике браздота овец» (1984) биопробу проводят одновременно с посевом исследуемого материала на питательные среды и выделения культуры возбудителя или проверки вирулентности инкубированной культуры. Для заражения используют морских свинок массой до 400 г. Патологический материал измельчают в стерильной ступке вmortar. Двум морским свинкам вводят подкожно в область брюшных мышц по 1,0 мл тканевой суспензии или культуры. При наличии возбудителя в материале животные погибают через 16-48 часов. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 8 суток.

При наличии в исследуемом материале *C. septicum* у павших морских свинок на месте инъекции обнаруживают следующие изменения: кожа легко отделяется от мышц, мышцы влажные, светло-красного цвета, подкожной клетчатке пузырьки газа, кишечник вздут, в сердечной полости и грудной полости значительный объем трансудата. Заражение морских свинок *C. novyi* дает следующие патологоанатомические изменения: на месте инъекции студенистый отек соединительной ткани, мускулы бледные. *C. sordellii* вызывает сходную картину изменений.

Павших животных подвергают бактериологическому исследованию. Обязательно делают мазки-отпечатки с серозных покровов печени. Бактерии *C. septicum* в таких препаратах имеют форму длинных нитей.

Лабораторная диагностика клостридиоза птиц

C. colinum вызывает у цыплят, индюшат язвенный энтерит, воспаление почки, селезенки.

Лабораторная диагностика основана на выделении и идентификации культуры возбудителя.

Бактериологическое исследование. В качестве материала для исследования используют сегменты кишечника с изъязвлениями, пораженные участки печени, селезенки, в которых наблюдают диффузные некротические очаги.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят окраски-отпечатки, окрашивают по Граму. Клетки *S. colinum* грамположительные, палочковидные (1х3-4 мкм). Споры овальные, субтерминальные, но образуются редко.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Возбудитель, как и все клостридий, анаэроб, его первичная изоляция из исследуемого материала представляет трудности. Посев материала производят в глюкозный бульон с 8% цитратной овечьей плазмы, тиогликолатный бульон с 8-10% сыворотки крови овцы, заражают 5-8-дневные куриные эмбрионы. На этих средах возбудитель необходимо пассажировать несколько раз, прежде чем производить высев на глюкозо-кислотный кровяной агар. Контаминированный материал высевают на среды с добавлением 25 мг/см³ полимиксина В. У выделенных культур *S. colinum* исследуют ферментативные характеристики.

Для инда характерно отсутствие лецитиназы, липазы, желатиназы, каталазы, образование индола, кислоты из глюкозы, сахарозы, мальтозы, инулы и лактозы.

Лабораторная диагностика эмфизематозного карбункула

Эмфизематозный карбункул — остропротекающая неконтагиозная инфекционная болезнь крупного и мелкого рогатого скота, характеризующаяся появлением в мускулатуре крепитирующих отеков.

Возбудитель — *S. chauvoei*. Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Для исследования из пораженных участков стерильным инструментом нарезают кусочки ткани 3х3х3 см³, при вскрытии трупа также берут кусочки печени, селезенки, кровь сердца. Материал должен быть взят не позднее 4 часов после гибели животного. В теплое время года материал консервируют 30%-ным раствором глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят окраски-отпечатки, окрашивают по Граму, Муромцеву. В окрашенных препаратах возбудитель виден как грамположительные палочковидные бактерии размером 0,5-1,6х1,5-9,6 мкм, с закругленными концами, тенденцией к полиморфизму (грушевидные, веретенообразные, шаровидные фор-

мы), с центральными и субтерминальными спорами. Иногда возбудитель образует цепочки из 3-5 клеток, но, в отличие от *C.septicum*, в материнских оболочках не имеет форму нитей.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *C. chauvoei* — строгий анаэроб, требует разрыхления до 5-10 мм ртутного столба. Температурный оптимум 36-38° С. Для получения питательных сред производят предварительно профламбиривание кусочками тканей, жидкий материал высевают пастеровскими пипетками. В качестве питательных сред используют среду Кита-Тароцци, провоситин-агар (кровь овцы) с печеночным экстрактом глюкозо-кровяной агар (ГКА) и слера. Для получения изолированных колоний посев материала предварительно производят на 3-4 чашки Петри.

Параллельно производят посевы на МПА и МПБ, для исключения аэробной микрофлоры. Несвежий материал целесообразно растереть в ступке со стерильным физиологическим раствором (1:4), прогреть при 80° С в течение 15-20 минут и затем посеять на питательные среды. Рекомендуется также посев на МППБ с 0,5% карболовой кислоты. При инкубировании и выявления спорных клеток в окрашенных средах со дна пробирки пастеровской пипеткой отбирают 3-5 мл среды, прогревают до 60° С в течение 30 минут и засевают на плотные среды.

При использовании метода посева в глубину сыровоточного агара в ходный материал (0,5 мл) засевают в пробирку с расплавленным и охлажденным агаром, затем этой же пипеткой производят последовательный перенос материала из этой пробирки еще в четыре пробирки с агарной средой. Содержимое 4 и 5 пробирок переливают в трубки Виньял-Дюво. Выросшие колонии отвивают на среду Кита-Тароцци и глюкозо-кровяной агар. Посевы в чашках инкубируют в строго анаэробных условиях в термостатах, лучше с 10% CO₂ при 37° С в течение 2-4 дней, пробирки со средой Кита-Тароцци выдерживают в термостате 1-2 суток при 37° С.

Заключение о целесообразности обработки материала с целью защиты от посторонней микрофлоры делают на основании результатов микроскопического исследования материала.

Характер роста возбудителя на питательных средах. На среде Кита-Тароцци рост *C.chauvoei* сопровождается равномерным легким помутнением среды, слабым газообразованием, через 2-3 суток среда приобретает запах прогорклого масла. Старые культуры приобретают гнилостный запах и потемнение среды указывают на загрязнение. Скорость спорообразования зависит от ряда фак-

ров и может варьировать от 24 до 72 часов. При получении смешанной культуры проводят дробный посев на глюкозо-кровяной агар в чашках Петри. В толще сывороточного агара возбудитель образует чечевичкообразные или круглые колонии с нежными отростками.

На кровяном агаре возбудитель формирует округлые колонии диаметром 0,5-3 мкм в большинстве случаев с небольшой зоной (β -гемолиза в виде «перламутровой пуговицы» (S-форма) или плоские с изрезанными краями в виде виноградного листа (R-форма). При посеве в мозговую среду посевная закисляется, есть газообразование, почернения нет, позднее в толще среды отмечается легкое покраснение. В молоке с кусочками печени рост обнаруживается уже через 16-18 часов при свертывании молока на 3-6-е, иногда на 14-е сутки.

Морфология клеток возбудителя в культуре. Из выросших культур готовят мазки, окрашивают по Граму. Клетки в мазках прямые или слегка изогнутые, полиморфные. Располагаются одиночно, парами, реже — цепочками, капсулу не образуют, перитрихи, споры овальные центральные или субтерминальные. В молодых культурах клетки возбудителя окрашиваются грамположительно, в старых имеют тенденцию к грамотрицательной окраске.

Идентификация возбудителя на основании изучения ферментативных свойств. Исследуемую культуру высевают на желточный агар, желатину, молоко, среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой, салицином, проводят пробу на индол. Для *S. chauvoei* характерен гидролиз желатина, расщепление перечисленных углеводов с образованием кислоты, отсутствие утилизации салицида, образование лецитиназы, липазы, эластазы, индола. При исследовании ферментативных свойств, кроме стандартных сред и тестов, может быть использована система API20A для анаэробов (Analytab Products).

Биопроба. Проводят с целью выделения возбудителя из исследуемого материала или определения патогенных свойств выделенной культуры. Обсевают загрязненный материал путем заражения морских свинок менее эффективна, чем посев на плотные кровяные среды. Тканевый материал инкубируют в ступке со стерильным МПБ (1:10), в объеме 0,5-1,0 мл вводят подкожно в область брюшных мышц морским свинкам массой 350-400 г. За животными наблюдают в течение 8 суток. Гибель обычно наступает на 1-4-е сутки. При наличии в материале возбудителя на месте инъекции в коже обнаруживают кровоизлияния, геморрагический выпот. Кожа от пораженных мышц отделяется с трудом. Мышцы темно-красного цвета, в подкожной клетчатке немного газа, кишечник не вздут, желчный пузырь переполнен

содержимым. Возможно наличие слабовирулентных штаммов, поэтому целесообразно внутримышечное введение материала с 1-2 каплями 10% раствора молочной кислоты, подавляющей фагоцитоз. При каждом заражении кролик не погибает (дифференцирующий признак).

Путем микроскопии мазков-отпечатков из тканей на месте поражения отличить *C. chauvoei* от других возбудителей злокачественного отека достаточно сложно, за исключением *C. septicum*, который образует на разных покровах длинные нити.

Лабораторная диагностика злокачественного отека

Злокачественный отек (газовая гангрена) — остропротекающая и контактиозная раневая инфекционная болезнь всех видов животных, представляющаяся воспалительным отеком, некрозом пораженных тканей и токсикацией. Возбудители: *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens*, *C. histolyticum*, иногда *C. chauvoei*.

Лабораторная диагностика основана на выделении и идентификации культур возбудителей.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования являются фрагменты пораженных тканей, тканевый экссудат и паренхиматозные органы.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из ступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. Морфология *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. chauvoei* в исходном материале описана выше.

Клетки *C. histolyticum* видны в препарате как тонкие грамположительные палочковидные бактерии размером 0,2-0,5x3-9 мкм с закругленными концами, расположенные одиночно, парно, редко цепочками. В осевом разрезе возбудитель споры не образует.

Клетки *C. sordellii* полиморфные, палочковидные с закругленными концами, размером 1,2-1,5 x 3,8 мкм, располагаются изолированно, по парам, редко — цепочками.

Выделение и идентификация культур возбудителей

Культивирование. *C. histolyticum* — нестрогий анаэроб, *C. sordellii* — строгий анаэроб. Температурный оптимум 37-38° С. Культивирование других возбудителей злокачественного отека изложено выше.

Исследуемый материал засевают в среду Кита-Тароцци, глюкозо-крово-
яной агар, МПБ, МПА. Чашки Петри с посевами инкубируют в анаэро-
бате. Время культивирования посевов 24-48 часов.

Характер роста возбудителей на питательных средах. Особенности
роста на питательных средах *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. chauvoei* описаны
ранее. *C. histolyticum* на среде Кита-Тароцци растет с равномерным помут-
нением, последующим просветлением среды и образованием осадка, га-
зообразования нет. На глюкозо-кровоном агаре формирует мелкие, ро-
зовато-белые, полусферические с ровным краем, блестящей поверхностью
колонии диаметром 0,5-1 мм. С возрастом колонии становятся непро-
зрачными, серыми или белыми, с изрезанными краями. В толще сахарно-
го агара неподвижные штаммы образуют чечевицеобразные колонии.
Штаммы, имеющие жгутики, — колонии с уплотненным центром.

C. sordellii на среде Кита-Тароцци в течение 24 часов вызывает сильное
помутнение и умеренное газообразование, культура имеет неприятный
гнилостный запах. По мере старения в среде появляется слизистый оса-
док. На глюкозо-кровоном агаре через 24-48 часов формирует сла-
бовязанульные, серо-белые колонии неправильной формы, с шероховатой
поверхностью, изрезанными краями. Обычно колонии окружены узкой зо-
ной β-гемолиза. В агаре столбиком формирует чечевицеобразные коло-
нии.

Морфология клеток возбудителей в культуре. *C. histolyticum* в ста-
рых культурах формирует овальные споры, располагающиеся центрально
или субтерминально («игольное ушко»), перитрих.

C. sordellii в культуре образует овальные центральные или субтерми-
нальные споры. В молодых культурах активно подвижен (перитрих).

Идентификация возбудителей по ферментативным свойствам.
При обнаружении в первичных посевах на среде Кита-Тароцци бактери-
альных клеток с типичными для возбудителей злокачественного отека мор-
фологическими и тинкториальными свойствами из культур делают дроб-
ный посев на глюкозо-кровоной агар Цейсслера. В случае выявления ти-
пичных клеток возбудителя в колониях на глюкозо-кровоном агаре, в пер-
вичных или последующих посевах, из подозрительных колоний отбирают
чистую культуру и у субкультур проверяют ферментативные свойства.
Биохимические свойства *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. chauvoei* изложены ра-
нее в соответствующих разделах. Для *C. histolyticum* и *C. sordellii* характер-
ны ферментативные свойства, представленные в таблице 91. Вирулентные
штаммы *C. sordellii* продуцируют летальный токсин типа А-токсина
C. novyi. Многие штаммы выделяют кислородо-лабильный гемолизин, не-

идентифицированные протеазы. *C. histolyticum* на казеиновых средах образует летальный и некротический токсин, высокоактивную коллагеназу и протеиназу, а также чувствительный к кислороду гемолизин. Для определения ферментативных свойств и типа токсина используют указанные ранее (см. «Инфекционная энтеротоксемия»).

Таблица 59 - Ферментативные свойства *C. histolyticum* и *C. sordellii*

Вид Клостридий	Ферментативные свойства							
	Лецитиназа	Липаза	Желатиназа	Казеиназа	Индол	Образование кислоты		
						Глюкоза	Лактоза	Сахароза
<i>C. sordellii</i>	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>C. histolyticum</i>	-	-	+	+	-	-	-	-

Биопроба. Проводят для обнаружения возбудителей непосредственно в исследуемом материале, а также для определения патогенных свойств культивируемых культур.

В первом случае в стерильной ступке растирают кусочки исследуемого материала с небольшим количеством МПБ и 0,5-1,0 см³ материала вводят подкожно морским свинкам в область брюшных мышц. За животных наблюдают в течение 8 суток. В положительном случае животные погибают через 1-2 суток. Погибших морских свинок вскрывают, учитывают характер патологоанатомических изменений и проводят бактериологическое исследование. Характер патологоанатомических изменений у морских свинок, зараженных *C. novyi*, описан ранее. При наличии в материале *C. perfringens* типов А и D кожа на месте инъекции легко отслаивается от мышц, органы имеют серовато-грязный цвет, кишечник вздут, сосуды кровенаполнены. В случае заражения *C. perfringens* типов В и С кожа легко отделяется от мышц красного цвета, сухие. Кишечник геморрагически воспален. Заражение *C. sordellii* приводит к образованию на месте инъекции некрозного отека, мышцы бледные. *C. histolyticum* при заражении редко вызывает гибель животных. Эффективно внутримышечное заражение. В этом случае кожа на месте инъекции красно-фиолетовая, мышцы расплываются (кашицеобразная масса), газа нет.

Лабораторная диагностика ботулизма

Ботулизм — остропотекающая кормовая токсикоинфекция. Характеризуется поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц. Возбудитель — *Clostridium botulinum*, продуцирует несколько типов токсинов. К токсинам отдельных типов наиболее чувствительны: А — человек, куры; В — человек, КРС, куры; С_a — волопитающая птица; С_b — КРС, лошади, собаки; D — КРС, овцы, реже — лошади, человек; Е — человек; F — человек; G (*C. argentinense*) — человек.

Лабораторная диагностика ботулизма основана на обнаружении и идентификации ботулинического токсина в крови больных, недавно погибших животных, кормах (пищевых продуктах), а также выделении культуры *C. botulinum* и выявлении ее токсигенных свойств.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования являются пробы подозрительных кормов, содержимое желудка, кусочки печени, серозный экссудат. От больных животных берут пробы крови. Материал берут не позднее двух часов после гибели животного.

Обнаружение ботулинического токсина. Кровь (сыворотку крови), серозный экссудат, из-за быстрого разрушения токсина, необходимо исследовать в кратчайшие сроки. Перечисленные материалы вводят белым мышам интравенно (0,3 мл). Наблюдение за животными ведут в течение пяти суток. В положительных случаях у животных развиваются общая и конечная слабость, параличи задних конечностей.

Пробы корма, содержимое желудка, кусочки печени массой 25-30 г растирают в ступке со стерильным песком, заливают равным объемом стерильного физиологического раствора, выдерживают два часа при комнатной температуре. Затем 2/3 материала фильтруют через вату или центрифугируют при 3000 об/мин 30 минут. Половину фильтрата прогревают в водяной бане при 100° С в течение 20-30 минут. Ботулинический токсин разрушается при 100° С за 20 минут. Гретый и негретый фильтрат вводят интравенно двум белым мышам массой 16-18 г (0,5-0,8 мл), морским свинкам массой 350 г — подкожно (3-5 мл). Наблюдение ведут в течение пяти суток. В положительных случаях отмечают наличие шаткой походки, расслабление скелетной мускулатуры, западение брюшной стенки (осинная талия) и гибель на 2-5-е сутки животных, которым ввели гретый фильтрат, и отсутствие клинических симптомов у животных с

гретым материалом («Методические указания по лабораторной диагностике ботулизма»).

Обнаружение токсина может быть проведено несколько иным способом. Приготовленную взвесь центрифугируют, фильтруют через бумажные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Поскольку токсин может присутствовать в форме протоксина (Е), то для его активации деловой части фильтрата смешивают с одной частью 1%-ного раствора трипсины и выдерживают 45 минут при 37° С и затем вводят животным.

На следующем этапе проводят идентификацию токсина и его нейтрализацию с антитоксическими сыворотками типов А, В, С, D, E. Для этой цели смешивают по 0,2 мл сыворотки каждого типа в одной пробирке, добавляют 1 мл фильтрата, инкубируют 45 минут при комнатной температуре или 30 минут при 35-37° С. Далее вводят двум белым мышам массой 16-18 г внутрибрюшинно по 0,8 мл смеси. Двум контрольным животным инъецируют исследуемый фильтрат, разведенный 1:10 стерильным физиологическим раствором. Учет результатов проведен, как описано выше. При нейтрализации токсина смесью антисывороток в пробирках контрольных животных токсин идентифицируют как ботулинический.

В случае необходимости определяют в РН тип ботулинического токсина по следующей схеме. Фильтрат разливают в шесть пробирок по 2,4 мл. В пять пробирок вносят по 0,6 мл тех или иных типовых антисывороток (А, В, С, D, E), в шестую — 0,6 мл физиологического раствора. Смеси инкубируют, как описано выше, и вводят каждую внутрибрюшинно двум белым мышам в дозе 0,8-1 мл. Результат учитывают и через четыре суток. В настоящее время выпускается диагностический набор для иммуноферментного выявления ботулинического токсина (фирма Elcatech).

Обнаружение ботулинического токсина в исследуемом материале является достаточным основанием для постановки диагноза. При исследованиях по выявлению токсина в животном материале необходимо учитывать, что споры *C. botulinum* могут присутствовать в кишечнике здоровых животных, после их смерти способны размножиться и выжить в анаэробных условиях и продуцировать токсин.

Выделение и идентификация культуры *C. botulinum*

Пробы исследуемого материала, подготовленные, как указано выше, для обнаружения ботулинического токсина высевают в жидкую среду Тароцци с 0,5% глюкозы в два флакона емкостью 100-200 мл. Оптимизи-

питательных сред 7,0-7,6, температурный оптимум — 30-37° С. Максимальное накопление токсина типов А и Е наступает через 4 суток, типов В и С — через 5 суток, типа D — через 10 суток инкубирования посевов. После посева материала один флакон прогревают при 80° С в течение часа, другой не подвергают термической обработке. Прогревание уничтожает большую часть сопутствующей неспорообразующей микрофлоры и инициирует прорастание спор возбудителя. Споры возбудителя типа Е требуют обработки гипохлоритом. Параллельно, с целью выделения чистой культуры возбудителя, материал высевает на глюкозо-кровяной агар Цейсслера в чашках Петри, которые инкубируют в анаэробных условиях с разрежением воздуха не более 5 мм ртутного столба или замещают воздух смесью водорода и СО₂. Посевы инкубируют при 35° С в течение 5 суток.

Рост возбудителя на жидкой питательной среде сопровождается ее постепенным помутнением (на 2-3-й сутки), газообразованием, появлением у культуры запаха прогорклого масла. Из выросших культур делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении в мазках грамположительных палочковидных бактерий (0,9-1,2x4-6мкм) субтерминальными спорами на 5-7-е сутки инкубирования проводят выявление токсина и его идентификацию в реакции нейтрализации на мышах, как описано выше. Смешанные первичные культуры могут быть посеяны на глюкозо-кровяной агар для получения чистой культуры.

Посевы исследуемого материала или первичных бульонных культур на глюкозо-кровяной агар просматривают на 2-4-е сутки инкубирования. Колонии *C. botulinum* круглые или с корневидными отростками, бесцветные или сероватые, выпуклые, диаметром 2-6 мм, в большинстве случаев окружены зоной β-гемолиза. При обнаружении в колониях бактериальных культур, типичных для *C. botulinum*, культуры отбирают на оптимальные питательные среды, подвергают идентификации по биохимическим признакам, определяют наличие способности к токсинообразованию и тип токсина (см. выше). С целью видовой идентификации у культур исследуют наличие лецитиназы и липазы путем посева на желточный агар, определяют наличие желатиназы, казеиназы, способности образовывать индол, кислоту из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы. По перечисленным критериям культуры *C. botulinum* могут быть отнесены к одному из четырех ферментативных типов (табл. 60). Применяют тест-системы для анаэробов (см. ранее).

Таблица 60 - Ферментативные свойства *C.botulinum*

Тип	Признаки								Тип токсина	
	Лецитианаза	Липаза	Желати-наза	Казеиназа	Индол	Глюкоза	Лактоза	Сахароза		Мальтоза
1	-	+	+	+	-	+	-	-	+	A, B, F
2	-	+	+	-	-	-	-	-	+	B, E, F
3	±	+	+	-	±	+	-	-	±	C, D
4	-	-	+	+	-	-	н.д.	-	н.д.	

— варьирующий признак н.д. — нет данных

Лабораторная диагностика столбняка

Столбняк — остропротекающая инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся судорожными сокращениями мускулатуры в результате воздействия токсина возбудителя. Возбудитель болезни — *C. tetani*.

Лабораторный диагноз устанавливают на основании обнаружения возбудителя в исследуемом материале токсина возбудителя, а также выделения культуры возбудителя и выявления у нее токсигенных свойств. С учетом характерных клинических признаков болезни, нередко ограничиваются постановке диагноза изучением клиники и анамнестических данных.

Бактериологическое для исследования

Прижизненно для исследования направляют раневой секрет, фрагменты тканей из глубоких слоев мест поражения; посмертно — ткань мест поражения, кусочки печени, селезенку, кровь.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. В положительных случаях находят тонкие грамположительные палочковидные клетки размером 0,4-0,6x4-8 мкм, с характерно терминально расположенными спорами («барабанная палочка»), споры в 2-3 раза толще клетки; капсулы нет. Результаты микроскопического исследования имеют ориентировочное значение, так как с возбудителем морфологически сходны *C. tetanoides* и *C. tetanomorphum*.

Обнаружение токсина, выделение и идентификация культуры *C. tetani*

Обнаружение токсина в исследуемом материале. Исследуемый материал растирают со стерильным песком в ступе с физиологическим раствором (1:2). Половину взвеси экстрагируют при комнатной температуре в течение часа, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Фильтратом заражают подкожно в заднюю лапку 2 белых мышей (масса 16-18 г) в дозе 0,5-1 мл. Второй группе мышей вводят 0,5 мл фильтрата и 500 ЕД столбнячного антитоксина. Животным третьей группы вводят фильтрат, прогретый при 100° С в течение 30 минут. Положительный результат у мышей 2 и 3-й групп изменения должны отсутствовать, у мышей 1-й группы через 2-4 суток в положительно случаях появляются признаки тетанического сокращения мышц. Животные погибают с вытянутыми лапками, искривлением позвоночника в сторону лапки, в которую был введен исследуемый материал. За животными наблюдают в течение 10 суток. При выявлении токсина в материале работу по выделению культуры прекращают. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике столбняка» (1983) предусмотрено заражение мышей фильтратом подкожно в заднюю лапку в дозе 0,5-1 мл или двух морских свинок массой 300-350 г в дозе 3-5 мл без предварительного прогревания фильтрата и без введения столбнячного антитоксина. Срок наблюдения за клиническим состоянием животных — 10 суток.

Выделение культуры *C. tetani*. Возбудитель — строгий анаэроб, температурный оптимум — 37-38° С, pH 7,2 -7,4. Вторую половину исследуемой взвеси (см. выше) прогревают в течение 20 минут при 80° С, затем вносят в среду Кита-Тароцци с 0,5% глюкозы, печеночный, мартеновский бульон со слоем вазелинового масла. Можно делать посев непрогретого материала в два культуральных сосуда, один из которых затем прогревают при 80° С в течение 20 минут. Параллельно прогретый материал засевают с целью получения изолированных колоний на кровяной агар с 1,5% и 3% агара в чашки Петри. Посевы культивируют в анаэроостате с реверсацией воздуха до 4-5 мм ртутного столба или с заменой воздуха смесью H_2 и CO_2 при 37-38° С в течение 2-5 суток.

Через 2-4 дня просматривают посевы на плотных и жидких средах. На среде Кита-Тароцци рост возбудителя сопровождается ее интенсивным помутнением с небольшим газообразованием, позднее (2-3 суток) выпадает осадок, среда просветляется, культура имеет запах жженого рога.

На 3%-ном агаре Цейссlera *C. tetani* формирует круглые, бесцветные или серые колонии с неровными краями (ризоидные), на 1,5%-ном агаре

(влажном) наблюдают характерный расплывающийся, роящийся рост в виде жидкой культуры. Может наблюдаться узкая зона β -гемолиза.

Из жидких питательных сред и подозрительных колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. В положительных случаях находят в мазках тонкие грамположительные палочки с терминальными спорами, с возрастом клетки становятся грамвариабельными, вплоть до грамотрицательных. Если первичный посев производили только в жидкую питательную среду, то производят посев бульонной культуры на кровяной агар с целью получения изолированных колоний.

При обнаружении в жидких питательных средах бактериальных культур, характерных для *C. tetani*, на 4-6-е сутки инкубирования определяют наличие в культуре токсина путем ее введения белым мышам, как было указано выше.

Основным направлением лабораторного исследования является обнаружение токсина, к идентификации выделенной культуры прибегают редко. Для *C. tetani* характерно отсутствие лецитиназы, липазы, каталазы, возбудитель не образует кислоты из глюкозы, лактозы, сахарозы, маннозы, гидролизует желатину, индол образует не постоянно. Для окончательной идентификации удобно использовать тест-системы для анаэробов.

Питательные среды

Среда Кита-Тароцци. Мясо или печень крупного рогатого скота нарезают мелкими кусочками, заливают трехкратным объемом МПА или бульона Хоттингера (рН 7,4-7,6) и 30 минут кипятят. Затем среду фильтруют, печень (мясо) промывают водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой. По 3-4 кусочка мяса (печени) помещают в пробирку, наливают 7-8 мл бульона, покрывают слоем вазелинового масла и стерилизуют при 120° С 20 минут. Перед использованием среду регенерируют (кипятят с последующим охлаждением).

Кровяной агар с глюкозой. К 3%-ному МПА (рН 7,2-7,4), разведенному и охлажденному до 50° С, добавляют до 1-2% стерильного раствора глюкозы, 15-20% свежей дефибринированной крови барана или лошади. Разливают по чашкам Петри, подсушивают в термостате.

Полужидкий агар для строгих анаэробов (Тароцци). В бульон Хоттингера (рН 7,2-7,4) с 0,3-0,5% глюкозы добавляют 0,1% агара. Среду разливают по 9 мл в стерильные пробирки с кусочками вареного мяса, печени или фарша, стерилизуют при 120° С 30 минут. Среду можно использовать, не заливая поверхность вазелиновым маслом.

Мозговая среда (МС). Свежий мозг (не позже чем через 18 часов после убоя животного) очищают от пленок и пропускают через мясорубку. Мозговой фарш заливают водопроводной водой (1 часть мозгового фарша на 1 часть воды) и протирают через сито. Реакция протертой массы должна быть нейтральной или слабощелочной. Стерилизуют текучим паром в течение 2 часов. Затем раскладывают по пробиркам высоким столбиком и стерилизуют в течение 2 часов при 110° С. Для более быстрого почернения мозговой среды при культивировании анаэробов рекомендуется добавить 0,05% сернистого железа.

Агар для трубок Виньял-Вейона. В бульоне Мартена (рН 7,4) растворяют 2% агара, 0,1% глюкозы. Среду разливают в узкие тонкостенные пробирки и стерилизуют дробно, текучим паром в течение 3 дней.

Бульон Вейнберга для анаэробов. 1 кг бычьего сердца пропускают через мясорубку, добавляют к фаршу 1 л воды, нагревают до кипения, охлаждают, снимают жир. Смешивают 400 г печени, 400 г свиных желудков, 40 г соляной кислоты, 4 л воды, подогретой до 50° С, и выдерживают при этой температуре 18-24 ч. Затем подогревают до 100° С, жидкость сливают, фильтруют, добавляют 0,2% двусоснового фосфорнокислого натрия и устанавливают рН 7,4, смешивают 1 л мясной воды из сердца быка и 2 л полученного пептона, устанавливают рН 7,8-8,2 и стерилизуют при 120° С 30 минут. Бульон разливают по пробиркам с кусочками вареной печени, наливают стерильное вазелиновое масло слоем 0,5 см и вновь стерилизуют при 120° С 30 минут. Перед посевом к бульону добавляют стерильный раствор глюкозы до 0,5%.

Среда Виллиса и Хоббс. Смешивают 400 мл бульона Хоттингера, 4,8 г агара, 4,8 глюкозы, 1,3 мл 1%-ного раствора нейтрального красного. Стерилизуют при 115° С 15 минут, охлаждают до 50° С и добавляют 15 мл стерильной желточной суспензии (смешивают поровну куриный желток, физиологический раствор и 60 мл стерильного обезжиренного молока).

Железосульфитный агар (Вильсон - Блер). К 100 мл 3%-ного МПА (рН 7,4) с 1% глюкозы при температуре 60° С добавляют 10 мл 20%-ного раствора сернистого натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) и 1 мл 8%-ного раствора хлористого железа (FeCl_3), приготовленного на стерильной дистиллированной воде. Раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ предварительно стерилизуют 1 ч текучим паром. Затем среду, не стерилизуя, разливают по чашкам Петри. Сернистый натрий можно заменить серноватистоокислым натрием ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$), а хлористое железо — сернокислым (FeSO_4). Сульфат натрия соединяется с хлоридом железа, и образуется черный осадок сернистого железа (FeS). Этой способностью обладают анаэробы и некоторые аэробные бактерии,

вследствие чего колонии таких микроорганизмов окрашиваются в черный цвет. *S. perfringens*, обладающий большой скоростью роста, имеет цвет среды через 1-2 ч культивирования. Другие анаэробы формируют олений-черные колонии через 6-7 ч.

Молочные среды. Молоко отстаивают и удаляют верхний жирный слой. Обезжиренное молоко разливают высоким столбиком в пробирки, которые предварительно укладывают кусочки вареной печени, и стерилизуют 3 дня при температуре 100° С по 20 минут.

Железо-сульфитное молоко. К 100 мл обезжиренного молока добавляют 10 мл 20%-ного раствора сернистокислго натрия и 1 мл 8%-ного хлористого железа. Среду готовят непосредственно перед использованием и разливают по пробиркам. На данной среде *S. perfringens* можно обнаружить в смеси со стрептококками, которые на других средах способны заметно тормозить его рост.

Бензидино-кровоной агар. К 3%-ному МПА (рН 6,4) с 1% глюкозой подогретому до температуры 50° С, добавляют бензидин до концентрации 9% и 10% стерильной дефибрированной крови барана. Компоненты перемешивают до приобретения средой шоколадного оттенка, разливают по чашкам Петри и подсушивают 4-5 ч в термостате. Затем чашки выдерживают в анаэробных условиях в термостате 12-24 ч, а затем переносят в аэробные условия. Колонии *S. povuі* окрашиваются в черный цвет за 15-30 мин. Раствор бензидина готовят следующим образом: в 10 мл дистиллированной воды добавляют 0,25 г основного бензидина, 0,1 г 1% HCl и нагревают до растворения. Раствор пригоден для употребления в течение 2 недель.

Желточно-кровоной агар Шапина — Вегина. К 2,5%-ному МПА добавляют 10% дефибрированной крови барана, 10% желточной среды. Среда предназначена для выявления *S. povuі*. Через 16 ч выращенные колонии окружены непрозрачной зоной гемолиза с наличием на поверхности среды вокруг колоний непрозрачной пленки с жемчужным блеском. Другие бактерии (аэробы, анаэробы), как правило, не дают отчетливо перламутрового слоя и зоны редукции.

Полусинтетическая среда. Используют для культивирования для быстрой селекции анаэробных бактерий. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 15 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 2,5 г натрия сульфата, 1,3 г агар-агара и подщелачивают. Смесь автоклавируют при 121° С в течение 15 минут, фильтруют, добавляют 5,5 г глюкозы, 0,5 г сульфита натрия, предварительно растворенных в небольшом количестве воды, устанавливают рН 7,1. Добавляют 0,001 г ре-зазурина и вносят смесь в течение нескольких минут. Среду разливают в пробирки и

мл, стерилизуют при 110° С 30 минут, охлаждают под холодной водой. При росте анаэробов среда окрашивается в нижней части пробирки, факультативных анаэробов — весь столбик среды. Среду используют 3 недели при хранении в условиях комнатной температуры.

Перфрингенс-агар (O.P.SJP.-агар, пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 15 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г соевого пептона, 7 г печеночного экстракта, 1 г железа аммонийно-цитратного, 1 г натрия метабисульфита, 1,5 г трис-буфера, 10 г агара, устанавливают рН 7,3. Стерилизуют автоклавированием при 121° С 15 минут, затем охлаждают до 50° С, вносят добавки (стерильно), обеспечивающие среде селективные свойства, и разливают по чашкам Петри. Добавка «А» содержит 100 мг натрия сульфадиазина, добавка «В» — 0,5 г олеандомицина фосфата и 10 ЕД полимиксина В сульфата. Среда содержит из 100 мкг/мл натрия сульфадиазина, 0,5 мкг/мл олеандомицина фосфата и 10 ЕД полимиксина В сульфата. Данный состав обеспечивает селективные свойства, оптимальные для изоляции *C. perfringens*. Натрия метабисульфат и аммонийно-цитратное железо являются индикаторами редукции сульфита, что влияет на формирование колоний возбудителя черного цвета диаметром 2-4 мм. Рост других сульфитредуцирующих бактерий (сальмонеллы, протей, цитробактер, стафилококки, бациллы) ингибируется. На среде могут расти энтерококки, но их колонии по внешнему виду отличаются от колоний *C. perfringens*.

Анаэробный агар Шедлера (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптического соевого бульона, 5 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г декстрозы, 0,4 г цитрата гидрохлорида, 0,01 г гемина, 0,75 г трис-буфера, 13,5 г агара. Устанавливают рН 7,6, стерилизуют автоклавированием при 121° С 15 минут. С селективными добавками среду используют для выделения клостридий, бактероидов, флавобактерий, лактобацилл, стрептококков (анаэробных) из проб фекалий и кишечного тракта. Для изоляции клостридий и бактероидов в 1000 мл основного анаэробного агара добавляют 10 г порошка плаценты и 0,002 г неомицина. С целью выделения флавобактерий в 1000 мл вносят 7 мл 0,5%-ного тиротрицина в этаноле. Для анаэробных лактобацилл и стрептококков в 1000 мл вносят 10 г натрия ацрилата и 0,002 г неомицина. Посевы инкубируют при 37° С в анаэробных условиях.

Основной перфрингенс-агар (пропись фирмы «Дифко», 1982). Среду используют для изготовления TSC- или SFP-агара при предварительной идентификации и подсчете *C. perfringens*. В 1000 мл дистиллиро-

ванной воды растворяют триптозы — 15 г, соевого пептона — 5 г, мясного экстракта (сухого) — 5 г, дрожжевого экстракта — 5 г, натрия метабисульфита — 1 г, железа аммонийноцитратного — 1 г, агара — 14 г. Устанавливают pH 7,6, стерилизуют при 121° С 10 минут. Затем среду охлаждают до 50° С и вносят соответствующие селективные добавки.

Триптозо-сульфитный циклосериновый агар (TSC-agar). В основной перфрингенс-агар вносят D-циклосерин из расчета 400 мг/л и 50 мл желточной эмульсии. Компоненты перемешивают и готовую среду разливают в чашки Петри.

Перфрингенс-агар Шахида-Фергусона (SFP-agar). В основной перфрингенс-агар вносят следующие антибиотики: 12 мг/л канамидин сульфат, 30000 ЕД/л полимиксин В сульфата и 50 мл/л желточной эмульсии. Готовую среду разливают в чашки Петри. На обеих указанных средах вокруг черных колоний *S. perfringens* образуется опалесцирующая зона, указывающая на лецитиназную активность микроорганизма.

Анаэробный бульон Шедлера. По составу среда аналогична анаэробному агару Шедлера, но из нее исключен агар. Используют для выращивания патогенных анаэробов, для определения антибиотикоустойчивости анаэробов методом разведения с выражением результата в виде МПН.

Тиогликолятный бульон. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 0,5 г L-цистина, 2,5 г NaCl, 5,5 г декстрозы, 5 г дрожжевого экстракта, 15 г панкреатического перевара казеина, 0,5 г натрия тиогликолята. Устанавливают pH 7,1, разливают по емкостям и стерилизуют при 121° С 15 минут. Перед использованием среду кипятят и охлаждают. Рекомендуется для контроля контаминации различных материалов анаэробными бактериями.

Анаэробный агар Уилкинса - Чангрена. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 10 г желатинового пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 1 г декстрозы, 5 г NaCl, 1 г L-аргинина, 1 г натрия сульфата, 0,0005 г менадиона, 0,005 г гемина, 10 г агара. Устанавливают pH 7,1, стерилизуют при 121° С 15 минут. Среда рекомендуется для культивирования анаэробных микроорганизмов из клинических материалов, является стандартной для определения антибиотикочувствительности анаэробных бактерий. При исключении агара среда может быть использована как питательный бульон.

Обогащенный клостридиальный агар (RCM-agar). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 3 г дрожжевого экстракта, 10 г дрожжевого экстракта, 10 г пептона, 5 г декстрозы, 1 г растворимого крахмала, 1 г натрия хлорида, 3 г натрия ацетата, 0,5 г цистеина гидрохлорида, 15 г агара. Устанавливают pH 6,8, стерилизуют при 121° С 15 минут. Среда

рекомендуется для исследования кишечной микрофлоры. С добавками крови она пригодна для обнаружения в фецес животных и людей лактобацилл, с добавками крови и неомицина — бактероидов.

Кровяной агар для *Clostridium chauvoei*. Состав: питательный бульон — 94 мл; печеночный экстракт (Oxoid) — 3,2 г; глюкоза — 1,0 г; агар — 1,6 г; дефибрированная кровь овцы — 5,0 мл. Приготовление: бульон, печеночный экстракт, глюкозу и агар смешивают и автоклавируют при 115° С в течение 10 минут. К остуженной среде (50° С) добавляют кровь и среду разливают в чашки Петри.

Полужидкий агар для определения ферментативной активности анаэробов. Для устранения углеводов, которые могут быть в мясе, среда должна быть приготовлена на сброженной мясной воде. Сброженная мясная вода: 500 г мясного фарша заливают 1 л теплой (37° С) водопроводной воды, добавляют 5-7 г обычных пекарских дрожжей, перемешивают и ставят в термостат на 18 часов. Мясо отжимают через полотно, полученную жидкость кипятят, фильтруют, разливают в колбы (по 500 мл) и стерилизуют при температуре 115-120° С в течение 15-20 минут. Сброженную мясную воду можно заготавливать впрок и употреблять по мере надобности.

Картофельный бульон Нечаевской и Старобинец. Тщательно вымытый и мелко нарезанный картофель заливают водой из расчета на 1 кг картофеля 2 л воды, стерилизуют при 2 атмосферах в течение 10 минут, затем фильтруют через вату или марлю в горячем виде. К фильтрату добавляют 1% сухого пептона и 0,5% поваренной соли, устанавливают рН 7,2-7,4 и кипятят, фильтруют. Полученную светло-желтую прозрачную жидкость разливают по пробиркам или флаконам, в которые помещают кусочки вареного картофеля и наслаивают вазелиновое масло; стерилизуют 20 минут при 1 атмосфере. Для приготовления твердой среды к бульону добавляют 1-3% агара и стерилизуют.

На картофельных средах все анаэробы не теряют своих патогенных и токсигенных свойств и хорошо растут.

Полужидкий агар с углеводами и индикатором. В 500 мл сброженной мясной воды добавляют 2% пептона и 0,5% хлористого натрия, устанавливают рН 7,4 и кипятят до растворения пептона. Отливают 100 мл пептонной мясной воды и растворяют 3,5 г сухого кристаллического лакмуса, предварительно проведенного через спирт. К оставшимся 400 мл мясной пептонной воды добавляют 0,25% агара (на 500 мл) и расплавляют в авто-

К горячему агару добавляют 100 мл мясо-пептонной воды с лакмусом. Для улучшения буферности среды добавляют 0,2% двуметаллического фосфорнокислого натрия.

Агар с лакмусом разливают по колбам из расчета количества помещаемых в лабораторию испытуемых Сахаров. В каждую колбу вносят 70 мг испытуемого сахара. После растворения сахара агар разливают по пробиркам высоким столбиком и дробно стерилизуют текучим паром 3 раза по 15 минут. Посев производят в расплавленный и остуженный до 40°С полужидкий агар. Лакмус можно заменить индикатором Андраде (1 мл). Приготовление индикатора Андраде: 0,5 г кислого фуксина растворяют в 100 мл дистиллированной воды и прибавляют 16 мл нормального раствора едкого натра. Фуксин довольно быстро обесцвечивается.

При определении ферментативной активности анаэробов методом посева в полужидкий агар необходимо учитывать, что в глубине пробирки среда чаще всего имеет цвет бульона, а не индикатора, и только в верхнем слое, куда легко диффундирует кислород воздуха, отмечается окраснение в случае разложения данного сахара с образованием кислоты или посинение при отсутствии его ферментации. В глубине среды благодаря отсутствию кислорода лакмус переходит в свою бесцветную форму. Чтобы установить изменение среды, необходимо убедиться в наличии роста; в противном случае нельзя судить об отношении микроба к данному углеводу.

Лабораторная диагностика коринебактериозов

В настоящее время род *Corynebacterium* включает порядка 25 видов бактерий. Естественной средой обитания коринебактерий являются слизистые и кишечный тракт, некоторые виды обнаруживаются на коже клинически здоровых животных. В патологии животных наибольшее значение имеют нижеследующие виды коринебактерий. *C.pseudotuberculosis* — вызывает казеозный лимфаденит у овец, коз, лимфангит у крупного рогатого скота, овец. Естественной средой обитания являются слизистые и кишечный тракт, а также кожа клинически здоровых овец. *C.renale* вызывает пиелонефриты у крупного рогатого скота, баланопоститы у быков, поражения лимфатических узлов у свиней. *C.cystitidis* и *C.pilosum* обуславливают пиелонефриты крупного рогатого скота. Оба вида обитают в мочеполовом тракте коров. *C.renale*, *C.pilosum*, *C.cystitidis* относят к так называемой «ренальной» группе коринебактерий. *C.equi* (синоним *Rhodococcus equi*) вызывает бронхопневмонию у жеребят 2-4 месяцев возраста, цервикальные лимфадениты у свиней, крупного рогатого скота.

обычно этот вид бактерий обнаруживают в фекалиях животных. *C. bovis* обитает в молочном канале крупного рогатого скота, его роль в патологии неясна. Хорошо известный ранее вид *C. pyogenes* перенесен в род *Actinotusces*. **Лабораторная диагностика** коринебактериозов основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является гной, экссудат, при пневмониях (*C. equi* - *R. equi*) — образцы трахеальной слизи, в случаях циститов, шифригов берут пробы мочи.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму, в случае подозрения на наличие *R. equi* так же по модифицированному методу Циля—Нильсена. В препаратах, окрашенных по Граму, коринебактерии имеют форму грамположительных палочек с закругленными концами, различной степенью полиморфизма, нередко располагающихся попарно друг к другу; клетки *R. equi* чаще кокковидные, легко обесцвечиваются и могут окрашиваться как кислотоустойчивые.

Выделение и идентификация коринебактерии

Культивирование. Коринебактерии — факультативные анаэробы, температурный оптимум 37-38° С, рН питательных сред 7,4-7,6. Для выделения патогенных коринебактерии используют кровяной, сывороточный (5%) МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, кровяную теллуритовую среду, среду Леффлера. Контаминированный материал для подавления роста грамотрицательных бактерий засевают на агар Мак-Конки. Посевы инкубируют в условиях обычной атмосферы 24-48 часов.

Особенности роста коринебактерии на питательных средах. *C. pseudotuberculosis* на кровяном агаре через сутки инкубирования формирует желто-белые или белые с матовой поверхностью, непрозрачные колонии диаметром около 1 мм. Через 48-72 часа культивирования появляется узкая зона гемолиза (у большинства штаммов). При длительном инкубировании размер колоний может достигать 3 мм, они приобретают коричневатый цвет и крошковидный характер.

На среде Леффлера возбудитель растет в виде крошковатого с желтым оттенком налета, без разжижения сыворотки. На кровяной теллуритовой среде колонии мелкие, слабовыпуклые, с матовой поверхностью, черные цвета. В питательном бульоне возбудитель растет без или с равномерным помутнением среды, с появлением небольшой пленки и осадка.

C.renale через 24 часа инкубирования образует мелкие, негемолитические колонии, с возрастом превращающиеся в непрозрачные, белесые. *C.pilosum* образует колонии, сходные с колониями *C.renale*, приобретающие с возрастом цвет от желтого до коричневого. *C.cystitidis* формирует колонии как и *C.renale*, но обычно белого цвета. *C.equi* (*R.equi*) через 24 часа выращивания посевов образует мелкие, гладкие, блестящие колонии негемолитические. В более старых культурах колонии желтовато-розового цвета.

Морфология клеток коринебактерии в культуре. Из подочашечных колоний готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму. Клетки коринебактерии в мазках из колоний по морфологии и тинкториальным свойствам в основном не отличаются от таковых в препаратах из исходного материала.

Идентификация коринебактерии на уровне рода. Культуры бактерий, сходные по морфологическим, тинкториальным, культуральным свойствам с коринебактериями, отвивают на питательные среды и инкубируют с целью идентификации. Для идентификации на родовом уровне принимают во внимание происхождение материала, тинкториальные особенности (быстрота обесцвечивания при окраске по Граму), морфологию клеток, отношение к кислороду, подвижность, каталазная активность.

Идентификация коринебактерии на уровне вида. Выделенные культуры на последующем этапе дифференцируют на виды путем изучения гемолитической активности на кровяном агаре, ферментативных свойств: гидролиз эскулина, редукция нитратов, разжижение желатина, образование уреазы, образование кислоты без газа из глюкозы, мальтозы, сахарозы (табл. 61).

С целью дифференциации коринебактерии «ренальной» группы дополнительно изучают скорость формирования колоний, цвет, рост при 5,4 (в бульоне), редукцию нитратов, разжижение желатина, гидролиз мальтозы на-80, образование кислоты из ксилозы, крахмала (табл. 62).

С целью уточнения видовой принадлежности выделенной культуры коринебактерии число изучаемых признаков может быть в случае необходимости расширено (табл. 63).

Биопроба. При заражении мышей культурами *C. pseudotuberculosis* выявляется вариабельность их вирулентности. При внутривенном заражении погибает 90,7% животных, при подкожном — около 21,2%. В результате внутрибрюшинного заражения морских свинок (самцы) можно выявлять орхит.

Питательные среды. Среда Тинсдаля. К 1000 мл расплавленного и охлажденного до 50° С 2%-ного МПА добавляют 120 мл 1%-ного раствора L-цистина на 0,1 N хлористоводородной кислоте, 120 мл 0,1 N раствора гидроксида натрия, 18 мл 2%-ного раствора теллурида калия, 18 мл 2,5%-ного раствора гипосульфата натрия и 200 мл стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота.

Приготовление раствора теллурида калия. В 100 мл дистиллированной воды растворяют 2 г теллурида калия. Раствор стерилизуют в кипящей водяной бане 30 минут и хранят при комнатной температуре. В случае выпадения осадка раствор вновь прогревают в водяной бане.

Таблица 61 - Дифференциальные признаки грамположительных, не образующих спор, неправильной формы палочек

Признаки	Corynebacterium	Agromyces	Cellulomonas	Oerskovia	Rothia	Actinomycetes	Arcanobacterium	Propionobacterium	Arachnia	Cardanella
Морфология палочек	Палочки булавовидной формы	Ветвящиеся, нитевидные формы	Неправильные палочки, кокковые формы	Ветвящиеся гифы, палочковидной формы	Неправильные палочки, нити, кокковидные формы	Палочки, нити, ветвящиеся структуры	Короткие неправильные палочки, могут доминировать кокковидные формы	Неправильные палочки, ветвящиеся и кокковидные формы	Палочки, нити, ветвящиеся структуры	Неправильные палочки
Рост по 1 грамму	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Степень строгий анаэроб	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Отношение к кислороду:	Факультативный анаэроб или микроаэрофил	X	+	+	+	+	+	P	
	Строгий анаэроб	-	-	-	-	-	-	P	
Подвижность	-	-	P	X	-	-	-	-	-
Каталаза	+	-	+	+	+	3	3	+ ⁴	-
Место обитания и патогенные свойства	Человек, животные и др. источники. Есть виды, патогенные для животных и человека	Почва	Почва, гниющие растения	Почва, гниющие растения, другие источники	Ротовая полость; оппортунистический патоген человека	Млекопитающие; большинство патогенны для животных и человека	Животные, человек; патогенны для человека и животных	Продукты, кожа человека, клинический материал. Есть патогенные для человека	Рис, пшеница, овес, ячмень, кукуруза, соя, горох, фасоль, картофель, морковь, капуста, лук, чеснок, грибы, дрожжи, бактерии, вирусы, простейшие, паразиты

¹ - Возможно быстрое обесцвечивание; ² - Возможно появление грамтрицательных форм; ³ - более типична переменчивость; некоторые штаммы дают положительную реакцию; ⁴ - которые штаммы дают отрицательную реакцию; штаммы имеют положительный признак различен в рангах (вида, рода, семейства).

Таблица 62 - Дифференциация коринебактерий и *Rhodococcus equi*

Признаки	<i>C. bovis</i>	<i>C. kurtzschii</i>	<i>C. pseudo-tuberculosis</i>	<i>C. renale</i> группа	<i>R. equi</i>
Гемолитиз	-	V	-	-	-
Варолиз	-	+	-	-	-
Глушина	-	+	-	-	-
Свободная аммиака	-	+	V"	V	+
Воспаление индикатора	-	+	+(>18ч)	+(<1ч)	+(>18ч)
Воспаление индикатора	-	-	-	V	-
Окисление	+	+	+	+	-
Глушина	-	+	+	-	-
Свободная аммиака	-	+	-	-	-

V - положительная реакция; - отрицательная реакция; v - варьирующий признак;
 "+" штаммы, выделенные от лошадей положительные, от овец - негативные

Таблица 63 - Дифференциация *C. renale*, *C. pilosum*, *C. cystitidis*

Признаки	<i>C. renale</i>	<i>C. pilosum</i>	<i>C. cystitidis</i>
Цвет колоний	Желтый	Желтый	Беловатый
Время появления макроскопически видимых колоний при 37° С	24	24 ч	48 ч
Воспаление кислоты из:			
Лактозы	-	-	+
Глюкозы	-	+	+
Редукция нитратов	-	+	-
Воспаление казеина	+	-	-
Глушина при 80	-	-	+
Рост в бульоне с pH 5,4	+	-	-

Таблица 64 - Дифференциальные признаки видов коринебактерий

Признаки		C. diptheriae	C. pseudotuberculosis	C. xerosis	C. pseudodiphtheriticum	C. kurttscheri	C. minutissimum	C. striatum	C. renale
Гидролиз	эскулина	-	-	-	-	-	нд	-	-
	гиппурата	-	-	+	+	+	+	+	+
	желатина	1	X	-	-	-	-	X ²	-
Уреаза		1	+	-	+	+	-	-	+
Фосфатаза		-	-	-	-	-	+	+	-
Расщепление тирозина		-	-	-	-	+	нд	+	-
Метилрот		+	+	-	-	-	-	+	-
Расщепление казеина		-	-	o	o	-	-	-	+
Редукция нитратов		+	X	+	+	+	-	-	o
Образование кислоты из:	глюкозы	+	+	+	-	-	+	+	+
	арабинозы	+	X	-	-	-	нд	-	-
	ксилозы	-	-	-	-	-	-	-	-
	рамнозы	+	-	-	-	-	НД	-	-
	фруктозы	+	+	+	-	+	+	+	+
	галактозы	+	+	+	-	-	нд	4 X	-
	маннозы	+	+	4 X	-	+	X	+	+
	лактозы	-	-	-	-	-	-	X	-
	мальтозы	+	+	5	-	+	+	+	X
	сахарозы	5	X	+	-	+	+	5	-
	трегалозы	1	5	5	-	X	-	X	X
	раffinозы	X	-	-	-	-	-	-	-
	салицина	+	-	+	-	+	нд	-	-
декстрина	+	X	-	-	+	нд	+	+	
крахмала	X	-	-	-	+	-	+	-	

Признаки									
	C. pubosum	C. mucroides	C. matruchoffii	C. flavescens	C. vitrumen	C. glucanicum	C. callusae	C. brevis	C. parvumetabolium
	11	12	13	14	15	16	17	18	19
аскулина	+	+	+	нд	+	+	+	+	+
гиппурата	+	нд	+	-	-	+	+	+	-
желатина	-	-	-	-	-	-	-	-	-
недифференцируемая	+	-	х ¹	-	+	+	+	+	-
расщепление крахмала	-	нд	нд	нд	нд	нд	нд	+	-
гидролиз крахмала	-	-	-	+	+	+	+	-	-
расщепление крахмала	-	нд	нд	нд	нд	-	-	-	-
редукция азотистых соединений	+	-	+	-	+	+	-	-	-
глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	+	-
арабинозы	-	-	-	-	нд	-	-	х	-
ксилозы	-	-	-	-	нд	-	-	-	-
галактозы	-	нд	-	-	нд	-	-	-	-
фруктозы	+	нд	+	+	+	+	+	+	-
галактозы	-	-	-	+	+	-	-	+	-
маннозы	+	-	+	+	+	+	+	-	-
лактозы	-	-	-	-	-	-	-	х	-
мальтозы	-	-	+	-	+	+	+	-	-
сахарозы	-	нд	+	-	+	+	+	-	-
трисахарозы	+	х	-	-	+	+	+	х	-
полифинозы	-	-	5 х	-	нд	-	-	-	-
ванилина	-	нд	+	-	+	-	+	-	-
декстрина	+	-	+	-	нд	-	-	х	-
крахмала	+	нд	5	-	-	-	-	-	-

¹ Исключение — тип ulcerans; ² около 50% штаммов положительны; ³ тип ulcerans может быть отрицательным; ⁴ некоторые штаммы отрицательные; ⁵ некоторые штаммы положительные; нд — нет данных; х — 11-89% штаммов положительные.

Приготовление раствора гипосульфита натрия. Раствор готовят на стерильной дистиллированной воде. После добавления каждого ком-

понента среду тщательно перемешивают и, не стерилизуя, разливают по чашкам Петри. До использования среду можно хранить при 10°C не более 3-4 суток.

Среда предназначена для дифференциации возбудителя дифтерии и дифтероидов. Коринебактерии дифтерии образуют колонии черного цвета, т.к. способны продуцировать сероводород из цистина, взаимодействующий с солью теллурита. *C. diphtheriae* var. *gravis* на этой среде образует мелкие, выпуклые, блестящие, черные колонии. Среда обладает селективными свойствами, посторонняя микрофлора растет слабо.

Теллуровая среда Клауберга II. К 1000 мл расплавленного 3% питательного агара прибавляют 3 мл 2%-ного раствора теллурита калия, 10 мл глицериновой смеси и 50 мл «лаковой крови». Среду разливают по чашки Петри (используют не более 3-4 суток) и хранят при $4-10^{\circ}\text{C}$. Коринебактерии дифтерии типа «gravis» образуют серовато-черные колонии с несколько изрезанными краями, типа «mitis» — мелкие, с ровными краями серовато-черные блестящие колонии.

Приготовление «лаковой крови». К 3 мл стерильной дистиллированной воды добавляют 16 мл дефибринированной крови крупного рогатого скота, добавляют 20 мл химически чистого стерильного глицерина. Смесь выдерживают в холодильнике 3-6 недель.

Кровяной теллуровый агар. К 100 мл расплавленного и охлажденного до $45-50^{\circ}\text{C}$ питательного агара (рН 7,6-7,8) добавляют 10 мл дефибринированной крови лошади или крупного рогатого скота, 2 мл 2%-ного раствора теллурита калия (K_2TeO_3). Полученную среду перемешивают и разливают в чашки Петри. Колонии дифтерийных бактерий на этой среде имеют черный цвет или черный центр колонии, дифтероидов — мелкие, выпуклые, влажные, серого цвета, с коричневым центром, ложнокоринебактерийных бактерий — мелкие серые, с коричневым центром, непрозрачные.

Среда Пергола. Используют как среду обогащения для выделения коринебактерии дифтерии. Из куриного яйца стерильно извлекают желток и переносят его в колбу с бусами и добавляют 100 мл стерильной сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота, 1 мл 2%-ного раствора теллурита калия; тщательно перемешивают. Полученную смесь разливают по 2-3 мл в стерильные пробирки и прогревают 1 ч в водяной бане при 56°C . Затем для контроля стерильности выдерживают 48 ч в термостате при 37°C . На этой среде дифтерийные бактерии формируют через 15 ч инкубирования светло- или темно-серые влажные колонии.

Жидкая среда для дифтерийных микробов. К 400 мл стерильного бульона (рН 7,6), содержащего 10% сыворотки лошади или крупного

того скота, добавляют 75 мл «лаковой крови», 20 мл 1%-ного раствора теллуриата калия, 12,5 мл глицериновой смеси и 12,5 мл 1%-ного цистина.

Ацетатно-теллуритовый бульон для дифтерийных микробов. В колбе смешивают 200 мл МПБ (рН 7,4), 2 мл глицерина, 18 мл 50%-ного раствора пептона Витте и 0,63 мл 50%-ного раствора ацетата натрия. Среду стерилизуют текучим паром в течение 1 ч, охлаждают до 48° С и добавляют 10 мл 1%-ного раствора теллуриата калия и 21 мл дефибринированной крови барана.

Желточно-молочно-агаровая среда. К 1000 мл 4%-ного агара на корнеловском бульоне или МПБ (рН 7,6-7,8) добавляют 10 куриных яиц, эмульгируют и вносят 800 мл обезжиренного, стерильного молока. Компоненты перемешивают, готовую среду разливают по стерильным пробиркам, скашивают и дважды по 1 ч прогревают в аппарате Коха при 80° С.

Среда Пай. В колбе смешивают 1000 мл содержимого куриных яиц и 500 мл дистиллированной воды, взбивают, фильтруют через двойной слой марли, добавляют 120 мл глицерина, 5 г декстрозы, перемешивают, разливают по стерильным пробиркам, скашивают и стерилизуют как свернутую сыворотку (см. среда Леффлера).

Индикаторная среда III для дифтерийных бактерий. К 420 мл 1%-ного питательного агара добавляют 12,5 мл 1%-ного раствора цистина, 1,5 мл 50%-ного раствора ацетата натрия, 880 мл 1%-ного раствора теллуриата калия. Устанавливают рН 8,0 и вносят 60 мл 2%-ного раствора индикатора водного голубого. В нагретую до 50-55° С среду добавляют смесь следующего состава: 280 мл дистиллированной воды, 21 мл глицериновой смеси (см. среда Клауберга II), 15 г глюкозы, 140 мл дефибринированной крови (рН смеси 7,0). После перемешивания среду разливают в чашки Петри.

Сывороточная среда Леффлера. Рекомендуется для выращивания патогенных нейссерий, коринебактерии. Смешивают 750 мл сыворотки крови овцы, 250 мл МПБ (рН 7,0), 2,5 г декстрозы, 1,25 г натрия хлорида. Среду разливают в пробирки и свертывают в скошенном положении при 80° С 3 дня по 2ч в аппарате Коха или в сушильном шкафу при 70° С 3 дня по 1 ч.

Лабораторная диагностика актиномикоза

Большинство видов бактерий рода *Actinomyces* патогенны для животных и человека. Основные патогенные виды следующие: *A. bovis* — возбудитель актиномикоза крупного рогатого скота, естественной сре-

дой обитания предположительно являются слизистые ротовой полости или кишечника; *A. suis* вызывает у свиней актиномикоз молочной железы; *A. israelii* — основной возбудитель актиномикоза человека, может быть причиной эндометритов, цервицитов и конъюнктивитов, ассоциируется с актиномикозом крупного рогатого скота и свиней, естественное место обитания — ротовая полость, слизистые кишечника людей; *A. pyogenes* — вызывает гнойные процессы у животных, в том числе маститы и перитониты у свиней, естественной средой обитания являются слизистые оболочки; *A. viscosus* — возбудитель актиномикоза собак; *A. hordeovulneris* — вызывает у собак абсцессы, плевриты, перитониты, артриты. **Лабораторная диагностика** болезней, вызываемых перечисленными видами бактерий, основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является гной, экссудат, содержимое абсцессов, пораженные лимфатические узлы. Тканевый материал в случае необходимости консервируют в 30%-ном водном растворе глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала

При диагностике болезней, вызываемых *A. bovis* и *A. viscosus*, существенное диагностическое значение имеет микроскопия зернистых граммоподобных «друз», обнаруживаемых в гное или экссудате. С указанной целью (экссудат) помещают в чашку Петри, разводят небольшим количеством дистиллированной воды, находят зеленовато-желтые (*A. bovis*) или белые (*A. viscosus*) зернышки, т.н. «друзы». Зернышки промывают в дистиллированной воде, помещают на предметное стекло в каплю 10%-ного раствора NaOH или KOH и выдерживают 15 минут или несколько минут догревают над пламенем горелки. Далее на препарат наносят водный раствор глицерина (50%-ный), накрывают его покровным стеклом и изучают под малым и большим увеличением микроскопа. Скопления клеток возбудителя имеют гомогенный центр из переплетенных палочковидных клеток, к периферии булавовидно утолщающихся. При окраске по Граму центр «друзы» окрашивается грамположительно, периферия — грамотрицательно.

В препаратах, содержащих в материале *A. pyogenes*, находят овальные, очень полиморфные грамположительные палочковидные бактерии размером 0,5-2,0 x 0,2-0,3 мкм, располагающиеся беспорядочно.

A. hordeovulneris имеют морфологию, типичную для рода, — нитевидные вытянувшиеся, реже короткие дифтероидные формы.

Выделение и идентификация патогенных видов рода *Actinomyces*

Культивирование. Посев исследуемого материала производят на кровяной агар (кровь овец, крупного рогатого скота). Посевы материала, предположительно содержащего *A. bovis*, культивируют в аэробных условиях в атмосфере 10% CO_2 ; *A. hordeovulneris* растет в аэробных и анаэробных условиях с содержанием в атмосфере 10% CO_2 . *A. pyogenes* и *A. viscosus* растут в аэробных условиях с 10% CO_2 . Контаминированный материал высевают на селективные среды (см. «Питательные среды»). Для выделения *A. israelii* из контаминированного материала на неселективных средах следующую его предварительную обработку. Материал суспендируют в транспортной среде Syed: раствор 1-0,6% раствор KH_2PO_4 , раствор 2-1,2% раствор NaCl , 1,2% раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6% раствор KH_2PO_4 , 0,25% раствор MgSO_4 . Готовая среда содержит 75 мл раствора №1, 75 мл раствора №2, 10 мл 1М раствора этилендиаминотетраацетата, 20 мл свежего 1%-ного раствора дитиотреитола, 5 мл 8%-ного раствора Na_2CO_3 , 1 мл 1%-ного раствора резазурина, 814 мл дистиллированной воды, pH 8,0. Среду стерилизуют фильтрацией. Исследуемый материал суспендируют в транспортной среде. 1 мл суспензии смешивают с 1 мл толуола и встряхивают 20 минут. Водную фазу отсасывают пипеткой, добавляют к ней 10 мл транспортной среды, центрифугируют и осадок высевают на неселективные питательные среды.

Эффект обработки основан на ингибирующем действии толуола на грамотрицательные бактерии. Посевы культивируют при 36-37° С от 2-4 до 14 дней.

Особенности роста актиномицетов на питательных средах. *A. bovis* на плотных питательных средах образует нитевидные микроколонии через 24 часа; позднее — макроколонии диаметром около 2 мм, непрозрачные, белые, серо-белые, кремово-белые, шероховатые или гладкие, без зоны гемолиза, мягкой консистенции. Рост медленный, типичные колонии формируются к 14-15 дню культивирования. Возбудитель хорошо растет (диффузно) в тиогликолатном бульоне к 7-10 дню инкубирования.

A. pyogenes. Нитевидных микроколоний не образует, через 48 часов инкубирования формирует колонии размером около 1 мм с узкой зоной

β-гемолиза, выпуклые, с ровными краями, непрозрачные, белые или розово-белые, гладкие, мягкой консистенции.

A. viscosus формирует колонии двух типов: 1-й тип — крупные, толстые, блестящие, выпуклые; 2-й тип — маленькие, шероховатые, вильной формы.

A. hordeovulneris. Первоначально образует нитевидные микроколонии, позднее (14 дней культивирования) формируются колонии размером около 2 мм, приподнятые, с волнистым краем, с нитевидными отростками, непрозрачные, белые, серо-белые, кремово-белые, шероховатые, сухие или мягкой консистенции, обычно без зоны гемолиза.

A. suis. Образует колонии размером до 2 мм, гладкие, непрозрачные, выпуклые, центр может иметь углубление. края волнистые с отростками, белого или серо-белого цвета. Колонии могут быть шероховатыми или гладкими, сухими или мягкими.

A. israelii. Образует нитевидные микроколонии на плотных средах. На 14-й день — макроколонии R-формы, диаметром около 2 мм, выпуклые, центр может иметь углубление, края волнообразные и нитевидные, непрозрачные, белого, серо-белого, кремово-белого цвета, по консистенции сухие, крошкообразные или мягкие.

Морфология клеток актиномицетов в культуре. Морфология клеток в культуре у ряда актиномицетов отличается от таковой в исследуемом материале.

A. bovis. В препаратах, окрашенных по Граму, клетки имеют форму грамположительных палочек, коккобактерий, палочек с утолщенными или разветвляющимися концами, могут присутствовать нити различной длины.

A. pyogenes. В препаратах находят типичные для рода полиморфные грамположительные палочки.

A. viscosus. В мазках из крупных колоний обнаруживают грамположительные дифтероидные палочковидные клетки, в мелких колониях — тонкие ветвящиеся нити.

A. hordeovulneris. Морфология клеток в препаратах типична для рода.

A. suis. В препаратах находят типичные грамположительные палочки дифтероидной формы, иногда кокковидной, а также V, Y или T-формы, короткие или длинные нити, ветвящиеся формы.

Идентификация представителей рода *Actinomyces* на уровне вида. Начальные этапы идентификации предполагают в первую очередь дифференциацию видов рода *Actinomyces* от родов *Nocardia*, *Streptomyces*, *Dermatophilus*. При этом у выделенных культур определяют: наличие

к каталазную активность, подвижность, кислотоустойчивость клеток, рост на грибных средах, наличие воздушных гиф, образование спор, фрагментацию гиф наличие запаха у колоний, тип утилизации углеводов (окислация, ферментация в тесте Хью - Ляйфсона).

На основании перечисленных признаков для дальнейшего изучения отбирают культуры бактерий, типичные по морфологическим, гинкторическим и культуральным свойствам для *Actinomyces*, растущие в анаэробных или капнофильных (CO_2) условиях атмосферы, не имеющие запаха, дающие отрицательную (чаще) или положительную (реже) реакцию на каталазу, не проявляющие при окраске по модифицированному методу Циля — Нильсена кислотоустойчивоеTM, не растущие на средах для культивирования грибов, не образующие воздушных гиф, спор, не проявляющие склонности к фрагментации нитей (гиф), расщепляющие углеводы (глюкоза) в тесте Хью — Ляйфсона путем ферментации.

Таблица 65 - Родовые признаки *Actinomyces*

Признаки	<i>Actinomyces</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Dermatophilus</i>
Восприимчив к кислороду	Анаэробы или капнофилы	Строгие аэробы	Аэробы	Аэробы/ капнофилы
Каталаза	-(+)	+	+	+
Кислотоустойчивость при окраске по модифицированному методу Циля — Нильсена	-	+	-	-
Подвижность	-	-	-	+ (зооспоры)
Рост на декстрозном агаре (культуры)	-	+	+	-
Воздушные гифы	-	+	+	-
Споры	-	+(конидии)	+(конидии)	+(зооспоры)
Фрагментация гиф (нитей)	-	+	+	+
Запах в культуры	+	-	Острый, почвенный	-
Метаболизм	Ферментация	Окислация	Окислация	Слабая ферментация
Локализация	Слизистые рта и носоглотки	Почва	Почва	Больные и животные-носители

Ветеринарное значение	Локальные и системные болезни, характеризующиеся образованием гранул на коже, подкожной и в органах	Не патогенны	Выявление и диагностика
-----------------------	---	--------------	-------------------------

+ положительная реакция; - отрицательная реакция; - (+) преимущественно негативная реакция

Идентификация представителей рода *Actinomyces* на видовом уровне. У выделенных культур, отвечающих родовым признакам *Actinomyces*, изучают с целью определения их видовой принадлежности более широкий круг ферментативных свойств.

Таблица 66 - Свойства основных патогенных для животных видов рода *Actinomyces*

Признаки	Вид			
	<i>A. bovis</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. hordeovulgaris</i>
Наличие гранул в гносе	Зелено-желтые гранулы (друзы)	Серо-белые гранулы (друзы)	-	-(+)
Обнаружение при микроскопии мазков из исходного материала	Нити, ветвящиеся формы, реже дифтерийные формы	Аналогично <i>A. bovis</i>	Короткие дифтерийные формы	Аналогично <i>A. bovis</i>
Отношение к кислороду	Анаэроб-капнофил	Аэроб-капнофил	Аэроб-капнофил	Аэроб-капнофил и анаэроб-капнофил
Образование ката-	-	+ (слабая реакция)	-	+ (слабая реакция)
САМР-тест с <i>S. aureus</i>	-	-	+	-
Разжижение сывортки в среде Леффлера	-	-	+(Через 24-48 ч)	-

Биопроба. Заражение лабораторных животных в диагностике болезней этой группы обычно не применяют. *A. pyogenes*, например, проявляет слабую и вариабельную патогенность. При подкожном заражении *A. pyogenes* у животных развиваются подкожные абсцессы, интраабдоминальным или внутривенным — возможен летальный исход.

Питательные среды

Питательные среды и условия культивирования актиномицетов выбирают с учетом отношения конкретного вида к молекулярному кислороду, потребности в сыворотке крови и некоторых ростовых факторах

Сердечно-мозговой бульон (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют мозгового отвара (сухой) — 12,5 г, сердечного отвара — 5,0 г, протеозопептона — 10,0 г, декстрозы — 2,0 г, натрия хлорида — 5,0 г, двунаатриевого фосфата — 2,5 г. Устанавливают рН 7,4, стерилизуют при 121° С 15 минут.

Сердечно-мозговой агар. Готовят на основе сердечно-мозгового бульона, добавляя 2% агара. Среды пригодны для культивирования *A. Israeli* и *A. bovis*.

Слапок Дох-агар (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют натрия нитрата — 2,0 г, калия хлорида — 0,3 г, железа сульфата — 0,35 г, калия сульфата — 0,35 г, сахарозы — 30 г, агара — 12 г. Стерилизуют при 115° С 20 минут, рН 6,8. Данная синтетическая среда рекомендуется для культивирования актиномицетов.

Мальтозный (глюкозный) агар Сабуро. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют мальтозы (или глюкозы) — 4 г, пептона — 1 г, агара — 1,8 г. Среду фильтруют, разливают по колбам, пробиркам и стерилизуют при 110° С 15 минут. Для культивирования актиномицетов можно применять кровяной агар, среду Леффлера, тиогликолевые среды и среды, предназначенные для культивирования анаэробов, не содержащие специальных селективных добавок. Например, агар и бульон Шадлера (см. «Питательные среды для культивирования клостридий»). Во всех случаях надо учитывать, что *A. pyogenes* лучше растет на средах с кровью (сывороткой крови) и утилизируемыми углеводами, *A. khordeovulneris* — на средах с 15-20% фетальной сыворотки. Для изоляции ряда актиномицетов применяют питательные среды с селективными добавками.

Среда Бейгтона и Колмана. Состав питательной среды: сердечно-мозговой бульон — 3,7 г, дрожжевой экстракт (порошок) — 0,5 г, поливинилпироллидон — 1,0 г, цистеин солянокислый — 0,1 г, агар — 1,5 г, вода дистиллированная — 100 мл. Компоненты растворяют, стерилизуют при 115° С 30 минут, охлаждают до 45° С и вносят 5 мл стерильной сыворотки крови кролика. Затем к 100 мл готовой питательной среды добавляют 1 мл раствора NaF (25 мг/мл), 0,5 мл стерильного раствора колицина сульфата (1 мг/мл). Эти растворы предварительно стерилизуют. Среду используют для культивирования оральных актиномицетов.

Среда Колмана и Лоше. В качестве основы используют обогащенную плотную среду. К основной среде добавляют метронидазола — 10 мг/мл и кадмия сульфата — 20 мкг/мл. Кадмия сульфат стерилизуют автоклавированием вместе с основной средой, метронидазол фильтруют

и вносят в среду на последнем этапе. Среда рекомендована для культивирования *A. viscosus* и *A. naeslundii*.

Лабораторная диагностика нокардиоза

В пределах рода *Nocardia* основным патогенным видом является *N. asteroides* — возбудитель нокардиоза крупного рогатого скота, собак и других видов животных. Вызывает легочной или системный кардиоз, опухолеподобные поражения в тканях, локальные кожные и подкожные поражения, хронические грануломатозные маститы у крупного рогатого скота, у собак часто наблюдаются пневмонии, инфильтраты вплоть до поражения центральной нервной системы. При кожном нокардиозе у крупного рогатого скота наблюдают грануломатозно-гнойное воспаление подкожной ткани и лимфатических сосудов. У свиней вызывает пневмонии, маститы и лимфадениты, у кроликов — подкожные грануломатозные абсцессы или/и гнойно-грануломатозные поражения грудной полости. Как патогенный вид этого рода также известен *N. brasiliensis*, но он имеет распространение в Центральной и Южной Америке. Патогенны некоторые штаммы *N. farcinica*. Лабораторная диагностика покардиозов основана на выделении культуры возбудителя и идентификации.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является ткань из гранулом, в том числе и включенная в 10%-ный формалин для гистологического изучения, образцы молока при маститах, экссудат, гной.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают их по Граму для выявления кислотоустойчивости по модифицированному методу Циля—Нильсена. Молоко предварительно центрифугируют, препарат делают из осадка. При микроскопии окрашенных по Граму препаратов в положительных случаях обнаруживают грамположительные нитевидной ветвящейся формы, палочки, кокки. В мазках, окрашенных по модифицированному методу Циля—Нильсена, находят аналогичные структурные элементы, но красного цвета. В гистологических препаратах из гранулом находят микроколонии возбудителя, состоящие из нитевидных ветвящихся грамположительных нитевидных форм.

Выделение и идентификация патогенных видов рода *Nocardia*

Культивирование. Посев материала проводят на кровяной агар, сердечно-мозговой кровяной агар, декстрозный агар Сабуро. Культивирование проводят при 25- 27° С в течение 7 суток в аэробных условиях.

N. asteroides обычно формирует колонии на кровяном и сердечно-мозговом агарах на 4-5-е сутки культивирования, на агаре Сабуро — несколько позднее. Колонии диаметром 1-2 мм прочно соединены с питательным субстратом. Цвет колоний от белого до желтовато-розового, розового или темно-оранжевого, с редким воздушным мицелием. На колонии *N. asteroides* весьма похожи колонии непатогенных видов рода *Streptomyces*. Образующиеся воздушные гифы можно обнаруживать микроскопией. Обычно на воздушных, реже на вегетативных конидиях могут наблюдаться короткие и длинные цепи конидий.

Морфология клеток нокардий в культуре. Из подозрительных культур готовят мазки, которые окрашивают по Граму и модифицированному методу Циля-Нильсена. В положительных случаях находят грамположительные нити, распадающиеся со временем (2-7 суток) на палочковидные формы и коккобактерии. В мазках из молодых культур, окрашенных по Цилю-Нильсену, находят ветвящиеся клетки красного цвета.

Идентификация нокардий на уровне рода. Дифференциацию нокардий от сходных видов родов *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Dermatophilus* проводят после определения признаков, представленных в таблице 59 (см. «Лабораторная диагностика актиномикоза»). К нокардиям относят культуры, типичные по морфологии колоний, клеток для рода *Nocardia*, являющиеся строгими аэробами, обладающие каталазной активностью, растущие на декстрозном агаре Сабуро, имеющие на колониях воздушные гифы, образующие споры (конидии), проявляющие склонность к фрагментации нитевидных структур на палочковидные и кокковидные формы, расщепляющие в тесте Хью-Ляйфсона глюкозу путем оксидации (в аэробных условиях), а также при отсутствии острого специфического запаха у культур.

Идентификация нокардий на уровне вида. При наличии у животных характерных для нокардиоза патологоанатомических изменений и выделении культур, типичных по вышеперечисленным признакам для нокардий, диагноз, в принципе, может быть установлен. Определенные затруднения представляет дифференциация кроличьего нокардиоза от актиномикоза. Лабораторные критерии дифференциации возбудителей представлены в таблице 67.

Питательные среды

Культивирование этой группы микроорганизмов не представляет трудностей. Для их выделения из патологического материала можно использовать теллуритовую среду, декстрозный агар Сабуро, сывороточный мозговой агар и среду Левенштейна-Иенсена. Для подавления посторонней микрофлоры рекомендуется при выделении *N. asteroides* добавлять питательную среду диметилхлортетрациклин (5 мкг/мл) или метициллин (10 мкг/мл) и противогрибные антибиотики.

Таблица 67 - Дифференцирующие признаки видов *Nocardia*

Признаки	<i>N. amarae</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brevicatena</i>	<i>N. caviae</i>	<i>N. farcinica</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. ohrifideovulvati</i>	<i>N. pinensis</i>	<i>N. sp.</i>
Разложение										
Казеина	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Эластина	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Эскулина	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Гипоксантин	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Тестостерона	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Тиозина	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ксантина	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Рост за счет использования как единственного источника углевода (% масс. углевода)										
Алонитола (1,0)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Г-ялпбиозы (1,0)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Мезоинозитола (1,0)	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
D-маннитола (1,0)	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-
L-рамноза (1,0)	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Ацетиловой к-ты (0,1)	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-
Изобутанола	-	-	d	-	+	+	+	-	-	-
Пемслиновой к-ты (0,1)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Себациловой к-ты (0,1)	+	+	-	-	d	d	+	+	-	-
Образование										
Кислой фосфатазы	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
α-эстеразы	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
(3-эстеразы	-	-	+	-	+	+	+	d	-	-
Нитратредуктазы	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Уреазы	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Устойчивость к лизоциму	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

11-89% штаммов положительные.

Лабораторная диагностика бруцеллёза

Род *Brucella* содержит шесть видов бактерий, из которых пять вызывают заболевания сельскохозяйственных и домашних животных. Для *B. abortus* основным хозяином является крупный рогатый скот; восприимчивы также овцы, козы, свиньи, лошади, человек. Вид подразделяется на девять биотипов, из которых биотипы 1 и 2 распространены повсеместно, третий - в Индии, Египте, Восточной Африке, пятый - в Германии и Британии, другие биотипы относятся к категории редко встречающихся. *B. melitensis* поражает овец и коз, также восприимчив крупный рогатый скот, человек. Этот вид бруцелл распространен везде, где разводят мелкий рогатый скот. *B. suis* включает четыре биовара, из которых первые три поражают свиней, а четвертый выделяют от северных оленей. Первый биотип распространен повсеместно, второй — в Центральной и Восточной Европе, третий — в США, Аргентине, четвертый (олений) — в критической зоне. *B. ovis* поражает овец, обуславливая эпидидимиты и спорадические аборт, распространен повсеместно в регионах овцеводства.

Основным хозяином для *B. canis* являются собаки, восприимчив также человек. *B. neotomae* выделяют в А от крыс; случаи изоляции этого вида бруцелл от других видов животных известны.

Согласно последней реклассификации представителей рода *Brucella* следует рассматривать как биовары *B. melitensis*: биовары *melitensis*, *suis*, *ovis*, *canis*, *neotomae* и *maris*. Биовар *maris* адаптирован к морским животным.

Лабораторная диагностика бруцеллеза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

В лабораторию направляют абортированный плод, плодные оболочки, селезенку, печень, желудок плода с перевязанным пищеводом и двенадцатиперстной кишкой, содержимое гигом, истечения из родовых путей. Истерию из матки берут в первые дни после аборта стерильным тампоном в области шейки матки. Пробы крови берут строго асептически с помощью шприца в количестве 50 мл и сразу же высевают в жидкую питательную среду. Мочу получают с помощью катетера. При исследовании на инфекционный эпидидимит в лабораторию направляют от баранов пораженные предстательки, семенники, предстательные железы, у овцематок берут истече-

ния из родовых путей, абортированные плоды. Если животное убито с диагностической целью, то исследуют половые органы, лимфатические узлы, Паренхиматозные органы. Если в течение 1-1,5 суток материал доставить в лабораторию нельзя, его консервируют в 4-5-кратном объеме 30%-ного глицерина.

Пробы молока (последние порции) отбирают в пробирки с резиновыми пробками и исследуют в день взятия пробы или консервируют добавлением гепцианвиолета (конечная концентрация 1:25 000) или борной кислотой (1%). В консервированном таким способом материале бруцеллы сохраняют жизнеспособность до 10 суток. У мелкого рогатого скота молоко можно брать пункцией у основания соска в цистерну вымени. При недостатке молока на долю вымени надавливают рукой.

Молоко для кольцевой реакции (КР) берут в виде сборной пробы каждой доли вымени в общем объеме 10-15 мл. Пробы молока на КР берут из каждой отдельной емкости. Молоко исследуют в КР в свежем виде, или, в случае необходимости, его консервируют путем добавления к 5 мл молока одной капли 10%-ного формалина. Нельзя исследовать молоко с повышенной кислотностью (30° по Тернеру и более); от животных больных маститом; в первые две недели после родов. Сыворотку для серологических исследований получают методом отстаивания, допустимо консервирование фенолом (1 капля 5%-ного фенола на 1 мл), сульфидной кислотой (2-4% от объема сыворотки), однократным замораживанием («Наставление по диагностике бруцеллеза животных», 2000).

Микроскопическое исследование исходного материала

Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают их по Граму и одним из специальных методов (по Козловскому, Стампу и т.д.), а также бруцеллезными люминесцирующими сыворотками.

В препаратах, окрашенных по методу Грама, бруцеллы имеют форму мелких, коротких, коккоподобных или палочковидных грамотрицательных бактерий, размером 0,5-0,7х0,6-1,5 мкм, истинной капсулы не имеют, расположены одиночно, реже — парами, короткими цепочками, небольшими группами.

Для бруцелл характерно более медленное окрашивание и отрыв от стекла при промывании водой или обработке слабыми растворами щелочи по сравнению с другими видами бактерий, что позволило ряду авторов предложить дифференциальные методы окраски клеток возбудителя.

Окраска бруцелл по Е.В. Козловскому. Мазок фиксируют азотной кислотой, окрашивают 2%-ным водным раствором сафранина 2 минуты.

догреванием до появления пузырьков, затем промывают водой и докрашивают 0,75-1%-ным водным раствором бриллиантовой зелени (или метиленового синего) в течение 1-2 минут, споласкивают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы — ярко-красные, другие бактерии — зеленого или синего цвета.

Окраска бруцелл по Стампу (модифицированный метод Циля-Тильманса). Мазок фиксируют на пламени, окрашивают фуксином Нейффера в течение 10 минут, промывают водой, обрабатывают 30 секунд 0,5%-ным водным раствором уксусной кислоты, промывают водой, окрашивают 20-30 секунд 1%-ным водным раствором метиленового синего, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы — красные, прочие бактерии имеют синий цвет.

Окраска бруцелл по Кюстеру. Препарат фиксируют на пламени, окрашивают 60 секунд щелочным раствором сафранина, промывают водой, обрабатывают 15 секунд 0,05%-ным раствором серной кислоты, тщательно промывают водой, окрашивают 15-20 секунд 3%-ным водным раствором метиленового синего. Микроскопическая картина: бруцеллы — красные, другие бактерии синего цвета.

Приготовление щелочного раствора сафранина (ex tempore). Смешивают 5 капель 3%-ного водного раствора сафранина и 1,5 мл нормального раствора КОН (5,6 г на 100 мл воды).

Окраска бруцелл по Шуляку-Шин. Мазок фиксируют на пламени, окрашивают 2 минуты карболовым фуксином Циля, разведенным водой 1:3, промывают водой, окрашивают 5 минут 2%-ным водным раствором метиленового синего, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы — красные, другие бактерии имеют синий цвет.

Иммунолюминесцентное выявление бруцелл проводят прямым или непрямым способом.

Выделение и идентификация культур бруцелл

Будничивание. Обычно исследуемый материал засевают в пробирку с жидкой и в несколько пробирок (5-10) — с агаровой питательной средой (мясо-пептонный печеночный бульон, мясо-пептонный печеночно-глюкозный-глицериновый бульон, альбими-бульон, аналогичные агаровые среды, сывороточнокартофельный агар, сывороточно-крово-агар). Бруцеллы хорошо растут на кровяном агаре (5-10%). Зараженный материал высевают на сывороточно-декстрозный агар с

ингибиторами (рекомендация Объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу): генцианвиолет 1:200 тыс. или кристаллический фиолетовый 1:100 тыс., уксуснокислый натрий (0,25 мг/мл) или ранитрофенилглицерин (0,005-0,007%).

Бруцеллы — аэробы или микроаэрофилы. Температурный оптимум 37°C, диапазон - 20-40°C, оптимум pH 6,6-7,4. Микроаэрофильные свойства проявляют *B. abortus* и *B. ovis*. Поскольку не известно, какой вид бруцелл присутствует в исследуемом материале от крупного рогатого скота, то половину пробирок с посевами инкубируют в условиях обычной атмосферы, вторую — в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (12%). Посевы при исследовании на наличие *B. ovis* инкубируют только в атмосфере CO₂. В первой генерации бруцеллы обладают замедленным ростом, поэтому посевы культивируют, периодически просматривая, в 30 дней. Подготовка и исследование различных материалов имеют некоторые особенности.

При исследовании абортированного плода производят посев тканей гомогената или пастеровскими пипетками непосредственно из органов. Посевы делают из экссудата грудной и брюшной полостей, содержимого желудка, крови сердца, печени, селезенки, легких. При посеве из паренхиматозных органов выбирают участки с фокусами некрозов, кровоизлияниями.

Для изготовления тканевого гомогената кусочки паренхиматозных органов обжигают, растирают в ступке со стерильным кварцевым песком в физиологическом растворе (1:10), гомогенат высевают на среды. Аналогичным образом подготавливают для посева материал, взятый при патогностическом убое животных.

При осмотре плаценты отбирают участки с утолщенными ворсинками и стенками, с наличием гнойного экссудата. Поверхность плаценты обрабатывают тампонами с дезинфектантами, просушивают стерильными тампонами, прижигают выбранный участок, вырезают необходимые фрагменты, измельчают, как было описано выше, и высевают на среды с ингибиторами.

Порции молока из каждой четверти вымени центрифугируют при 1000-3000 об/мин в течение 10-20 минут. Посев производят из осадка слоя сливок на селективные среды. Рекомендуется исследовать пробки молока, взятые от животного несколько раз с интервалом 5-10 суток.

Мочу (75-100 мл) перед посевом на питательные среды центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут и осадок высевают на селективные среды. Возможна концентрация бруцелл путем добавления к моче бруцеллезной агглютинирующей сыворотки (1-2%) с титром не менее

1000. После непродолжительного инкубирования мочу центрифугируют и осадок высевают на питательные среды.

Эффективен посев в жировые куриные яйца при исследовании крови, мочи и других материалов, содержащих малое количество возбудителя. Используют свежие куриные яйца (3-5 дней). На каждый материал берут 3-5 яиц. Исследуемый материал в количестве 0,2 мл вводят в желточный мешок, инкубируют при 37° С в течение пяти суток, вскрывают, набирают пастеровскими пипетками белок и желток и высевают на плотные и жидкие питательные среды (методика Одесского ИМ имени И.И. Мечникова).

Кровь высевают сразу после взятия в жидкие питательные среды с антикоагулянтом (2%-ный цитрат натрия). В 100 мл среды засевают около 20 мл крови. В качестве питательной среды используют бульон Альбани, триптозный бульон, среду Первушина, МПБ с 1% глюкозы и 2-3% глицерина. Хорошие результаты получаются при посеве на комбинированные среды (метод Кастанеда). Например, в колбе (пробирке) скашивают агар (ППГГА), добавляют какую-либо жидкую питательную среду, чтобы она покрывала половину поверхности агара, и в нее засевают кровь (П.А. Триленко 1976). Через 4-6 дней культивирования поверхность агара увлажняют жидкой средой и в последующем периодически просматривают с целью обнаружения колоний бруцелл.

Характер роста бруцелл на питательных средах. Колонии бруцелл появляются на поверхности плотных питательных сред на 5-10-е, реже — на 20-25-е сутки. В первичных посевах формируются, как правило, колонии S-формы: бесцветные, круглые, выпуклые, с ровными краями, гладкой маслянистой поверхностью, полупрозрачные, диаметр колоний в зависимости от типа питательной среды от 0,1-0,7 до 2,0-2,5 мм и более. По мере старения колонии теряют прозрачность, мутнеют и темнеют за счет накопления пигмента. На ППГГА в проходящем свете колонии имеют янтарный оттенок.

При изучении колоний в коспроходящем пучке света они имеют зеленовато-серо-голубой цвет с небольшим красновато-желтым центром.

При исследовании материала от животных с хроническим течением бруцеллеза могут быть выделены бруцеллы в R-форме, отличающиеся не только по форме, но особенно по характеру свечения колоний.

В жидких питательных средах бруцеллы растут с равномерным помутнением среды, медленным появлением небольшого, голубоватого в проходящем свете пристеночного кольца или кольца и поверхностной пленки. На дне пробирки постепенно образуется рыхлый осадок.

Морфология и тинкториальные свойства клеток бруцелл в культуре. Из подозрительных колоний делают мазки, окрашивают по Граму, Козловскому. Клетки бруцелл в культуре не отличаются по морфологии от клеток возбудителя в исходном материале (см. выше), жгутиком не обладают.

Идентификация бруцелл на уровне рода. Принимают во внимание время появления макроскопически видимого роста, на питательных средах — потребность в CO_2 . Согласно действующему в РФ «Наставлению по диагностике бруцеллеза животных» (2000), при обнаружении в мазках бактерий, типичных по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам для бруцелл, проводят их серологическую идентификацию. Для целей серологической идентификации используют две точные агаровые культуры исследуемых бактерий и диагностические агглютинирующие R- и S-сыворотки. На предметном стекле в капле R-сывороток, физиологического раствора суспензируют бактериальной петлей испытуемую культуру. Для контроля R-сыворотки проверяют в разведении, указанном биофабрикой с роз-бенгал и цветным антигеном; S-сыворотки — в титре, указанном на коробке с цветным бруцеллезным антигеном и в неразведенном виде с роз-бенгал антигеном.

Если испытуемая культура дает положительную РА (два креста и более) с обеими или любой одной диагностической сывороткой и отрицательный результат с физиологическим раствором, то ее относят к бруцеллам.

Оценка результатов РА проводится при условии, что R- и S-сыворотки дают в контролях с гомологичными антигенами агглютинацию интенсивностью минимум на три креста, при отсутствии реакции с гетерологичными антигенами. Агглютинация с R-сывороткой происходит замедленно, с ней всегда реагируют культуры *B. ovis* и *B. canis*.

Для идентификации выделенной культуры на уровне рода также исследуют оксидазную, каталазную активность, наличие жгутиков, образование индола, уреазы, способность редуцировать нитраты, агглютинировать в бруцеллезной позитивной сыворотке, а также патогенность для лабораторных животных (см. «Биопробу»).

Бруцеллы не обладают подвижностью, образуют каталазу, оксидазу (кроме *B. ovis* и *B. neotomae*) и уреазу (кроме *B. ovis* и некоторых штаммов *B. melitensis*), редуцируют нитраты, не образуют индол.

Наставлением по диагностике бруцеллеза животных (2000) в РФ предусмотрено использование полимеразной цепной реакции.

Идентификация бруцелл на уровне вида и биовара. Критерии дифференциации видов и биоваров бруцелл представлены в таблицах.

Определение вида и биовара выделенной культуры бруцелл дает возможность более детально проводить эпизоотологический и эпидемиологический анализ.

Разработанные методы дифференциации видов бруцелл предполагают работу с бруцеллами в S-форме (кроме *B. ovis* и *B. canis*), поэтому перед проведением таких исследований проверяют популяцию на диссоциацию методом окраски колоний кристаллвиолетом по Уайту-Вильсону. Для этого готовят взвесь 48-часовой изучаемой агаровой культуры в стерильном физиологическом растворе концентрацией 0,5-1 млрд. микробных клеток в 1 мл по бруцеллезному стандарту мутности. Одну кашлю взвеси засеивают последовательно шпателем на поверхность агаровой среды в трех чашках Петри.

Посевы инкубируют 5 суток при 37-38°C. При таком методе посева на плотной среде вырастает достаточно большое количество изолированных колоний бруцелл. В чашки Петри с колониями осторожно пастеровской пипеткой наливают рабочий раствор кристаллвиолета тонким слоем. Через пять минут краситель осторожно отсасывают пипеткой и сливают в емкость с дезраствором. Затем колонии изучают при помощи стереоскопического микроскопа.

Диссоциированные колонии имеют цвет от темно-фиолетового до светло-синего, S-колонии окрашиваются в светло-желтый, реже — в светло-зеленый цвет. Для изучения отвивают несколько колоний в S-форме.

Таблица 68 - Дифференциация видов и биоваров рода *Brucella*

Цепочки	B. abortus биовары									B. canis	B. melitensis			R. peoloniae	B. ovis	B. suis			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		1	2	3			1	2	3	4
Средности и	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)					
Средности H.S.	+	+	+	+	-	(-)	(+)	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
Средности	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-1	+	+	+	+	+	
	+	-	+	+	+	+	+	+	(-)	+	+	+	-	(-)	(-)	-	+	(+)	
А	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	

Антиген- ная мо- носпеци- фически-	M	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

+ - все штаммы положительные;
 (+) - большинство штаммов положительно; (-) - большинство штаммов отрицательно; -- все штаммы отрицательны; 1) концентрация красителя 1:50 000 (масса/объем), для более четкой дифференциации биоваров 3 и 6 тионин вносят в концентрации 1:25 000, при этом биовар 3 растет, а биовар 6 - нет.

У культур бруцелл в S-форме изучают: лизис под действием бруцеллального фага, окисление ряда аминокислот, углеводов, потребность в CO₂, образование H₂S, уреазы, рост в средах с тионином, основным флуоресцентным агглютинацию с моноспецифическими сыворотками против антигенов M, R.

Определение потребности культур бруцелл первых генераций в CO₂. В эксикатор (другой герметически закрывающийся сосуд) в котором добавляют через газомер CO₂ до содержания 5 -10%, либо в сосуд помещают крышку чашки Петри с 0,35 г Na₂CO₃ на 1000 мл объема, а также крышку в наклонном положении помещают пробирку Флоринского с 0,35 мл HCl, сосуд закрывают и, наклоняя его, выливают кислоту, что обеспечивает накопление необходимого количества CO₂ в смеси. Параллельно культивируют посева в условиях обычной атмосферы. Некоторые биовары *B. abortus* могут не требовать CO₂ уже в первой генерации.

Определение образования сероводорода. Испытуемую культуру бруцелл выращивают на скошенном печеночном агаре в пробирке с пробкой-мажкой, пропитанной насыщенным водным раствором уксуснокислого свинца. Результаты учитывают через каждые два дня в течение 6 дней.

Оксидативный метаболизм. Испытуемые культуры выращивают на сывороточно-декстрозном агаре 48 часов, смывают фосфатным буфером Соренсена (рН 7,0), трехкратно отмывают центрифугированием и стандартизируют до концентрации, эквивалентной 0,9 мгN/мл по Кельману. Измерение поглощения кислорода проводят объемным респирометром с определением константы Варбурга. Поглощение кислорода выражают в виде микролитров на миллиграмм клеточного азота за час (QO₂N).

Обычно используют следующие субстраты: *α*-аланин, *α*-аспарагин, *α*-глутаминовая кислота, *α*-аргинин, *Δα*-цитруллин, *Δα*-орнитин, *α*-арабиноза, *D*-галактоза, *D*-глюкоза, *D*-рибоза, *D*-ксилоза, эритритол. Субстраты готовят в виде 10%-ных (вес/объем) растворов.

буфере Соренсена (рН 7,0), стерилизуют фильтрацией, хранят при -20°C . Ди-циструллин стерилизуют при 121°C 15 минут. CO_2/N объем вычисляют по методу Варбурга с коррекцией на эндогенное поглощение O_2 .

Определение способности к росту на питательных средах с фуксином и тионином. Используют Альбими-агар или триптозный агар с красителями в концентрации 1:50 000 или 1:25 000. Красители в виде 0,1%-ных растворов кипятят в водяной бане в течение 20 минут и затем добавляют в необходимом количестве к расплавленному стерильному агару. Засеянные культурами Чашки Петри инкубируют при 37°C в атмосфере 5-10% CO_2 в течение 4 дней. В качестве контроля на среды высевают эталонные штаммы бруцелл определенных видов. Среды хранят в холодильнике не более 10-15 дней. Обесцвеченные среды использовать нельзя.

Определение уреазной активности. Рекомендуется проводить на среде Кристенсен с инкубацией при 37°C , считывая результат через 0,5 - 1, 2, 3, 4 - 5 и 24 часа. На среду засевают одну бактериологическую петлю вынужденной культуры. Результат считается отрицательным, если уреазная активность не проявляется в течение 24 часов. Культуры *B. suis*, *B. canis* и *B. neotomae* изменяют среду в течение 15 минут. Большинство штаммов *B. abortus*, *B. melitensis* дают позитивную реакцию в интервале 1-24 часа инкубации. Культуры *B. ovis* — уреазонегативные.

Испытание культур бруцелл в РА с моноспецифическими сыворотками (M, A, R). Моноспецифические сыворотки получают отдельной иммунизацией кроликов соответствующими эталонными штаммами бруцелл с последующей перекрестной адсорбцией агглютининов этими штаммами.

Густую суспензию испытуемой культуры бруцелл (~ 2 млрд. мк./мл.), выращенной в течение 48 часов на сывороточно-декстрозном агаре, прогревают при 60°C в течение часа в 0,5%-ном феноло-солевом растворе, смешивают каплю суспензии и каплю моноспецифической сыворотки. Результат учитывают через минуту. Эти исследования необходимо проводить с параллельным контролем в виде антигенов из эталонных штаммов *B. abortus* (1-й биотип), *B. melitensis* (1-й биотип), *B. ovis* и *B. canis*.

В определенных ситуациях возникает необходимость дифференциации вакцинного штамма *B. abortus* N19 от эпизоотических штаммов этого вида бруцелл. В дополнение для этой цели предлагается исследование способности к росту на агаре, содержащем тионин (2 мг/мл), на агаре с триптолом (1 мг/мл) и устойчивость к пенициллину при использовании

дисков с пенициллином (5 ЕД). Культуры вакцинного штамма *B. abortus* N19 не растут на средах с указанными концентрациями тизуина и эритритола и чувствительны к пенициллину, в отличие от промышленных штаммов.

Определение чувствительности к фагам. Тестируемые культуры должны быть в S-форме. Суспензию бруцелл готовят как для РА и засевают сплошным газоном на плотную питательную среду. Тв-фаги титруют в рутинном тесте разведения (RTD) и для титрования берут 10^6 и $10000 \times$ RTD. Также используют фаги репрезентативных групп 1-5 Cabel и Thomas. Отдельные капли фага (~0,25 мкл) наносят на поверхность сеянного агара, инкубируют при 37°C , учет проводят через 24 часа и далее с этим же интервалом.

Биопроба

Используют для обнаружения возбудителя в исследуемом материале проверки патогенных свойств выделенной культуры. Биопроба является достаточно чувствительным методом выделения бруцелл из материала, особенно если предполагается его контаминация посторонней микрофлорой, что достаточно вероятно при исследовании генитальных выделений, молока, сыра и т.д.

Наиболее восприимчивы к бруцеллезу морские свинки и белая крыса, но первые удобнее, так как у них легче брать кровь для серологических исследований. Морских свинок живой массой 350-400 граммов тщательно исследуют в РА в разведении сыворотки крови 1:5-1:40. Для опыта берут животных, не имеющих бруцеллезных антител. Вакцины проводят подкожно со стороны внутренней поверхности бедра. Вводят двух морских свинок. Тканевый материал измельчают в стерильном физиологическом растворе 1:10, удаляют грубые частицы путем центрифугирования (1000 об/мин, 5-7 минут), морской свинке вводят 1 мл осадочной жидкости. Молоко (20 мл) центрифугируют 10 минут при 1000 об/мин и вводят весь осадок и сливки двум морским свинкам. Держимое бурс, абсцессов вводят в дозе 1 мл.

У морских свинок исследуют кровь в РА через 15, 25 и 40 дней после заражения в разведениях 1:10-1:80. Положительная РА в разведении 1:10 и более свидетельствует о заражении. Положительно реагирующие животные убивают, регистрируют патологоанатомические изменения в печени, селезенке, лимфатических узлах, исследуют бактериологическими методами.

Серологическая диагностика

Основными тестами при массовых диагностических исследованиях являются пробирочная РА, РА на стекле (Роз-бенгал проба), РСК и РДСК, коагуляционная реакция с молоком, реакция диффузионной преципитации.

Пробирочная реакция агглютинации. Используют при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота, щец, коз, лошадей, буйволов, верблюдов, оленей, собак, пушных зверей и т.д. Реакцию проводят в объеме 1 мл. Сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов исследуют в разведениях 1:50-1:400; овец, коз, свиней, буйволов, оленей и собак — 1:25-1:200; пушных зверей и морских свинок — 1:10-1:80. При массовых исследованиях допускается постановка РА в двух первых разведениях, но при этом надо иметь в виду возможность феномена «прозрачности». Сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, собак, пушных зверей, верблюдов разводят 0,85%-ным раствором натрия хлорида с 0,5% фенола; сыворотки крови овец, коз и буйволов разводят 5%-ным, а сыворотки крови оленей — 10%-ным фенолизированным раствором натрия хлорида. Разведения сыворотки крови делают в объеме 0,5 мл, затем в каждую пробирку вносят 0,5 мл единого бруцеллезного антигена, разведенного 1:10, при этом разведения сыворотки крови удваиваются. Компоненты перемешивают встряхиванием и штатив с пробирками помещают в термостат при 37-38° С на 18-20 часов, затем выдерживают несколько часов при комнатной температуре и учитывают результат общепринятым способом (технику постановки и учета результатов РА см. в разделе «Серологические реакции»). В качестве контролей параллельно исследуют также анодому положительную и отрицательную сыворотки. РА при бруцеллезе крупного рогатого скота, лошадей и верблюдов считают положительной при титре 1:100 и более (1:50 — сомнительный результат), у овец, коз, оленей, буйволов и собак — 1:50 (1:25 — сомнительный результат). При получении сомнительных результатов сыворотки крови от этих животных исследуют через три-четыре недели повторно.

Помимо титра результаты пробирочной РА выражают в международных единицах (МЕ). В разных странах готовят антигены, различающиеся по активности, что приводит к несопоставимости титров РА. Поэтому была предложена международная стандартная бруцеллезная сыворотка, по отношению к которой определяют активность национальных антигенов. Активность стандартной сыворотки определена в 1000 МЕ/мл. Например, при исследовании этой сыворотки с определенным национальным антигеном она показывает в РА титр 1:500. Следовательно, если в РА с этим антигеном исследуют сыворотку крови от животного из хозяйства и получают титр РА 1:500, то она также содержит 1000 МЕ бруц-

еллезных антител, а вторая сыворотка, давшая титр 1:400, содержит в 400 : 500 = 800 МЕ и т.д. В настоящее время в странах разрабатывают национальные стандартные бруцеллезные сыворотки, соответствующие по активности международной сыворотке. В РФ в соответствии с «Наставлением по диагностике бруцеллеза животных» (2000) применяют следующие критерии оценки РА в МЕ. Реакцию считают положительной у невакцинированного крупного рогатого скота, верблюдов, лошадей и также иммунизированных неаг-глютиногенными вакцинами при уровне 200 МЕ антител (сомнительной — 50-100 МЕ); у овец и коз — 100 МЕ; оленей и собак — 50 МЕ; пушных зверей и морских свинок — 10 МЕ. Реакцию считают сомнительной у овец, коз, оленей, собак этой группы на уровне 25-50 МЕ. При сомнительных показаниях РА животных повторно исследуют через 15-30 суток. В случае повышения уровня антител животных признают больными, при отсутствии динамики — здоровыми. Выявление в стадах крупного рогатого скота, иммунизированного ранее аг-глютиногенными вакцинами, животных с уровнем антител не более 200 МЕ требует через 15-30 суток их повторное исследование. Если при повторном исследовании наблюдают повышение уровня антител, то животных признают больными. При отсутствии повышения дополнительно в последующие годы уточняют специфичность результатов РА.

При обнаружении в неблагополучных по бруцеллезу стадах крупного рогатого скота (ранее иммунизированного или не иммунизированного) животных с уровнем антител 100 МЕ и более их признают больными. Животных с уровнем антител 50 МЕ — результат РА сомнительный. В случае сомнительной РА животных исследуют через 15-30 суток повторно и при вторичном сомнительном результате животных признают больными.

При исследовании в РА невакцинированных баранов-производителей пробников, ярок, козлов, содержащихся в благополучных отарах, где проводилась иммунизация, РА оценивают как положительную при уровне антител 100 МЕ и более, сомнительной — 50 МЕ. В последующие годы животных через 15-30 суток исследуют повторно, и, если содержание антител не увеличилось, их признают здоровыми.

Роз-бенгал проба (РБП). РА на стекле с корпускулярным антигеном, окрашенным розовым бенгальским, используют для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота, овец, коз, лошадей, свиней, буйволов, верблюдов и северных оленей. Реакцию проводят на чистых, сухих иммунизированных пластинках с лунками при температуре не ниже 18°C. Порционные сыворотки в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки, затем в лунку равным объемом сывороткой помещают при исследовании крупного рогатого скота, коз,

деи, верблюдов и свиней 0,03 мл антигена, сывороток овец, коз, буйволов и северных оленей — 0,015 мл антигена. Компоненты должны иметь температуру не ниже 18°C.

Затем компоненты перемешивают в течение 4 минут, одновременно учитывая результат. В положительных случаях в течение указанного времени появляются розовые хлопья агглютината. В РБП исследуют неразведенные сыворотки, влияние нормальных антител нивелируется использованием кислого антигена со значениями рН, при которых нормальные антитела с низкой avidностью не реагируют с антигеном, что обеспечивает специфичность результата реакции. Перед началом исследований антиген проверяют в РБП на активность, специфичность и на спонтанную агглютинацию соответственно с позитивной, негативной сыворотками и в последнем случае - с физиологическим раствором. В соответствии с «Наставлением по диагностике бруцеллеза животных» в РФ результат РБП считают положительным при наличии четко выраженной агглютинации. В благополучных по бруцеллезу хозяйствах в случае позитивной РБП сыворотки крови исследуют в РА и РСК (РДСК) или РА и РИД. Если при этом получают отрицательные результаты, то животных с позитивной РБП повторно исследуют через 15-30 дней в этих же серологических реакциях. В неблагополучном по бруцеллезу хозяйствах овец, коз, северных оленей с позитивной РБП признают больными. Сыворотку крови крупного рогатого скота, верблюдов и лошадей дополнительно исследуют в РА, РСК (РДСК) или РА и РИД, животных с положительными результатами этих серологических реакций признают больными, сомнительно реагирующих исследуют повторно через 15-30 суток в РА, РСК (РДСК) или РА и РИД. При получении положительных или сомнительных результатов животных признают больными бруцеллезом.

Кольцевая реакция с молоком (КР). Реакцию применяют для проверки благополучных по бруцеллезу стад крупного рогатого скота и молока на рынках.

В РФ, в соответствии с «Наставлением по диагностике бруцеллеза животных», реакцию и оценку результатов проводят следующим образом. В пробирку наливают 0,05 мл антигена (клетки бруцелл, окрашенные гематоксилином) и 1 мл исследуемого молока. Если используют пробирки Флоринского — 2 мл молока и 0,1 мл антигена, компоненты перемешивают, пробирки помещают в водяную баню (37-38° С) на 1 час, затем учитывают результат по нижеследующим критериям:

«+++»	Четко выраженное синее кольцо в верхней части столбика молока в слое сливок, молоко белое	Результат положительный
«++»	Достаточно выраженное синее кольцо в слое сливок, остальная часть молока имеет синеватый цвет	Результат положительный
«+»	Синее кольцо в слое сливок выражено слабо, столбик молока имеет синий цвет	Результат сомнительный
«-»	Столбик молока равномерно окрашен в синий цвет, слой сливок белого или желтоватого цвета	Результат отрицательный

КР на 2-3 креста считают положительной, 1 крест — сомнительной. При положительной КР от всех животных стада берут кровь для постановки в РА или РСК (РДСК) или РА и РИД. Если получают отрицательный результат, то независимо от позитивной КР животных признают здоровыми.

Реакция связывания комплемента (РСК, РДСК). Данную серологическую реакцию применяют для диагностики бруцеллеза практически всех видов животных. Согласно «Наставлению по диагностике бруцеллеза для животных» исследуемые сыворотки крови крупного рогатого скота и РСК инактивируют разведенными 1:5 в водяной бане в течение 30 минут при 60-62°C; сыворотки крови ослов, мулов при 64-65°C; буйволов — при 64°C; свиней — 60-62°C 50 минут; при постановке РДСК 30 минут при 62-64°C. Используют единый бруцеллезный антиген в рабочем титре: молизин для РСК в удвоенном титре, для РДСК — в утроенном, 2,5% взвесь эритроцитов барана для РСК и 3%-ную для РДСК. Комплемент в количестве 1,2 единицы (титр комплемента принимается за 1 единицу). Реакцию проводят в объеме 1 мл с сыворотками, разведенными 1:1 и 1:10 (технику постановки и учета результатов см. в разделе «Серологические реакции»).

При исследовании сывороток в одном разведении (1:5) и задержке молиза на один крест эти сыворотки повторно исследуют в двух разведениях (1:5, 1:10). В случае сомнительной РСК животных повторно исследуют через 15-30 суток. Если при повторном исследовании животных благополучного по бруцеллезу хозяйства вновь получена сомнительная РСК — животных признают здоровыми. Если аналогичный результат получен у животных неблагополучного хозяйства, их рассматривают как больных. Получение только позитивной РСК в разведении 1:10 в благополучных по бруцеллезу стадах ранее вакцинированного крупного рогатого скота

того скота предполагает повторное исследование через 15-30 суток. При нарастании титров РСК диагноз на бруцеллез считают установленным, в обратном случае результат исследования считают отрицательным («Наставление по диагностике бруцеллеза животных», 2000).

Реакция иммунодиффузии (РИД). Согласно «Наставлению по диагностике бруцеллеза животных» (2000) в РФ РИД используют при плановых исследованиях в благополучных по бруцеллезу крупного рогатого скота хозяйствах, где не применяются вакцины, одновременно с РА, а также при проверке сомнительно реагирующих в РА или РСК (РДСК) животных для дифференциации неспецифических реакций; в благополучных по бруцеллезу крупного рогатого скота хозяйствах, где проводится иммунизация крупного рогатого скота аг-глютиногенными вакцинами при контроле эпизоотического состояния (не ранее 1,5 месяца после вакцинации); для дифференциации реакций, полученных в РА (не более 100 МЕ) или РСК (РДСК) в разведениях не выше 1:10; при плановых исследованиях животных одновременно с РА; в неблагополучных по бруцеллезу крупного рогатого скота хозяйствах через 1,5 месяца после иммунизации; среди телок и нетелей в течение первых шести месяцев после иммунизации (реимунизации) 2-4-кратно; через 6 месяцев после иммунизации (реимунизации) животных для оздоровления стада от бруцеллеза в комплексе предусмотренных реакций; при постановке хозяйства на контроль и снятии ограничений одновременно с РА и РСК (РДСК).

При диагностике бруцеллеза северных оленей для оценки эпизоотического состояния стад, благополучных по бруцеллезу, вакцинированных против бруцеллеза; для исследования на бруцеллез не ранее чем через два месяца после применения вакцин; для дифференциации неспецифических реакций.

Техника проведения РИД. Расплавленный агар разливают по 2,5 мл на предметные стекла, пластинки размером 6x9 см — 12 мл, стандартные чашки Петри слоем не менее 2 мм, которые предварительно размещают на строго горизонтальной поверхности. В застывшем агаровом геле штампом делают лунки: центральную диаметром 5 мм и шесть периферических по 3 мм.

В центральную лунку вносят 20 мкл О-полисахаридного антигена, в периферические — 40 мкл исследуемых сывороток крови. Одновременно на каждой пластинке (чашке Петри) ставят контроль с позитивной сывороткой крови. Затем стекла (чашки Петри) выдерживают во влажной камере при температуре не ниже 18° С и учитывают результат в косопроходящем свете через 24 и 48 часов. Как положительный результат оценива-

ют наличие линии преципитации, появившейся через 24 часа. Сыворотки крови, давшие реакцию преципитации через 48 часов, исследуют повторно и при получении линии преципитации через 24 или 48 часов реакцию реакции признают положительным.

Питательные среды

Печеночно-сывороточный или печеночно-аминопептидный агар

Готовят печеночный отвар: 500 г свежего фарша говяжьей печени смешивают с 500 мл воды, кипятят 1 час, фильтруют через ватный фильтр, стерилизуют в автоклаве, смешивают равные объемы печеночного отвара с водопроводной водой, добавляют 1% пептона, 0,5% натрия хлорида, 2% агар-агара. На 1000 мл смеси вносят 17 мл 10%-ной двууглекислой воды, автоклавируют 20-25 минут при 115° С, фильтруют через ватный фильтр, устанавливают рН 7,0-7,2, добавляют 1% глюкозы и 2% глицерина, разливают по колбам и стерилизуют 20-25 минут при 110° С. Перед использованием агар расплавляют, остужают до 50° С, добавляют 10-20% сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота (печеночно-сывороточный агар) или 10-15% аминокептида (печеночно-аминопептидный агар), разливают по чашкам или пробиркам. Также готовят полужидкие среды, внося 0,15-0,2% агар-агара. Рекомендуют среды данного типа для культивирования *B. ovis*.

Печеночный агар Хеддльсона. В 500 мл воды вносят 10 г пептона, 5 г натрия хлорида, 20 г агар-агара, автоклавируют 30 минут, добавляют 500 мл печеночного отвара, охлаждают до 60° С, устанавливают рН 7,2. В 1 л среды добавляют один яичный белок, автоклавируют 30 минут при 120° С, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают рН 7,2, разливают по емкостям и стерилизуют 30 минут при 115° С.

Плотный печеночно-глюкозо-глицериновый агар (ППГА)

Из свежей говяжьей печени освобождают от жира и пленок, измельчают, добавляют 500 мл водопроводной воды, кипятят 1 час, фильтруют через ватный фильтр. Полученный печеночный отвар разводят водопроводной водой 1:1, добавляют 1% пептона, 0,5% натрия хлорида, 2,5% глюкозы, 17 мл 10%-ного раствора гидрокарбоната натрия на 1000 мл. Среду автоклавируют 20 минут при 115° С, отстаивают в автоклаве 3-4 часа, фильтруют через ватный фильтр, устанавливают рН 7,2. Затем в среду добавляют 1% глюкозы и 2-3% глицерина, разливают по пробиркам, колбам, стерилизуют 20-25 минут при 110° С. Данную среду рекомендуется применять для культивирования *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, при обнаружении

статическом методе дифференциации бруцелл. ППГГБ готовят так же, но агр не добавляют.

Сывороточно-декстрозный агар. К 835 мл дистиллированной воды добавляют 15г агар-агара, 10г пептона, 5 г химически чистого натрия хлорида и 165 мл мягкой воды. Прогревают 1 час текучим паром, устанавливают рН 7,8, автоклавируют 30 мин при 127° С, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН 7,4. Среду разливают по сосудам и стерилизуют при 116° С 15 минут. Перед использованием среду расплавляют, охлаждают до 50° С, добавляют стерилизованные фильтрованием сыворотку крови лошади или крупного рогатого скота до концентрации 3% и раствор декстрозы до уровня 1%. Среда рекомендуется для первичного выделения бруцелл.

Сывороточно-декстрозный бульон. Готовят так же, как сывороточно-декстрозный агар, но без добавления агар-агара.

Дл.бими-агар. В 1000 мл дистиллированной воды добавляют 20 г сухого пептона, 20 мл дрожжевой воды, 5 г натрия хлорида, 20 г агар-агара. Устанавливают рН 7,3, все компоненты растворяют в аппарате Коха, фильтруют через ватный фильтр. Вносят 1 г глюкозы, 0,2 г бисульфита натрия, устанавливают рН 7,2 0-7,3, разливают по колбам и стерилизуют 40 минут текучим паром, затем 20 минут в автоклаве при 110° С. Дрожжевую воду получают путем кипячения 1 кг хлебных дрожжей в 1000 мл дистиллированной воды, затем фильтруют через полотно и хранят под фтороформом в темноте (не более 15 дней).

Картофельный агар с сывороткой. Свежий сырой картофель моют, очищают, нарезают тонкими ломтики. 250 г картофеля заливают 1000 мл дистиллированной воды, сосуды накрывают крышкой, выдерживают ночь при 60°С, настой фильтруют без бумажный фильтр, доливают водой до 1000 мл, добавляют 5 г натрия хлорида, 10 г пептона, 5 г мясного экстракта, 25 г агар-агара, смесь рагпюряют в аппарате Коха в течение часа, добавляют 20 мг глицерин доводят рН до 7,4, стерилизуют в автоклаве 20 минут при 115°С.Среду охлаждают до 50° С и на каждые 90 мл настоя добавляют 10 мл сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота. Среда рекомендована экспертным комитетом ФАО/ВОЗ (1970) для первичного выделения бруцелл.

Заменитель среды Альбими. К 1 л дистиллированной воды добавляют 20 г пептона Дифко, 20 мл кожной воды, 5 г натрия хлорида, 10 г промытого агар-агара или Ц ара Дифко. Устанавливают рН 7,3. Кипятят сразу до расплавления агара, фильтруют через ватный фильтр. В горячую среду добавляют 1 г глюкозы и 0,1 г натрия бисульфата. Регулируют рН до 7,2-7,3. Разливают в колбы или пробирки, стерилизуют 20 минут при 110° С.

Для приготовления дрожжевой воды в 1 л дистиллированной воды суспендируют 1 кг пекарских (хлебных) дрожжей, кипятят 5-10 минут, фильтруют через плотный фильтр. Хранят в темном месте под вакуумом не более 2 недель.

Селективные среды для выделения бруцелл из молока и других материалов (рецепты фирмы Oxoid)

К расплавленному и охлажденному до 55-60°С агаровым средам (точно-декстрозный или кровавый агары с 5% лошадиной сыворотки, 1% декстрозы) добавляют следующие антибиотики (из расчета на 1 среду) : полимиксин В — 500 ИЕ, бацитрацин — 25 000 ИЕ, полимиксинимида — 100 мг, налидиксовой кислоты — 5 мг, нистатин — 100 000 ИЕ и ванкомицин — 20 мг. Антибиотики суспендируют в 10 мл стерильной воды. Вносят суспензию в среду и тщательно перемешивают.

Картофельный агар Корнеевой. 500 г очищенного, нарезанного кубиками картофеля варят в 1000 мл водопроводной воды. Отвар фильтруют через вату, доливают до 1000 мл, вносят 5 г натрия хлорида, 10 г пептона, 30 г глицерина, 10 г глюкозы, 20 г агар-агара для пробирок и 10 г для колб. Смесь кипятят до расплавления, отстаивают в теплом месте. Нижний слой с осадком срезают, прозрачную часть расплавляют, фильтруют через ватный фильтр, устанавливают рН 7,0, стерилизуют 20-30 минут при 115° С.

Среда Кроля. К печеночному агару Хеддльсона добавляют 1% водный раствор генцианвиолета до конечной концентрации 1:100 000. Среда рекомендуется для выделения бруцелл из молока.

Среда Первушина для выделения гемокультур. Мясопеченочный бульон с 1% глюкозы и 4% глицерина разливают в колбы по 100 мл. Вносят в колбу 0,5 г стерильной гигроскопической ваты. Стерилизуют 30 минут. Используют для посева крови.

Лабораторная диагностика туляремии

Туляремия — природно-очаговая, факультативно-трансмиссивная инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, увеличением лимфатических узлов, абсцессами. Возбудитель — грамотрицательная палочковидная бактерия *Francisella tularensis*, относящаяся к роду *Francisella*. Вид подразделяется на четыре подвида: *novicida*, неарктический, среднесирийский, голарктический. Последний подвид дифференцируют на три биовара: японский, I Erys (эритромицинчувствительный) и II Erys (эритромицинрезистентный).

Наиболее чувствительны к туляремии зайцы, полевки, водяные крысы, хомяки, домовые мыши, несколько менее чувствительны суслики, серые крысы. Из сельскохозяйственных животных спорадически заболевают поросята, ягнята, лошади, крупный рогатый скот, восприимчив человек.

Основным источником возбудителя являются мыши-полевки, домовые мыши, водяные крысы, ондатры, зайцы. Переносчиками возбудителя могут быть иксодовые и гамазовые клещи, комары, москиты. В Европе и Азии наиболее распространен голарктический тип возбудителя. **Лабораторная диагностика** туляремии базируется на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

В лабораторию трупы грызунов направляют целиком, от крупных животных — печень, селезенку, почки, увеличенные лимфатические узлы. Фрагменты перечисленных органов желательно транспортировать в замороженном виде (-30°C - -70°C), в случае необходимости можно консервировать в 30%-ном стерильном растворе глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из паренхиматозных органов и крови делают мазки, фиксируют метанолом и спирт-эфиром, окрашивают по Граму и Романовскому-Гимза. В положительных случаях в поле зрения обнаруживают грамотрицательные полиморфные, мелкие ($0,2 \times 0,2$ - $0,7$ мкм) палочковидные бактерии, преимущественно коккобактерии.

При окраске по Граму клетки окрашиваются слабо, интенсивнее — по методу Романовского-Гимза, приобретая красновато-фиолетовый цвет, имеют небольшую капсулу. Ценную дополнительную информацию дает окраска фиксированных препаратов туляремийной люминесцирующей

сывороткой прямым или непрямым способом. С положительным результатом апробирована для выявления возбудителя в материале ПЦР.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование.

F. tularensis аэроб, температурный оптимум 36-37° С, рН питательной среды — 6,8-7,3, требователен к питательным средам. На обычных МПА и МПБ возбудитель не растет.

Выделить культуру возбудителя методом прямого посева на питательные среды удается редко. Обычно исследуемым материалом служат органы лабораторных животных и уже потом пытаются выделить *F. tularensis* из органов заболевшего животного. Возбудитель требует для роста цистин или цистин.

Материал высевают на свернутую желточную среду Мак-Коя, желочный агар с цистином, среду Френсиса, селективные среды. Материал тщательно втирают в поверхность плотных питательных сред, пробки закрывают резиновыми колпачками. Посевы инкубируют в случае отсутствия роста до 10 суток, обычно макроскопически видимый рост обнаруживается через 2-4 суток.

На среде Мак-Коя возбудитель растет в виде нежного, сочного влажного налета («шагренового») или в виде мелких, нежных изолированных колоний. На среде Френсиса рост проявляется в виде молочно-белого налета или круглых, диаметром 1-2 мм, с ровными краями, выпуклой гладкой блестящей поверхностью колоний беловатого цвета.

На кровяных средах через 2-4 дня колонии достигают максимального размера, через 48 часов имеют вид сероватых росинок, при дальнейшей инкубации колонии проявляют тенденцию к слиянию и вокруг них появляется характерная зеленоватая зона обесцвечивания. Колонии на плотных питательных средах имеют слизистую консистенцию.

В жидких питательных средах возбудитель растет только на поверхности и в целом хуже, чем на плотных питательных средах.

Практикуется также посев материала в желточный мешок развивающихся 12-дневных куриных эмбрионов.

Морфология клеток *F.tularensis* в культуре. В окрашенных препаратах из агаровых культур клетки грамтрицательные, чаще кокковидные. В отличие от клеток в животных тканях, в мазках из жидких культур имеют форму изогнутых палочек с закругленными концами, иногда с поперечными перегородками. При специальных методах окраски выявляется капсула. Наличие

ство не обладают, но из-за мелких размеров имеют выраженное «броуновское движение».

Идентификация возбудителя на родовом уровне. Франциселлы имеют некоторое морфологическое сходство с рядом грамотрицательных палочковидных бактерий из родов *Brucella*, *Pasteurella*, *Yersinia*. В случае затруднений по определению родовой принадлежности выделенной культуры целесообразно установить, являются ли бактерии строгими аэробами, требуют ли для своего роста CO_2 , что характерно для некоторых видов бруцелл, а также потребность для роста на питательных средах в цистине или цистине, способность к расщеплению углеводов, образованию пероксидазы, каталазы, аммиака в жидкой среде. Принимают во внимание также морфологические и тинкториальные особенности клеток. Для франциселл характерно слабое восприятие красителей при окраске по методу Грама, очень нежная капсула в отличие от выраженной капсулы у пастерелл и иерсиний (*Y. pestis* в первую очередь). Франциселлы являются, как и бруцеллы, аэробами. Имеют, в отличие от иерсиний, температурный оптимум 37°C , требуют для роста цистин и цистеин, чем отличаются от бактерий указанных родов. Франциселлы расщепляют углеводы только на специальных средах с углеводами (среды Гисса не подходят), не образуют оксидазу и аммиак в жидкой среде, чем отличаются от иерсиний и бруцелл.

Идентификация *F.tularensis* по культуральным ферментативным и патогенным свойствам на уровне вида и биовара. В первую очередь проверяют способность выделенной культуры к росту на обычных питательных средах (кровяной агар, МПБ, МПА), на которых растет *F. novicida*, но не растут культуры других биоваров *F. tularensis*. Также параллельно проводят культивирование выделенной культуры на средах с цистином или цистином, на агаре Мак-Конки, в МПБ с 6% NaCl . Учитывают размер образующихся колоний, *F. tularensis* требует для роста цистин и/или цистеин. Исследуют образования кислоты из мальтозы, сахарозы, глицерина, патогенность для кроликов.

Серологическая идентификация *F.tularensis*

Осуществляют методом флуоресцирующих антител и в реакции агглютинации (основной метод). В качестве экспресс-методов детекции возбудителя в исходном материале используют РИФ, ЭЛИЗА, ПЦР.

При постановке РА используют диагностическую туляремийную иммунную сыворотку. Исследуемую культуру выращивают на среде Мак-

Коя в течение 48 часов, бактериальную массу снимают (не смывают) с поверхности среды и устанавливают концентрацию взвеси 5 млрд. микробных клеток в 1 мл. РА ставят в объеме 1 мл, к каждому реактиву сыворотки в объеме 0,5 мл добавляют 0,5 мл микробной взвеси. Пробирки выдерживают 2 часа при 37° С и 20-22 часа при комнатной температуре. Культура туляремиального микроба должна агглютинироваться диагностической сывороткой не менее чем на 2/3 ее титра. Сыворотка против *F. novicida* агглютинирует только *F. novicida*.

Таблица 69 - Критерии дифференциации подвидов *F. tularensis*

Тесты	подвид неарктический	подвид голарктический	подвид <i>novicida</i>
Рост на простых средах	-	-	+
Потребности в цистине или цистеине	+	+	-
Рост на среде Мак-Конки	-	-	варирующийся показатель
Размер колоний на кровяном агаре с глюкозой и цистинном (5 мм в диаметре)	-	-	+
Образование кислоты из:			
сахарозы	-	-	+
глицерина	+	-	+
мальтозы	+	+	-
Рост в МПБ с 6% NaCl	-	-	варирующийся показатель
DLM для кроликов при подкожном заражении (менее 1000 клеток)	+	-	-

Биопроба. Проводят с целью выделения культуры возбудителя из исследуемого материала и проверки патогенных свойств выделенной культуры.

Для заражения используют белых мышей и морских свинок. Мыши погибают раньше морских свинок, у морских свинок легче выявить характерные патолого-анатомические изменения в органах.

Исследуемый материал растирают в ступке с небольшим количеством стерильного физиологического раствора и вводят подкожно белым мышам в дозе 0,3-0,5 мл, морским свинкам — 1-2 мл. При наличии патогенности и в зависимости от его количества мыши погибают на 3-9-е сутки, морские свинки — на 4-15-е сутки. Выживших мышей убивают на 15-е сутки, морских свинок — на 25-е сутки после заражения. Материал от животных подвергают микробиологическому исследованию.

Питательные среды

Гидролизаты печени и крови готовят без предварительной температурной обработки для сохранения витаминов.

Свернутая желточная среда Мак-Коя и Чепина (желток 60%, физиологический раствор 40%)

Дистиллированную воду для физиологического раствора необходимо подкислить до pH 7,0-7,2 (зеленый цвет с бромтимоловым синим). И для более надежной стерилизации свертывание проводят при 80° С в течение часа. Добавляют аутолизат пивных дрожжей перед свертыванием среды из расчета: на 60% желтка 20% аутолизата и 20% физиологического раствора.

Агар на рыбно-дрожжевом гидролизате. К 100 мл дистиллированной воды добавляют гидролизата свежей рыбы — 20 мл, гидролизата желатинны — 10 мл, аутолизата дрожжей -2,5 мл, хлористого натрия — 0,5 г, глюкозы — 1 г, цистина — 0,1 г, агар-агара в зависимости от его качества от 1,5 до 2,5 г. После стерилизации в расплавленную среду, охлажденную до 45° С, добавляют 10% дефибрини-рованной крови кролика, разливают в пробирки и скашивают либо разливают в чашки Петри.

Мартеновский дрожжевой агар. Мартеновского бульона — 930 мл, дрожжевого аутолизата — 70 мл, глюкозы — 10 г, цистина — 1 г, хлористого калия — 0,4 г, хлористого натрия — 3 г, двууглекислой соды — 0,1 г, сернокислого магния -0,3 г, двуосновного фосфорнокислого натрия — 0,8 г, едкого натра 5% (раствор добавлять до pH 7,2 -7,4), агар-агара — 10 г.

Дрожжевой аутолизат готовят впрок по следующему рецепту. Пивные дрожжи отмывают от суслу водопроводной водой в высоких цилиндрах, воду сменяют 3-4 раза. Аутолиз проводят при 56-58° С в течение суток. На следующий день аутолизат кипятят на открытом огне в течение 30 минут, затем подщелачивают едким натром по лакмусу до слабощелочной реакции и разбавляют водой: на 1 часть аутолизата добавляют 2 части воды. После этого аутолизат вновь кипятят 40 минут и затем фильтруют через бумажный фильтр, стерилизуют в автоклаве 30 минут при 120° С. Простерилизованный аутолизат сохраняется длительный срок.

Полужидкая (коллоидная) среда Дрожжевиной. 10% куриных желтков и 90% стерильного физиологического раствора, а не выдерживает стерилизации.

Полужидкие среды применяют для выращивания вакцинной культуры. В состав сред входят гидролизаты свежей рыбы, печени или мяса — 20-30%, гидролизат желатины — 10%, дрожжевой аутолизат — 1%, желатины — 1,5%, хлористый натрий — 0,5%, глюкоза — 1%, цистин — 0,1%; pH среды 7,2-7,3. Все гидролизаты получают путем ферментативного переваривания при добавлении поджелудочной железы и панкреатина. Гидролиз ведут до получения аминного азота от 600 до 800 мг%.

Среда Френсиса. К МПА с 1% пептона и 0,5% NaCl (pH 7,3) добавляют 0,1% цистина и глюкозы. Сразу кипятят несколько минут, охлаждают до 50° С и вносят 10% дефибрированной крови кролика.

Селективная среда Тейера—Мартина. Агар (BBL) — 38 г, экстракт — 300 г; пептон (BBL) — 17,5 г; крахмал — 1,5 г; агар — 10 г; дистиллированная вода — 1000 мл. Среду разливают по 25 мл в пробирки и автоклавируют 15 минут при 121° С, охлаждают до 50° С, добавляют в каждую колбу по 0,25 мл смеси антибиотиков V-C-N Jnibitor (BBL) (ванкомицин, колистин, нистатин), размешивают, разливают по чашкам Петри. На данной среде можно выделить *F.tularensis* из смешанной культуры.

Среда для выделения *F.tularensis* (г/л). Триптазный бульон с тиамином (Difco) — 20,0; солянокислый цистеин — В; натрия тиогликолат — 2,0; глюкоза — 10,0; агар — 10; смешивают все МПоненты, кроме агара, устанавливают pH 7,2, добавляют агар и расплавляют, автоклавируют при 121° С в течение 20 минут, охлаждают до 45-48° С, добавляют 30 мл дефибрированной крови кролика и разливают в шпикеты Петри.

Пептон-цистеиновый агар (г/л). Бакто-пептон (Difco) — 20,0; хлорид — 10,0; глюкоза — 1,0; солянокислый цистеин — 1,0; агар — 20,0; смешивают компоненты кроме агара, устанавливают pH 6,2, добавляют агар, кипятят, охлаждают до 45-48° С и разливают в чашки Петри.

Среда с цистеином для изучения сахаролитической активности *Francisella*. Состав среды. Раствор А: бакто-пептон — 10 г, мясной экстракт — 1,5 г, хлористый натрий — 5 г, цистеин HCl — 1 г, дистиллированная вода — 500 мл, pH 7,2. Раствор Б: агар — 15 г, расплавляют в 500 мл дистиллированной воды. Смешивают растворы А и Б, добавляют 2 мл 1,5%-ного водного раствора фенолового красного (1,5 г фенола растворяют в 5 мл 0,1 N NaOH и добавляют 95 мл воды). Среда стерилизуют

уют при 121° С в течение 20 минут и добавляют тот или иной стерилизованный фильтрованием углеводов до конечной концентрации 1%, разливают по 5 мл в пробирки и смешивают. При исследовании сахаролистических свойств испытуемую культуру засевают на поверхность среды в большом количестве бактериологической петлей.

Лабораторная диагностика пастереллёза

Пастереллез — болезнь многих сельскохозяйственных, диких животных и птиц. Возбудителями пастереллеза являются различные виды бактерий рода *Pasteurella*, семейства *Pasteurellaceae*. Патогенные свойства доказаны не у всех пастерелл, наибольшее значение в патологии животных имеют следующие виды.

P. multocida серовара В является первичным возбудителем геморрагической септицемии различных видов жвачных животных. *P. multocida* серовара D обуславливает, обычно как вторичный агент, пневмонии и атрофический ринит свиней. *P. multocida* серовара А у крупного рогатого скота участвует в развитии пневмонии телят, иногда — маститов коров, у свиней этот серовар пастерелл является причиной пневмоний и маститов, у кроликов — пневмопневмоний (заразного насморка), генитальных инфекций, у птицы — «холеры» (первичная инфекция). *P. multocida* серовара Е является этиологическим агентом эпизоотической геморрагической септицемии крупного рогатого скота и буйволов в Африке. У индеек изолирована *P. multocida* типа F, но ее этиологическая роль до сих пор не выяснена.

P. haemolytica биотипа А известна как первичный или вторичный агент пневмоний, участвует в развитии синдрома «транспортной лихорадки» крупного рогатого скота. *P. haemolytica* биотипа Т вызывает септицемию ягнят 5-12-месячного возраста. У свиней в кишечном тракте обитает *P. aerogenes*, которую иногда выделяют при абортах данного вида животных.

P. anatipestifer рассматривают как возбудитель фибринозного плеврита у 1-8-недельных уток. У лошадей респираторную патологию, включая пневмонию, может обуславливать *P. caballi*. Роль ряда видов пастерелл в патологии животных на данное время не доказана.

У собак и кошек периодически выделяют из клинических образцов *P. pneumotropica*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. stomatis*, но их этиологическая роль в патологии не доказана.

Лабораторная диагностика пастереллезов основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Характер материала определяется наблюдаемым синдромом болезни. При септических явлениях объектом исследования являются части кишечника, печени, почек, сердце с перевязанными сосудами, лимфатические узлы, трубчатая кость. Трупы мелких животных направляют в лабораторию целиком. В случае поражения легких берут фрагменты из границ здоровой и пораженной ткани, экссудат из грудной полости, ретикулярные лимфатические узлы, миндалины. Прижизненно для исследования берется гной, экссудат, пробы со слизистой носовой полости, молоко от животных с маститом. Материал транспортируют в лабораторию в термосе со льдом, трубчатую кость обертывают марлей или ватой, смоченной 10%-ным формалином. Фрагменты органов можно пересылать в 10%-ном растворе глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала

Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из методов, позволяющих обнаружить капсулу (Романовского-Гимза и т.д.). В препарате пастереллы видны как короткие, с закругленными концами (обычно 1-2) Грамтрицательные палочки размером 0,3-1,0x1-2 мкм, окруженные капсулой, располагающиеся одиночно, парами, в виде коротких цепочек. При фиксации препаратов жидкостями, а не температурой клетки лучше окрашиваются. Достаточно характерно биполярное окрашивание клеток пастерелл, но следует иметь в виду, что ряд энтеробактерий, а также актинобациллы проявляют склонность к биполярной окраске. Для выявления биполярности рекомендуется окрашивать мазки спиртовым раствором пиоктанина в течение 1 минуты с подогревом до отхождения паров. Микроскопическая картина: фон светло-синий, полюса клеток темно-синие, центр клетки не окрашен. Приготовление раствора пиоктанина: пиоктанина — 0,12 г, этанола (96° С) — 6 мл, дистиллированной воды — 20 мл.

Выделение и идентификация культур пастерелл

Культивирование. Пастереллы — факультативные анаэробы, температурный оптимум 37° С (диапазон 25-40° С), птичьи штаммы растут до 42°С, оптимум рН питательных сред 7,2-7,4. Для первичного культивирования используют обычные МПА, МПБ, бульон и агар Хоттимера, лучше — обогащенные среды: кровяной, сывороточный агар в бульоне.

Следует отметить, что большинство штаммов *P. avium* обладают потребностью в НАД и для культивирования этого вида пастерелл необходимо использовать специальные питательные среды (см. «Гемофильные бактерии»). Для выделения пастерелл из носовой слизи целесообразно использовать элективную среду с клиндамицином. *P. anatipestifer* требует для своего роста обогащенные среды и 5, 10% CO₂. Инкубирование посевов проводят в течение 24-48 часов, при отсутствии роста — до 4-5 суток.

P. multocida на жидких средах растет с их равномерным слабым помутнением. Позднее, по мере просветления среды, через 48-36 часов, на дне пробирки формируется слизистый осадок, поднимающийся при встряхивании в виде косички. Мукоидные штаммы растут с более интенсивным помутнением среды. На плотных средах через 24 часа культивирования формируются круглые, выпуклые, с гладкой, влажной поверхностью, ровными краями полупрозрачные колонии диаметром 1-3 мм. На кровяном агаре при росте *P. multocida* гемолиз отсутствует. Культуры *P. multocida* серовара А образуют крупные (более 3 мм), слизистые колонии. В последующих пассажах может наблюдаться диссоциация и появление наряду с колониями S-формы шероховатых колоний R-формы.

P. haemolytica при росте на жидких питательных средах вызывает равномерное помутнение, обычно без формирования пристеночного кольца. На плотных средах через 24 часа культивирования формирует круглые, выпуклые, с ровными краями полупрозрачные колонии. В результате культивирования на кровяном агаре с кровью крупного рогатого скота вокруг колоний образуется зона β-гемолиза, на агаре с кровью кролика, барана гемолитические свойства обнаруживаются только после снятия колонии с поверхности питательной среды.

Морфология клеток пастерелл в культуре. В мазках из культур пастерелл обычно полиморфны, выглядят как мелкие граммотрицательные палочки, овоиды вплоть до кокков. Жгутиков не имеют. При окраске по методу Гинса у *P. multocida* обнаруживается хорошо выраженная капсула.

Идентификация пастерелл на уровне рода. Классификация представителей недавно сформированного семейства *Pasteurellaceae* еще не завершена. Критерии дифференциации трех родов семейства довольно относительны, поэтому идентификацию целесообразно проводить сразу на уровне вида, хотя различать роды *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, а также сходных представителей рода *Yersinia* (семейство *Enterobacteriaceae*) можно с учетом свойств, изложенных в таблице 70.

Таблица 70 - Дифференцирующие признаки родов семейства Pasteurellaceae и рода Yersinia

Признаки	Роды			
	Actinobacillus	Haemophilus	Pasteurella	Yersinia
Вязкость колонии	+	-	-	-
Подвижность при 22° С	-	-	-	Р
Каталаза	Р	Р	+	+
Оксидаза	Р	Р	Р	-
Фосфатаза	+	+ 1)	+	-
Рост на агаре Мак-Конки	+	-	Р	+
Тест метилрот (37°С)	-	Р	-	+
Тест Фогес-Проскауера	Р	н.д.	-	-
Рост на среде с 0,5% NaCl	-	-	-	+
Ферментация с образованием кислоты:				
Глюкозы	+	+	+	+
Фруктозы	+	Р	+	+
Ксилозы	+	Р	Р	Р
Дульцита	-	-	-	-
Инозита	-	3)	Р	Р
Инулина	-	4)	-	-
Гидролиз твина - 80	-	-	-	Р
Г + Д в ДНК, моль%	40-43	38-44	40-45	46-50

1) Исключение — *H. haemoglobinophilus*;

2) Исключение — *P. multocida* и *P. haemolytica*;

3) Исключение — *H. arrophilus* и *H. parasuis*;

4) Исключение — *H. parasuis*

Р — признак различен в таксонах рангов (виды рода, роды семейства); нд — нет данных

Идентификация пастерелл на уровне вида

Для видовой дифференциации пастерелл рекомендуется исследовать культуры способность к росту на агаре Мак-Конки, образовывать гемолитин, орнитин-декарбоксилазу, уреазу, индол, кислоту из лактозы, сахарозы, мальтозы, маннита. Биохимическую идентификацию можно проводить при помощи тест-системы API20 NE (Bio Mérieux)

Таблица 71 - Основные дифференцирующие признаки видов рода *Pasteurella*

Вид пастерелл	Признаки									
	Гемолитин	Рост на агаре Мак-Конки	Индол	Уреазы	Орнитин-декарбоксилаза	Кислота (24-48 ч.)				
						Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Маннит
<i>P. multocida</i>	-	-	+	-	(+)	+	(-)	+	(-)	(+)

<i>P. haemolytica</i>	+	(+)	-	-	(-)	+	(+)	+	+	+
<i>P. pneumotropica</i>	-	(-)	(+)	+	+	+	(+)	+	*	-
<i>P. canis</i>	-	-	+	-	+	+	н.	н.	-	-
<i>P. dermatis</i>	-	-	+	+	-	+*	-	-	+	-
<i>P. caballi</i>	-	-	-	-	+/-	+*	+	н	(+)	0
<i>P. actigenes</i>	-	+	-	+	(+)	+*	[+]	+	+	-
<i>P. gallinamm</i>	-	(-)	-	-	+/-	+	-	+	+	-

(+) — преимущественно положительный результат; (-) — преимущественно негативный результат; +* — газ и кислота из глюкозы, нд — нет денных; ¹ *P. avium* требует для роста на питательных средах НАД.

После установления видовой принадлежности пастерелл, если выделены культуры *P. multocida* и *P. haemolytica*, можно установить подвид *P. multocida* или биовар *P. haemolytica*, что позволяет, используя эти признаки в качестве маркера возбудителя, более детально проводить анализ эпизоотической ситуации.

Идентификация серовариантов *P. multocida*

Определение сероваров возбудителя является обоснованием для использования вакцин, включающих конкретный серовар *P. multocida*. Серотипирование основано на антигенных различиях капсульного вещества (полисахарид), в соответствии с чем *P. multocida* подразделяют в РНГА на 5 сероваров (А, В, D, Е и F). По особенностям соматического антигена *P. multocida* также дифференцируют на серовары, которые обозначают цифрами.

В практических условиях дифференциация сероваров возбудителя в РНГА, из-за отсутствия коммерческих реагентов, пока недоступна, и поэтому прибегают к несерологическим методам, основанным на иных особенностях клеток пастерелл.

Поскольку серовар Е встречается в Африке, а серовар F выделен у индейки, то реально речь идет об установлении сероваров А, В и D. С этой целью посевную культуру пастерелл засевают на агар Хоттингера в шинках Петри с таким расчетом, чтобы был получен достаточно густой шег изолированных колоний.

Одновременно, вслед за этим посевом по диаметру чашки одной прямой линией высевают бактериологической петлей бульонную культуру из штамма *S. aureus*, способного продуцировать фермент гиалуронидазу, и обратно сопряжено с хорошо выраженной гемолитической активностью.

Таблица 72 - Критерии дифференциации подвидов *P. multocida*

Субстрат	Ферментация
----------	-------------

	Трегалоза	Д-Ксилоза	α -Арабиноза	Сорбит	Диагностика
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	V	V	-	+	1
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	+	+	-	-	2
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	+	+	V	+	3

V — варьирующий признак.

Посевы инкубируют при 37° С в течение 18-24 часов и просматривают в косопроходящем пучке света в стереоскопическом микроскопе ММ-1.

Колонии *P. multocida* серовара А, из-за расщепления гиалуроновой кислоты стафилококком гиалуроновой кислоты в капсуле пастерелл, в отличие от колоний от сероваров В и D, тусклые, имеют серый или голубой цвет и флуоресцируют.

Если испытуемая культура не относится к серовару А, то ее исследуют в триафлавиновой пробе, которая, в принципе, предназначена для выявления у бактерий признаков диссоциации. Испытуемую культуру выращивают 24 часа при 37° С в 3-5 мл бульона Хоттингера, центрифугируют, осадок удаляют, седимент ресуспендируют в оставшейся жидкости и добавляют в пробирку 0,5 мл свежеприготовленного раствора триафлавинов (акрифлавин) 1:1000. Компоненты перемешивают и выдерживают 10 минут при комнатной температуре. Если взвесь бактерий оседает, культуру относят к серовару В, выпала в осадок — к серовару D.

Таблица 73 - Критерии дифференциации биоваров *P. haemolyticus*

Признаки	Биовары	
	А	Т
Образование кислоты из: Арабинозы	+	-
Ксилозы	+	-
Трегалозы	-	+
Салицина	-	+
Чувствительность к пенициллину	Высокая	Слабая
сероварианты	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12	3, 4, 10
Локализация в организме естественных хозяев	Носоглотка	Миндалины

Ассоциация с патологией	Пневмонии крупного рогатого скота и овец, септицемия новорожденных ягнят	Септицемия новорожденных ягнят
-------------------------	--	--------------------------------

Биопроба

Проводят с целью выделения культуры возбудителя из исследуемого материала и определения патогенности выделенной культуры возбудителя. С целью выделения пастерелл из исследуемого материала готовят суспензию (1:10) и вводят подкожно в объеме 0,2 мл белым мышам. При этом способе заражения удается определить наличие вирулентных штаммов *P. multocida*. За животными наблюдают в течение недели. Для проверки патогенных свойств выделенных культур *P. multocida* суточной буillonной культурой заражают в дозе 0,2 мл подкожно белых мышей массой 16-18 г. Вирулентные штаммы (обычно серовар В) вызывают гибель животных в течение 24-72 часов, культуры сероваров А и D — в пределах семи суток. Патогенность культур, выделенных от птицы проверяют на мышах или цыплятах. В последнем случае используют 90-120-дневных цыплят, которым культуру в дозе 0,1 мл вводят внутримышечно. Культуры *P. haemolytica* вызывают гибель белых мышей только при интрабрюшинном заражении. Апробирована ПЦР для детекции *P. multocida* в материале.

Питательные среды

Избирательная питательная среда для первичной изоляции *P. multocida*. К расплавленному и остуженному до 45°C агару Хоттингера добавляю! канамицин из расчета 2 мкг/мл, среду разливают по чашкам Петри.

Модифицированная избирательная питательная среда Моррис. К кровяному агару с 5% крови овцы или крупного рогатого скота добавляют следующие компоненты в одной из следующих комбинаций: а) неомитин — 0,0025, теллурид калия — 0,0025, тиротрицин — 0,01, актидион — 0,1; б) неомитин — 0,0015, новобиоцин — 0,002, актидион — 0,1 (г/л).

Лабораторная диагностика гемофильного полисерозита

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) — инфекционная болезнь поросят, проявляющаяся генерализованным серозно-фибринозным воспалением серозных оболочек (плевра, перикард, брюшина), мышцами, артритами. У свиней более старшего возраста вызывает артриты, пневмонии или выступает как вторичный агент при энзооотозной (микоплазмозной) пневмонии. Возбудитель — бактерия *Haemophilus parasuis*, относящаяся к роду *Haemophilus* семейства *Pasteurellaceae*. В просторанено носительство *H. parasuis* у клинически здоровых свиней. Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Стерильно отбирают серозно-фибринозный экссудат из перитонеальной, плевральной, перикардиальной полостей, пораженных суставов при наличии симптомов поражения — ЦНС-фрагменты тканей головного мозга, при наличии пневмонии — кусочки легких на границе пораженной и здоровой ткани. Материал транспортируют в термосе со льдом.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и в нем из методов для выявления капсул. В патологическом материале возбудитель располагается в виде одиночных мелких грамотрицательных палочковидных бактерий, иногда небольшими скоплениями, короткими цепочками, клетки имеют капсулу.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *H. parasuis* — факультативный аэроб, температурный оптимум 37-38°C, pH 7,2-7,4. На обычных средах возбудитель не растет, требует добавления в среду готового фактора роста — V-фактора (NAD-никотинамидаденин-динуклеотид или NAD-фосфат NADP). В качестве источника V-фактора используют дрожжевой экстракт, химически чистой NAD (NADP), гретую кровь барана (лошади) или растительную культуру «бактерий-кормилок», которая при этом выделяет в окружающую среду V-фактор, что обеспечивает возможность роста вокруг колоний «бактерий-кормилок» сателлитных мелких колоний *H. parasuis*. Для культивирования дрожжевой экстракт и чистый NAD добавляют в МПА, мясо-агар и бульон Хоттингера. Рост *H. parasuis* также зависит от наличия в среде сыворотки крови (барана, лошади, крупного рогатого скота), которую добавляют в питательную среду в количестве 8-10%. Для лучшего выделения возбудителя лучше всего использовать кровяной

10% дефибрированной крови барана, лошади, кролика) с «бактерией-кормилкой». При исследовании контаминированного материала применяют среды Conroni.

Кровяной агар слегка подсушивают. Исследуемый материал засевают петлей (бактериологической петлей) по всей поверхности среды. Засев по диаметру чашки в виде двух прямых линий под углом 90° засевают бактериологической петлей культуру негемолитического штамма стафилококка или *E. coli* («бактерия-кормилка»).

На плотные и жидкие питательные среды, содержащие готовые ростовые факторы (NAD, дрожжевой экстракт, гретую кровь), материал засевают обычным способом. Посевы культивируют при 37-38°C в течение 24-48 часов в аэробных условиях.

Характер роста *H. parasuis* на питательных средах. На кровяном МПА возбудитель растет в виде мельчайших негемолитических колоний на расстоянии не более 1,0-3 см от штриха «бактерии - кормилки» (зона диффузии V-фактора). Вблизи «кормилки» колонии возбудителя крупнее, по мере удаления — мельче, так как снижается концентрация ростового фактора. Такой рост *H. parasuis* на кровяном агаре называют «сателлитным».

На прозрачном сывороточном МПА с «бактерией-кормилкой» колонии прозрачные, круглые, выпуклые, с ровными краями, слизистой консистенции, флуоресцирующие в косопроходящем пучке света.

На агаре с гретой кровью («шоколадный агар») в первичных посевах можно наблюдать колонии двух типов: крупные — диаметр 1,5-2,5 мм и мелкие 0,2-0,5 мм. Морфология колоний лучше различима на прозрачных питательных средах типа агара Левинталя, сывороточно-дрожжевого агара. Колонии на этих средах имеют правильную круглую форму. Они выпуклые, с гладкой поверхностью, ровными краями, слизистой консистенции, прозрачные, флуоресцирующие в косопроходящем свете. В процессе инкубирования возбудителя на питательных средах в результате диссоциации колонии могут терять свойство флуоресценции.

В жидких питательных средах (бульон Левинталя, сывороточно-дрожжевой бульон) *H. parasuis* растет с легким равномерным помутнением среды, через 48-72 часа среда просветляется, на дне пробирки формируется слизистый осадок.

Морфология клеток возбудителя в культуре. Из выросших культур готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, на капсулы — по Гансу, препарат «раздавленная капля» для определения подвижности.

Морфология клеток *H. parasuis* такая же, как и в патологическом материале, но часто обнаруживаются нитевидные формы. Клетки имеют капсулу, не образуют жгутики.

Идентификация *H. parasuis* на уровне рода. С целью отнесения выделенной культуры к роду *Haemophilus*, в первую очередь определяют морфологические, тинкториальные, культуральные признаки и зависимость роста от NAD, а также подвижность, способность расти в средах с 0,5% NaCl, агаре Мак-Конки, образовывать каталазу, оксидазу, фосфатазу, ферментировать глюкозу, дульцит, гидролизовать тинн. На практике идентификацию возбудителя, исходя из патологических анатомических данных, сразу ведут на видовом уровне, придавая первоочередное значение определению NAD-зависимости.

Идентификация *H. parasuis* на видовом уровне. При видовой идентификации, исходя из происхождения исследуемого материала (свиноморской), *H. parasuis* приходится дифференцировать от NAD-зависимых видов *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Биопроба. Для определения патогенных свойств выделенной культуры используют внутрибрюшинный способ заражения морских свинок. Исследуемую культуру выращивают 24 часа на «шоколадном агаре», смывают стерильным физиологическим раствором, устанавливают концентрацию бактерий по оптическому стандарту мутности на уровне 20 ед. Взвесь в дозе 1 мл вводят трем морским свинкам внутрибрюшинно. Гибель в течение 5 суток хотя бы части животных, выявление у погибших морских свинок поражения серозных оболочек и выделение в результате бактериологического исследования исходной культуры позволяют рассматривать ее как вирулентную.

Таблица 74 - Критерии дифференциации *H. parasuis* и *A. pleuropneumoniae*

Признаки	<i>H. parasuis</i>	<i>A. pleuropneumoniae</i>
Морфология клетки	Преимущественно палочковидные	Преимущественно кокковидные
Уреаза	-	+
β-гемолиз	-	+

С АМР-тест ¹⁾	-	+
актив. флюкозидаза	+	-
образование кислоты		
на		
Д. желтозла ²⁾	-	+
Д. маннита	+	+

¹⁾ методика САРМ-теста изложена в разделе «Стрептококкозы».

²⁾ в питательные среды необходимо для роста возбудителя добавлять NAD (10 мкг/мл) или дрожжевой экстракт (10%).

Питательные среды такие же как и при лабораторной диагностике отинобациллезной пневмонии свиней.

Лабораторная диагностика гемофилеза кур

Гемофилез кур (**инфекционный насморк, кориза**) — инфекционная болезнь, характеризующаяся катаральным воспалением слизистых оболочек носовой полости, подглазных синусов, конъюнктивы. Часто наблюдается смешанное течение гемофилеза и микоплазмоза. Восприимчивы куры всех возрастов, но наиболее — 1-16-недельного возраста, 3-5-дневные цыплята устойчивы. Возбудитель — бактерия *Haemophilus paragallinarum*, род *Haemophilus*, семейство *Pasteurellaceae*. **Лабораторная диагностика** основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Стерильным ватным тампоном собирают слизь и экссудат из полости синусов, пробы экссудата из трахеи и воздухоносных мешков. Материал берут от 2-3 кур, не подвергавшихся лечению антибиотиками, на стадии острого течения (1-2-е сутки проявления клинических признаков). Материал транспортируют в термосе со льдом.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из проб материала готовят мазки, окрашивают по методу Грама и одним из методов для выявления капсулы. В мазках из исследуемого материала *H. paragallinarum* имеет форму небольших, нередко коккоподобных грамотрицательных палочек, окруженных капсулой.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37-38°C, pH 7,2-7,6, проявляет потребность в культивировании в NAD, сыворотке крови (лучше использовать куриную сыворотку), повышенном содержании CO₂ в атмосфере.

Исследуемый материал высевают на 10%-ный кровяной агар с кровью Петри (кровь овцы, кролика, курицы, крупного рогатого скота) и инкубируют посевом «культуры-баккормилки» (стафилококк, кишечная палочка). Можно использовать кровяной агар Левинталя, сывороточный дрожжевой агар. Поскольку материал обычно контаминирован посторонней микрофлорой, целесообразно применять селективные питательные среды. Посевы инкубируют при 37-38° С в течение 24-48 часов в эксикаторах в атмосфере 10% CO₂.

На кровяном агаре с «баккормилкой» возбудитель формирует розовый штрих питающей культуры мельчайшие сателлитные, негемолитические колонии. На «шоколадном агаре», агаре Левинталя и сывороточном дрожжевом агаре через 48 часов культивирования возбудитель формирует круглые, выпуклые, с гладкой поверхностью, полупрозрачные, сухие, диаметром до 1 мм колонии. В жидких питательных средах возбудитель растет со слабым равномерным помутнением питательной среды.

Морфология клеток возбудителя в культуре. В мазках из питательных колоний, бульонных культур клетки *H. paragallinarum* имеют форму коккобактерии, полиморфных палочек, нитей, грамотрицательные жгутиков нет. При окраске по методу Гинса или другими методами обнаруживается капсула.

Идентификация *H. paragallinarum* на уровне рода и вида. Для несения выделенной культуры к роду *Haemophilus* используют те же бактерии, что и для *H. parasuis*. Основную сложность в процессе идентификации представляет дифференциация *H. paragallinarum* и *Pasteurella avium* (прежнее наименование *Haemophilus avium*). *P. avium* по морфологическим, тинкториальным, культуральным признакам сходна с *H. paragallinarum* и также зависит от V-фактора.

С целью дифференциации двух указанных видов бактерий у выделенных культур исследуют зависимость роста от наличия сыворотки крови, образование пигмента, способность синтезировать каталазу, ферменты, расщеплять трегалозу, галактозу, мальтозу, маннит, сорбит, сальмициновую тогенность для кур (см. табл. 75).

Таблица 75 - Дифференциальные признаки *H. paragallinarum* и *P. avium*

Признаки	<i>H. paragallinarum</i>	<i>P. avium</i>
Ростоспособность в NAD	+	D
Гемолитичность	-	+ ¹⁾
Фосфатаза	+	-
Ростоспособность в сыворотке крови	+	-
Ростоспособность роста на питательных средах	скудный рост	интенсивный рост
Образование пигмента (тип желтого)	-	+
Образование кислоты из:		
Д-маннита	+	-
Д-суктозы ²⁾	-	+(медленно)
Д-глицерина	+	-
Д-сорбита	+	-
Д-арабины	+	-
Д-галактозы	-	+
Безопасность для кур	+	-

1) 79% штаммов положительные.

2) слабая реакция.

Для роста возбудителя необходимо добавлять в среду NAD (10 мкг/мл)

или дрожжевой экстракт (10%).

От других видов пастерелл *H. paragallinarum* легко отличить по способности в NAD. Этот признак исследуют посевом культуры на сыровороточный или кровяной агар с последующим высевом «баккормилки» или дисками на поверхность питательной среды бумажного диска, пропитанного NAD (10 мг/мл). Через 24 часа инкубирования сателлитный рост имеет только культуры *H. paragallinarum* и *P. avium*, остальные пастереллы и другие родные виды бактерий растут с одинаковой интенсивностью на всей поверхности питательной среды (NAD-зависимость отсутствует).

Серологическая идентификация *H. paragallinarum*

Инд антигенно неоднороден, подразделяется в РА на ряд сероваров. В промышленность РФ соответствующие диагностические сыворотки не выпускает.

Биопроба. Применяют для определения патогенных свойств выделенной культуры NAD-зависимых бактерий. Культуру выращивают в высушенном мешке 6-7-дневных развивающихся куриных эмбрионов или на оптимальной плотной питательной среде. Биопробу проводят на 2-3 эмбрионально здоровых врах восприимчивого возраста. Содержимое желточного мешка вводят курам интраназально в дозе 0,1-0,2 мл. Клиниче-

ские признаки болезни. Выявляются через 24-48 часов, но инкубационный период составляет 6-7 суток.

Питательные среды такие как и при лабораторной диагностике тинобациллезной пневмонии свиней.

Лабораторная диагностика актинобациллезной пневмонии

Актинобациллезная пневмония свиней - инфекционная болезнь свиней преимущественно двух-трехмесячного возраста и откармливаемых животных, характеризуется развитием фибринозногеморрагической некротизирующей пневмонии и фибринозного плеврита. Возбудитель - грамотрицательная бактерия *Actinobacillus pleuropneumoniae*, относится к роду *Actinobacillus*, семейства *Pasteurellaceae*.

Лабораторная диагностика основывается на результатах бактериологического исследования. Серологические реакции используют методы групповой диагностики для оценки эпизоотической ситуации.

Бактериологическое исследование

Для исследования стерильно отбирают фрагменты пораженной ткани на границе с нормальной тканью, а также средостенные лимфатические узлы, экссудат из грудной полости, пораженную плевру. Материал транспортируют в термосе со льдом или в замороженном виде.

Микроскопическое исследование исходного материала

Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из методов выявления капсул. В положительных случаях в препарате обнаруживают короткие, вплоть до кокковидных, грамотрицательные палочки с длинными концами, чаще располагающиеся парно, единично, реже в виде коротких цепочек, обладают капсулой. Типичные по морфологии коккобактерии имеют средние размеры 0,3-0,4 x 0,4-0,5 мкм.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *A. pleuropneumoniae* — факультативный анаэроб. Температурный оптимум 37-38°C, pH 7,2-7,4. Известны два биовара.

будителя: ДПН-зависимый (1-й биовар) и ДПН-независимый (2-й биовар). Наиболее часто изолируют из материала культуры первого биовара, которые не растут на обычных плотных и жидких питательных средах, даже обогащенных нативной кровью и сывороткой крови.

Исследуемый материал засевают дробно на 5%-ный кровяной (кровь барана) или сывороточный питательный агар (МПА, агар Хоттингера, и т.д.) в чашках Петри с размещением дисков, пропитанных ДПН, либо с последующим крестообразным посевом в виде линии по диаметру чашки Петри культуры «бактерии-кормилки» (см. «Гемофилезный полисерозит баранов»). Можно высевать материал на агар Левинтала, «шоколадный» и сывороточно-дрожжевой МПА и МПБ с 5% сыворотки крови крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта. Контаминированный соотвечствующей микрофлорой материал целесообразно высевать на селективную среду Charin с соавт. (1983). Посевы инкубируют при 37-38°C в течение 24-48 часов.

На кровяном или сывороточном агаре с использованием в качестве индикатора ростового фактора дисков с ДПН, «бактерии-кормилки», рост *Apleuropleumoniae* 1-го биовара наблюдается в виде сателлитных колоний вблизи источника ДПН. В непосредственной близости от ростового фактора изолированные колонии имеют диаметр 0,25-0,35 мм, по мере удаления размер колоний уменьшается до 0,1-0,15 мм вплоть до неразличимых невооруженным глазом. Радиус зоны сателлитного роста обычно не более 1,5-3 см. Колонии на кровяном агаре окружены четкой зоной гемолиза. На сывороточно-дрожжевом МПА, агаре Левинтала, «шоколадном» агаре через 24-48 часов инкубирования культуры первого биовара формируют по всей поверхности среды колонии правильной круглой формы, с ровными краями, слабовыпуклые, серо-белые, прозрачные, диаметром до 1,5-2 мм. Колонии тенденции к слиянию не проявляют. Консистенция бактериальной массы пастообразная, чаще слизистая. В последнем случае бактериальная масса с трудом снимается шпательной с поверхности плотной питательной среды и плохо суспендируется в 0,85%-ном растворе натрия хлорида. Нередко возбудитель образует колонии «резиноподобной» консистенции. Молодые культуры *A. pleuropleumoniae* в косопадающем пучке света при просмотре невооруженным глазом флуоресцируют, в микроскопе МБС-10 имеют изумрудно-зеленое свечение с медно-красным оттенком и легкую концентрическую вкрапленность. В жидких питательных средах (бульон Левинтала, сывороточно-дрожжевой МПБ) недиссоциированные культуры растут со слабой равномерным помутнением среды, без образования пристеночного

кольца и поверхностной пленки, через 72 часа на дне пробирки формируется слизистый осадок (Скородумов Д.И., 1997).

Культуры *A. pleuropneumoniae* 2-го биовара не требуют для своего роста ДПН, поэтому растут на обычном кровяном и сывороточном МПА МПБ, то есть не дают феномена сателлитного роста. Колонии по своим характеристикам аналогичны колониям культур 1-го биовара, но более крупные, а рост на жидких питательных средах несколько интенсивнее.

Морфология клеток возбудителя в культуре. Из агаровых и жидких культур готовят мазки, окрашенные по Граму, Гинсу (на выделение подвижности). Морфология клеток *A. pleuropneumoniae* аналогична таковой бактерий в исследуемом материале, но достаточно часто, наряду с палочковидными клетками (коккобактерии), обнаруживаются короткие палочковидные формы. В отличие от *B. bronchiseptica* клетки *A. pleuropneumoniae* подвижностью не обладают.

Идентификация *A. pleuropneumoniae* на уровне рода. Дифференциация представителей родов семейства *Pasteurellaceae* представляет определенные трудности в случае использования общепринятых феноменологических признаков. К роду *Actinobacillus* относят культуры грамотрицательных палочковидных бактерий, проявляющих тенденцию к образованию вязких колоний, клетки которых не имеют жгутиков, обладающие способностью к росту на агаре Мак-Конки, ферментирующие с образованием кислоты глюкозу, фруктозу, ксилозу, образующие фосфатазу, дающие отрицательные результаты в тестах на каталазу, оксидазу, Фогес-Простер, дающие отрицательный результат в пробе с метиловым красным, не ферментирующие твин-80, не ферментирующие дульцит, инозит, инулин. При идентификации *A. pleuropneumoniae* важнейшим признаком является отсутствие NAD-зависимости, поэтому перечисленные признаки более ответственны при идентификации культур NAD-независимого биовара.

Идентификация *A. pleuropneumoniae* на видовом уровне. На первом этапе посевом испытуемой культуры на кровяной или сывороточной питательный агар с экзогенным источником NAD («бактерии на кровяных дисках, пропитанные NAD») определяют ее NAD-зависимость. Культуры, показавшие зависимость от ростового фактора, имеющие характерные для *A. pleuropneumoniae* культуральные, морфологические и физиологические признаки, отбирают для дальнейшего изучения. При установлении происхождения материала, их приходится дифференцировать с единственным NAD-зависимого вида бактерий, который можно встретить при пневмониях свиней — *H. parasuis*. Основные отличительные признаки *A. pleuropneumoniae* 1-го биовара и *H. parasuis* следующие: 1) рост

не синтезирует гемолизины и не ферментирует D-маннит. *A. pleuropneumoniae* обычно образует β -гемолизины и расщепляет с образованием кислоты D-маннит; *H. parasuis* не образует уреазу, *A. pleuropneumoniae* всегда продуцирует этот фермент; *H. parasuis* растет на «шоколадном», сывороочно-дрожжевом агаре, агаре Левинталя более скудно, чем *A. pleuropneumoniae*, колонии образует более мелкие, клетки преимущественно палочковидные, а не в виде коккобактерий в отличие от *A. pleuropneumoniae*. В случае выделения культур бактерий, не зависящих от NAD, но сходных с *A. pleuropneumoniae* (что позволяет предполагать возможную их принадлежность ко второму биовару *A. pleuropneumoniae*), возникает необходимость дифференциации от более широкого круга бактерий.

Сходные признаки с *A. pleuropneumoniae*, включая гемолитическую и уреазную активность, имеет *B. bronchiseptica*. Для их дифференциации у культур определяют способность к утилизации цитратов в качестве единственного источника углерода (посев на среду Кристенсен), а также способность клеток и ферментацию углеводов. *B. bronchiseptica*, в отличие от *A. pleuropneumoniae*, использует цитраты,

имеет жгутики, не ферментирует углеводы, например фруктозу, галактозу, мальтозу, D-ксилозу и др., которые утилизирует *A. pleuropneumoniae*. Для дифференциации NAD-независимых культур *A. pleuropneumoniae* от биоваров *P. multocida* используют три основных признака: уреазная, гемолитическая активность, образование индола. *A. pleuropneumoniae* вырабатывает уреазу, как правило, гемолизин, но не образует, в отличие от *P. multocida*, индол. Внутри рода *Actinobacillus* NAD-независимый биовар возбудителя дифференцируют от других видов по группе признаков, представленных в таблице 76, а также по антигенной структуре и патогенности.

Серологическая идентификация культур возбудителя. Вид *A. pleuropneumoniae* антигенно гетерогенен, представлен двенадцатью биоварами с подразделением некоторых из них на подтипы.

Таблица 76 - Дифференцирующие признаки некоторых видов актинобацилл

Признаки	Вид бактерий			
	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. ligniereisi</i>	<i>A. equi</i>
Способность к росту на агаре Мак-Конки	-	+	+	+
Образование H ₂ S	+	-	+	-
Гидролиз эскулина	V	+	-	-
β-гемолиз	+ ¹⁾	+	-	-
Образование кислоты из маннита	+	-	+	-
Мслибиозы	-	+	-	-
млицина	-	+	-	-
трегалозы	-	+	-	-

¹⁾ — регистрируется не у всех штаммов; ²⁾ — варьирующий признак.

Антигенная обособленность сероваров выражена у недиссоциированных культур достаточно четко, хотя имеется тесное антигенное родство у некоторых сероваров. В РФ диагностические иммунные сыворотки против *A. pleuropneumoniae* как коммерческие препараты не выпускают. При наличии антисывороток серовариантную идентификацию штаммов *A. pleuropneumoniae* проводят в РА на стекле, в реакции коагуляции, непрямой иммунофлуоресценции, РДП.

Биопроба. Проводят с целью определения патогенных свойств зараженной культуры бактерий. Наиболее подходящей лабораторной моделью являются морские свинки живой массой 250-300 г. Заражение проводят интрана-зально под легким эфирным наркозом 18-24-часовой старой культурой в дозе $0,5-1,0 \times 10^9$ м.к. Вирулентные штаммы вызывают гибель животных в течение 1-4 суток после заражения. В симптомах поражения легких. На вскрытии у павших животных обнаруживают геморрагическую пневмонию, при достаточно длительном заболевании — фибринозный плеврит. Белые мыши несколько устойчивы к *A. pleuropneumoniae*.

Серологическая диагностика

Естественное переболевание свиней актинобациллезной пневмонией приводит к образованию тип- и видоспецифических антител. В серологические реакции (РСК, РА с 2-меркаптоэтанолом, иммунодиффузия, иммуноферментный метод) оценивают как методы групповой диагностики.

могут найти применение при комплектовании благополучных стад. Как метод индивидуальной диагностики РСК применим только к мелким хозяйствам, где число реагирующих невелико. Большинство авторов считают, что титр РСК 1:10 как диагностический. В РФ диагностические анализы для РСК и других серологических реакций не производят.

Питательные среды «Шоколадный» агар (агар с вареной кровью)

Содержит V (НАД)- и X-факторы. Агаровую питательную среду (МПА, агар Хоттингера) расплавляют на водяной бане и, не охлаждая, добавляют к несе 10-15% стерильной дефибрированной или нитрированной крови лошади, барана или кролика. После охлаждения питательной среды до 55-60°С ее перемешивают и разливают по чашкам Петри или пробиркам.

Агар Левинтала. Содержит V- и X-ростовые факторы. К расплавленной и затем охлажденной до 60°С агаровой среде добавляют, встряхивая, 10% (объем/объем) дефибрированной или нитрированной крови барана или лошади. Кровь вносят дробно (5-7 раз) при тщательном перемешивании в водяной бане (65°С). После внесения всего объема крови питательную среду нагревают до кипения и выдерживают в кипящей воде 15 минут. Затем среду вынимают из бани, на 2-3 минуты оставляют при комнатной температуре. Такую процедуру прогрева питательной среды повторяют трижды, затем среду помещают на 2 часа в водяную баню с температурой 60°С для осаждения сгустков свернувшейся крови. По истечении указанного срока прозрачную над осадочную часть питательной среды, не взмучивая осадок, разливают по чашкам Петри и пробиркам.

Бульон Левинтала. Готовят так же, как и агар Левинтала, но на основе жидкой питательной среды.

Сывороточно-дрожжевой агар. Содержит V-фактор. К расплавленной и остуженному до 45°С МПА или агару Хоттингера добавляют 5-10% сыворотки крови лошади, крупного рогатого скота, овцы или кролика и такое же количество дрожжевого экстракта.

Приготовление дрожжевого экстракта. Пекарские прессованные дрожжи (250 г) суспендируют до образования гомогенной взвеси в 1000 мл дистиллированной воды, кипятят на огне в течение 4-5 минут. Микробную массу осаждают центрифугированием, надосадочную жидкость пропускают через стерилизующие пластины фильтра Зейтца. Стерильный дрожжевой экстракт хранят при 4-5°С и используют в течение 8-10 су-

Сывороточно-дрожжевой бульон. Готовят так же, как и сывороточно-дрожжевой агар, но на основе жидкой питательной среды.

Питательные среды с добавлением чистых препаратов X- и V-ростовых факторов. В основную питательную среду (плотную, жидкую) вносят раствор NAD или протогема (X-фактор) или эти оба фактора в зависимости от ростовых потребностей микроорганизма. При этом необходимо учитывать, что NAD термолабилен, его необходимо стерилизовать фильтрацией и добавлять в охлажденную до 45°C среду.

Приготовление раствора NAD. Один грамм препарата растворяют в 100 мл дистиллированной воды, стерилизуют фильтрацией, добавляют в базовую питательную среду до конечной концентрации 1 мг/мл.

Приготовление раствора протогема. Вещество в количестве 0,1 г растворяют в 100 мл 1%-ного раствора Na_2CO_3 , стерилизуют автоклавированием. Растворы выдерживают длительное хранение при 4-6°C.

Селективная среда Controni с соавт. (1972). На чашки Петри засевают в явным агаром, содержащим 5% крови барана, засевают исследуемый материал. Затем кладут диск фильтровальной бумаги с раствором сапонина (5%) и бацитрацина (2 ЕД). Сапонин разрушает эритроциты, вокруг которых образуется зона гемолиза. Из разрушившихся эритроцитов высвобождаются X- и V-факторы, которые диффундируют в толщу питательной среды, обеспечивая рост зависимых бактерий.

Селективная среда Charin с соавт. (1983). К расплавленному «коладному» агару добавляют ванкомицин (5 мкг/мл), бацитрацин (1 мкг/мл) и клиндамицин (1 мкг/мл).

Лабораторная диагностика бортелиоза

Бордетеллы представляют собой аэробные, мелкие грамотрицательные коккобактерии, являются паразитами млекопитающих, обитают в ресничках эпителия дыхательного тракта. Относятся к роду *Bordetella*, который включает семь видов: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmseii*, *B. trematum*.

B. bronchiseptica является этиологическим агентом бронхитов у свиней, атрофического ринита свиней; у собак вызывает инфекционный трахеобронхит, нередко в сочетании с вирусными инфекциями. У человека — поражения верхних отделов респираторного тракта, при этом возможны септицемия или септицемии; *B. avium*, которую ранее именовали *B. pertussis*.

bronchiseptica — подобные бактерии, вызывает ринотрахеит и синусит у индюшат, цыплят и уток. *B. pertussis* — патоген человека и других приматов. *B. parapertussis* вызывает мягкие формы бордетеллеза человека, а также может быть причиной пневмоний ягнят.

Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования обычно являются взятые стерильным ватным тампоном образцы носовой, трахеальной слизи, участки пораженных веток.

Микроскопическая исследование исходного материала

Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Бордетеллы, независимо от видовой принадлежности, выглядят как мелкие грамтрицательные коккобактерии шириной 0,2-0,5 мкм, длиной 0,5-1,0 мкм; окрашиваются биполярно, располагаются одиночно, парно, редко — короткими цепочками. Вирулентные штаммы *B. bronchiseptica* имеют микрокапсулу. Фирма Health Gene выпускает набор для детекции возбудителя в ПЦР.

Питательные и идентификация бордетелл

Культивирование. Бордетеллы — строгие аэробы, температурный оптимум 37-38° С, рН питательных сред 7,2-7,6. Посев исследуемого материала проводят на кровяной, сывороточной агар, агар Мак-Конки. Поскольку объектом исследования чаще всего является контаминированный посторонней микрофлорой материал (носовая, трахеальная слизь), то предпочтительнее посев производить на селективные среды. При этом необходимо учитывать, что при наличие в материале бактерий, расщепляющих углеводы, может тормозить рост бордетелл, так как бордетеллы требуют слабощелочных или нейтральных значений среды, а контаминанты закисляют ее. Из числа селективных сред для изоляции *B. bronchiseptica* используют кровяной агар с клиндамицином и неомицином, пенициллинитрофурантоиновый агар, среду Мак-Конки, среду Smith и Walker с гентамицином, пенициллином, фуранта-доном (SB-среда). Растут на SB-среде культивируют без внесения антибиотиков. Посевы инкубируют в условиях обычной атмосферы в течение 24-48 часов.

B. bronchiseptica на кровяном (овца, лошадь) агаре формирует через 24 часа очень мелкие, выпуклые, с гладкой поверхностью и ровными кра-

ями колонии, обычно с зоной β -гемолиза. В наибольшей степени гемолитическая активность выражена на среде Борде-Жангу (рН 6,2-6,8). Колонии *B. avium* аналогичного типа, но обычно негемолитичны. На свежесве-выделенные культуры образуют гладкие, полупрозрачные, с блестящей поверхностью колонии диаметром 0,2-1,5 мм, которые после (48-72 часа) становятся серо-белыми. В зависимости от культуральных вариаций могут быть выявлены колонии трех типов: S-форма — 1-й тип, SR-форма — 2-й тип, R-форма — 3-й тип. На агаре Гартхофа колонии имеют беловатый цвет, на агаре Мак-Конки колонии мелкие, с розовой периферией и светлым центром. На селективной среде Smith-Rapin (SB-среда) колонии

B. bronchiseptica и *B. avium* через сутки инкубирования имеют радиусом около 0,5 мм, голубой цвет и с голубым окрашиванием среды внутри колонии, что свидетельствует о защелочении рН в зоне роста, тогда как колонии достигают размера 1,5-2,0 мм. Сходные по культуральным признакам сахаролитические бактерии вызывают закисление рН, поэтому колонии и окружающая среда приобретают желтоватый цвет. В жидких питательных средах (сывороточный МПБ) бордетеллы растут с равномерным помутнением среды, в последующем образуется осадок и при этом образуется кольцо, среда становится прозрачной.

Морфология клеток бордетелл в культуре. Морфология клеток в окрашенных препаратах из культур и патологического материала. Бордетеллы не образуют капсул. *B. bronchiseptica* и *B. avium*, в отличие от *B. parapertussis* и *B. pertussis*, имеют жгутики, поэтому обязательно выделяют культуру на подвижность.

Идентификация бордетелл на уровне рода. Бактерии рода *Bordetella* по морфологическим и тинкториальным свойствам сходны с бродячими, гемофильными бактериями и видами рода *Alcaligenes*. Для дифференциации от этих бактерий исследуют способность к росту в анаэробных условиях (гемофилы являются факультативными анаэробами); ферментацию углеводов (бордетеллы не закисляют среды с углеводами); зависимость от никотинамида (бордетеллы зависят от этого ростового фактора); редукцию нитратов (бордетеллы и гемофилы всегда редуцируют нитраты); окисление аминокислот (бордетеллы, в отличие от гемофильных бактерий, окисляют аминокислоты); редукцию тетразолия (бордетеллы, в отличие от видов рода *Alcaligenes*, редуцируют этот субстрат); использование цитратов (*B. bronchiseptica* использует цитраты); защелочение в среде молока (защелачивают бордетеллы и алкалигенес); способность к росту в питательных средах, содержащих 320 мг/л теллурита калия.

тотемы не растут). Данные дифференцирующие признаки представлены в таблице 77.

Таблица 77 - Дифференциальные признаки бактерий рода *Bordetella* и сходных с ним по морфологическим свойствам родов

Признаки	Роды			
	<i>Bordetella</i>	<i>Brucella</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Akkermansia</i>
Симбиотические паразиты	+	+	+	-
Аэробы	-	-	-	+
Способность к азоту	+	+	-	+
Способность к факторам роста:				
температура	-	+	-	-
осмотическая	+	-	-	-
кислотность (V)	-	-	+	-
Утилизация углеводов	-	-	+	-
Редукция нитратов	P	+	+	P
Способность к свертыванию лакмусового молока	+	-	-	+
Содержание аминокислот	+	+	-	+
Содержание тетразолия	+	н.д.	+	-
Рост в присутствии 2% раствора теллурита калия	-	н.д.	-	+
Содержание цитратов	P	-	-	+

н.д. — нет данных; P — признак различен в таксонах рангов (виды рода).

Идентификация бордетелл на уровне вида. С целью дифференциации видов внутри рода *Bordetella* исследуют подвижность клеток изолированной культуры, наличие гемолитической активности, способность к росту на агаре Мак-Конки, скорость роста на среде Борде-Жангу, продукция бурого пигмента на пептонном агаре, морфологию колоний на SV-среде, редукцию нитратов, образование уреазы, оксидазы, утилизацию нитрата. При наличии системы API можно дополнительно определить использование в качестве единственного источника углерода ацетата, адипата, мезо-тартрата, итатоната, сукцината. *B. bronchiseptica* способна использовать перечисленные субстраты, *B. avium* не использует мезо-тартрат и итатонат.

Серологическая идентификация бордетелл. При наличии бордетеллиновых агглютинирующих сывороток медицинского назначения можно провести серологическую идентификацию *B. bronchiseptica* и *B. pertussis*.

Серологическая идентификация может быть осуществлена по результатам просмотра первичных посевов. При обнаружении подозрительных колоний из них делают мазки, окрашивают по Граму. Если клетки окрашиваются, то делают мазки, окрашивают по Граму. Если клетки окрашиваются, то делают мазки, окрашивают по Граму. Если клетки окрашиваются, то делают мазки, окрашивают по Граму.

Таблица 73 - Дифференциация видов рода Bordetella, патогенных для животных

Признаки	Виды бордетелл		
	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. pertussis</i>
Подвижность	+	+	-
β-гемолиз	+ ¹⁾	-	-
Появление колоний на среде Борде-Жангу (дни)	1-2	1-2	3-4
Продукция бурого пигмента при росте на пептонном агаре	-	D	-
Морфология колоний на SB-среде	мелкие, голубые	мелкие, голубые	крупные, голубые
Редукция нитратов	+	-	-
Уреазы	+	-	-
Оксидаза	+	- ²⁾	-
Использование в качестве источника углерода цитрата	+	+	-
Рост на агаре Мак-Конки	+	+	-

Таблица 78 - Антигенная структура видов рода Bordetella

Антигены	Виды бордетелл		
	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. pertussis</i>
К-антигены общий для рода			
фактор 7	+	+	+
Специфические для рода факторы:			
1	+	-	+
14	-	-	+
12	+	-	-
Встречающиеся у отдельных штаммов факторы:			
2,3,4,5,6, 13			+
8,9, 10		+	
8,9, 10, 11, 13	+		
O-антиген, общий для рода	+	+	+

морфологическим и тинкториальным характеристикам бордетелл культуры проверяют в РА на стекле с родовой бордетеллальной культурой. В составе клеток бордетелл установлено наличие 14 антигенов (факторов). Родовым антигеном является фактор 7, который встречается у всех бордетелл. Видовыми факторами для *B. bronchiseptica* являются антиген 12, для *B. parapertussis* — 14. Типовыми факторами для *B. bronchiseptica* определены 8, 9, 10, 11, 13, для *B. parapertussis* — 8, 9, 10, 11, 13.

Фенолную агглютинацию на стекле ставят с адсорбированными видовыми факторными сыворотками, используя 48-часовые культуры. Используя такие факторные сыворотки, можно определить серотип.

Биопроба. Для подтверждения патогенности выделенных культур определяют у них наличие токсигенных и адгезивных свойств. *B. bronchiseptica* и *B. avium* синтезируют иммунологически не тождественные дермонекротические токсины, которые выявляют внутрикожной инъекцией на морских свинках. При введении молодых культур возбудителей внутрибрюшинно можно наблюдать летальный эффект. С целью обнаружения адгезинов *B. bronchiseptica* бактериальную массу из двух колоний суточной культуры суспендируют на предметном стекле в 10 мл физиологического раствора и добавляют равный объем 3%-ной взвеси отмытых эритроцитов барана. В положительных случаях агглютинация наступает через 1-2 минуты. В качестве контролей используют суспензию бактерий без эритроцитов и суспензию эритроцитов без бактерий.

Питательные среды

Селективная среда Smith-Baskerville (SB-среда)

Основную питательную среду, состоящую из 870 мл дистиллированной воды, 20 г пептона, 5 г натрия хлорида, 15 г агара, автоклавируют при 121°C в течение 15 минут, охлаждают до 55°C и вносят добавки.

Антимикробная добавка: гентамицин — 0,5 мкг/мл, пенициллин — 20 мкг/мл, фурантадон — 20 мкг/мл. Углеводная добавка: 10%-ный раствор стерильной глюкозы — 100 мл, 10%-ный раствор лактозы — 100 мл.

Индикатор: бромтимоловый синий 0,2%-ный раствор — 40 мл. Индикатор готовят, добавляя к 475 мл дистиллированной воды 250 мл 0,1N едкого натрия и 1,0 г бромтимолового синего.

Компоненты перемешивают и готовую среду разливают в чашки Петри.

Кровяной агар с селективными добавками. К базовой питательной среде добавляют клиндамицин до конечной концентрации 2 мкг/мл и неопалин — 4 мкг/мл.

Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота

Моракселлы являются грамотрицательными аэробными бактериями, относятся к роду *Moraxella*, обитают на слизистых конъюнктивы и в полости клинически здоровых животных. Основным патогенным видом — *M. bovis*, вызывает инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, его также выделяют при конъюнктивитах лошадей. Заболевание возникает на фоне предрасполагающих факторов, преимущественно у молодых животных до двухлетнего возраста. В этиологии болезни в качестве основного предрасполагающего фактора рассматривают действие естественного (солнечного) ультрафиолетового излучения.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является конъюнктивальный секрет. Выделитель отличается малой устойчивостью, поэтому материал помещают в небольшой объем (1-2 мл) стерильного физиологического раствора и используют не позднее двух часов после взятия, лучше производить выделение питательные среды непосредственно в момент взятия материала.

Микроскопическое исследование исходного материала

При микроскопии приготовленных препаратов, окрашенных по Граму находят короткие, вплоть до кокков, толстые, капсулированные грамотрицательные палочки размером 1,0-1,5 x 1,5-2,5 мкм, расположенные преимущественно парами, иногда — в виде цепочек.

Выделение и идентификация *M. bovis*

Культивирование. Для большинства видов рода, и в том числе *M. bovis*, характерны сложные пищевые потребности. Моракселлы растут на средах, обогатенных кровью или сывороткой крови, температурный оптимум 33-35° С, рН 7,2-7,6, аэробы. Материал засевают на кровяной или «шоколадный» агар и посева культивируют в условиях обычной атмосферы в течение 2-3 суток. На простом агаре возбудитель не растет.

Через 48-72 часа на кровяном агаре с кровью крупного рогатого скота или лошади образуются округлые, выпуклые или плоские серо-белые колонии диаметром до 1 мм, с зоной бета-гемолиза или без него. Считают, что гемолитичность — признак вирулентности штаммов. На «шоколадном» агаре зона гемолиза имеет темный цвет. Штаммы, выделенные от лошадей, проявляют гемолитические свойства только на «шоколадном» агаре. Колонии обычно вырастают в агар. Консистенция реальной массы крошковидная, и взвесь бактерий в физиологическом растворе нестабильна. В последующих пассажах колонии имеют вид

консистенцию, и бактериальная суспензия из них в физиологическом растворе не выпадает в осадок.

Морфология клеток моракселл в культуре. Морфология клеток в культуре и исходном материале однотипная, но на питательных средах часто появляются признаки полиморфизма: клетки варьируют по размеру, форме, могут присутствовать нити. Особенно сильно полиморфизм проявляется при недостатке кислорода, превышении температуры. Клетки мутуиков не имеют, может быть капсула.

Идентификация *M. bovis* на уровне рода. Группа сходных с моракселлами грамотрицательных палочковидных бактерий и кокков весьма обширна. Общим свойством моракселл и ряда сходных бактерий является отсутствие способности расщеплять углеводы с образованием кислот. Внутри этой группы нефферментирующих углеводов грамотрицательных бактерий моракселлы дифференцируют по признакам, изложенным в таблице 79.

Идентификация моракселл на уровне подрода и вида. Род *Moraxella* подразделяется на подроды *Moraxella* и *Branhamella*. К первому относятся виды, имеющие палочковидную форму с тенденцией к образованию кокков, ко второму — виды, представленные исключительно кокковыми клетками.

Таблица 79 - Некоторые дифференцирующие признаки моракселл и других неферментирующих углеводов бактерий

Признаки	Род бактерий					
	<i>Moraxella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>
Размножение	-	X	-	-	-	+
Гемолитическая активность	+	X	+	+	-	+
Рост на среде МПА	-	+	+	+	+	+
Термофильность	-	+	+	+	-	-

Как видно, моракселлы в этой группе представляют единственный род бактерий которого не растут на простом агаре.

M. bovis внутри подрода *Moraxella* от других видов дифференцируют по гемолитической, желатиназной, оксидазной, каталазной, фенилаланинаминазной, уреазной активности, способности к росту на агаре Мак-Конки.

Для *M. bovis* характерно наличие гемолитической активности, оксидазы, желатиназы (инкубация 7-14 суток), пептонизация лакмусового моло-

ка, чувствительность к пенициллину, образование каталазы и нитратов приблизительно у 14% штаммов, отсутствие образования лопы из Д-глюкозы, Д-ксилозы, Д-маннита, лактозы, сахарозы, фенилаланиндезаминазы, уреазы на среде Кристенсена, утилизация рата на среде Симмонса, образования индола. Возбудитель образует что выявляется в тесте с бумагой, пропитанной ацетатом свинца, отсутствует выделение H₂S при посеве в столбик TSI. *M. bovis* не растет на среде Мак-Конки.

Таким образом, к виду *M. bovis* относят культуры бактерий, не образующие пигмент, фенилаланиндезаминазу, уреазу, чувствительные к пенициллину, не растущие на простом МПА, агаре Мак-Конки. Достаточно характерен рост *M. bovis* в лакмусовом молоке, при этом верхняя часть среды приобретает синий цвет, казеин пептонизируется. Для биохимической идентификации подходит тест-система Enterotest (PLIVA-Lachema) и ее аналоги.

Таблица 80 - Критерии дифференциации моракселл внутри рода *Moraxella*

Признаки	Вид бактерий					
	<i>M. bovis</i>	<i>M. lacunata</i>	<i>M. phenylpyruvica</i>	<i>M. osloensis</i>	<i>M. nonliquefaciens</i>	<i>M. ...</i>
Гемолиз	(+)	-	-	-	-	-
Желатиназа	(+)	+	-	-	-	-
Оксидаза	+	+	+	н.д.	Н.Д.	Н.Д.
Каталаза	(-)	+	+	Н.Д.	н.д.	Н.Д.
Фенилаланиндезаминаза	-	-	(+)	-	-	-
Уреаза	-	-	-	-	-	-
Рост на агаре Мак-Конки	-	-	(+)	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.
Чувствительность к пенициллину 1 ЕД/мл	+	+	+	+	+	+

(+) — большинство штаммов положительные или отрицательные.

Биопроба. С целью подтверждения патогенных свойств культуры можно заражать внутрибрюшинно белых мышей. Вирусные штаммы вызывают летальный исход. Косвенным признаком вирулентности является четко выраженная гемолитическая активность.

Лабораторная диагностика инфекционного тромбоэмболического менингоэнцефалита крупного рогатого скота

Инфекционный тромбозомболический менингоэнцефалит крупного рогатого скота (ИТЕМЕ) — инфекционная остропротекающая септичесская болезнь, характеризующаяся симптомами поражения центральной нервной системы, органов дыхания, гениталий и суставов конечностей. Болезнь, как правило, развивается в виде респираторного синдрома, а на септической стадии поражаются различные органы и ткани. У овец возбудитель обнаруживается как комменсал генитального тракта и может быть причиной орхитов, эпидидимитов, пневмоний, маститов, полиартритов, септициемий.

Возбудитель — бактерия *Haemophilus somnus*. Исследования гомологии ДНК показали, что виды *Histophilus ovis*, *Haemophilus agni* и *Haemophilus somnus* представляют собой один вид, который должен быть исключен из рода *Haemophilus* и перенесен в род *Histophilus*.

Лабораторная диагностика ИТЕМЕ основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Прижизненно материал берут на острой стадии течения болезни у животных с повышенной температурой, не подвергавшихся обработке антибиотиками. Отбирают пробы крови, стерильными ватными тампонами — носовую слизь. В летальных случаях материал берут по возможности сразу после смерти животного: пробы трахеальной слизи, участки пораженных Легких, перикардальную и плевральную жидкость, сегменты тонкого кишечника с изменениями, субменингеальные мазки, сегменты мозга, цереброспинальную жидкость из латерального желудочка, фибринозный экссудат из пораженных суставов, лимфоузлы, регионарные урогенитальным органам. Материал доставляют в лабораторию в замороженном виде, лучше — при температуре ниже -60°C .

Микроскопическое исследование исходного материала

Из исследуемого материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и на капсулы. В положительных случаях обнаруживают грамотрицательные палочковидные, вплоть до кокковидных, бактерии с капсулой.

Выделение и идентификация возбудителя

Культивирование. *H. somnus* требует для своего роста повышенного содержания CO_2 (5-10%), в обычной атмосфере не растет. Температурный оптимум $37-38^{\circ}\text{C}$, рН питательных сред 7,8. Зависимости роста от X- и Y-факторов нет, хотя в первых пассажах возбудитель может

проявлять феномен роста около штриха *S. aureus* на сыровоточном (но не «шоколадном» или кровавом агаре). Свежевыделенные штаммы растут на общепринятых питательных средах, сыровоточном, гемолитическом агаре, ингредиенты которого стерилизовали автоклавированием. Плохо растут на «шоколадном» агаре. Оптимальной питательной средой для первичной изоляции возбудителя является агар с цитрированной кровью (5-10%) крупного рогатого скота. Кровь других животных стимулирует рост *H. somnus* хуже.

При незначительном содержании клеток возбудителя в исследуемом материале (данные микроскопии) целесообразно параллельно делать посевы на среду обогащения — сердечно-мозговой бульон с добавлением дрожжевого экстракта, крови крупного рогатого скота или зародков желточный мешок 7-дневные куриные эмбрионы. В случае отсутствия роста на кровавом агаре через 24-48 часов делают высевы со среды обогащения на кровавый агар.

На питательные среды целесообразно делать посев кусочками органов в жидкие среды помещают фрагменты исследуемых тканей. На кровавом агаре делают посевы в две чашки Петри, одну из которых культивируют в атмосфере CO_2 другую — в обычной атмосфере (контроль на присутствие других видов бактерий). Посевы инкубируют в течение 48-72 часов.

На кровавом агаре через 48 часов возбудитель формирует неясно-прозрачные, круглые, выпуклые, с гладкой поверхностью колонии диаметром 0,5-1 мм, достигающие через 72 часа 2 мм. Часть колоний (около 50%) может иметь узкую зону β -гемолиза. При длительном культивировании у колоний образуются конусовидный центр и плоская периферия. На поздних стадиях роста может появляться желтоватый пигмент. В сердечно-мозговом бульоне рост возбудителя проявляется незначительным помутнением среды.

Морфология клеток возбудителя в культуре. В первичных культурах возбудитель имеет склонность к полиморфизму: коккобактерии, палочки, нити. В субкультурах *H. somnus* чаще представлен граммотрицательными палочковидными или нитевидными формами, иногда образуются структуры неправильной формы. При микроскопическом исследовании колоний в агаровом блоке, окрашенном по Клинбергеру находят длинные извилистые нити с овоидными утолщениями, а также хорошо окрашенными полярными зернами и цепи из бактерий. Клетки имеют капсулу, жгутиков нет.

При просмотре первичных посевов обращают внимание на наличие колоний с грамблуживыми коккобактериями и палочками в чашках Петри, инкубированной в аэробных условиях (это могут быть палочки

ны и актинобациллы). Для исследования берут колонии бактерий, растущих только в присутствии CO₂.

Идентификация возбудителя по ферментативным свойствам. Идентификация *H. somnus*, как вида с неясным систематическим положением, проводится непосредственно на видовом уровне.

Для изучения ферментативных свойств отбирают колонии бактерий, которые не способны расти на обычном агаре и бульоне без ростовых добавок, а также в отсутствие CO₂ и имеют типичные для *H. somnus* культуральные, морфологические и тинкториальные признаки.

У выделенных культур исследуют каталазную, оксидазную активность, способность к редукции нитратов, образованию индола, уреазы, пениндекарбоксилазы, аргининдигидролазы, потребность в V- и X-ростовых факторах (посев на сывороточный агар с дисками, пропитанными растворами NAD и гемина), расщепление углеводов с образованием кислоты. Ферментативные характеристики *H. somnus* представлены в таблице 81.

Таблица 81 - Ферментативные свойства и ростовые потребности *H. somnus*

Признаки	Результат
Оксид аза	+
Редукция нитратов	+
Индол	+
Каталаза	-
Уреазы	-
Пениндекарбоксилаза	-
Аргининдигидролаза	-
Потребность в NAD	-
Потребность в X-факторе	-
Редукция нитратов	-
Образование кислоты из: фруктозы, D-глюкозы, мальтозы,	+
галактозы, D-маннозы, D-сорбита, трегалозы, D-ксилозы	-
Образование кислот из: адонита, α-арабинозы, целлобиозы	-
инвертина, инулина, лактозы, мелибиозы, раффинозы, салицина, сахарозы	-

Серологическая идентификация возбудителя

При наличии гипериммунных сывороток может быть проведена серологическая идентификация возбудителя в РА или иммуноферментным методом. Использование РА осложняется склонностью культур к спонтанной агглютинации. С целью получения антигена культуру выращивают в РР.О-бульоне с фильтрованным дрожжевым экстрактом на шуттель-аппарате в течение 24 часов. Клетки осаждают центрифугированием, осадок осаждают в ве-роналовом буфере (рН 8,0), осадок ресуспендируют в ве-

роналовом буфере (1/30 исходного объема). Суспензию прогревают при 60° С в течение 45 минут. Прогретые культуры не дают самоагглюляции. Пробирочную РА ставят общепринятым способом с разведенной пробирки до титра. Пробирки выдерживают при 37-38° С в течение 48 часов и учитывают результат.

Серологическая диагностика. Широко распространенное носительство возбудителя и частое инapparантное течение инфекции привели к тому, что приблизительно в 50% обследованных стад в РСК реакция положительно от 10 до 100% животных. В то же время переболевшие страдают лишь к кратковременному и небольшому повышению уровня циркулирующих антител, что делает пока нецелесообразным практическое использование серодиагностики болезни.

Питательные среды

Кровяной агар. В качестве основы используют агар Хоттингера (7,8). К расплавленному и остуженному до 45° агару добавляют 1:100 стерильной свежей цитрированной крови крупного рогатого скота, компоненты перемешивают, среду разливают по чашкам Петри.

Сердечно-мозговой бульон («Дифко»). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 12,5 г сухого мозгового отвара, 10,0 г протеинового, 2,0 г декстрозы, 5,0 г натрия хлорида, 2,5 г двуназиевого фосфата, регулируют рН 7,8, стерилизуют при 121° С 15 минут. Стерильную среду обогащают добавлением 5% стерильного дрожжевого экстракта, или 10% стерильной крови крупного рогатого скота, или оба компонента.

Лабораторная диагностика контагиозного метрита лошадей

Контагиозный метрит лошадей — инфекционная болезнь, характеризующаяся развитием эндометрита, цервицита. Обычно возникает после случки кобылы с жеребцом-бактерионосителем. На 6-8-й неделе после случки может произойти аборт или резорбция плода. У жеребцов инфекция клинически не проявляется. Возбудитель — бактерия *Teylorella genitalis* (прежнее наименование — *Haemophilus equigenitalis*), относящаяся к недавно сформированному роду *Teylorella*, в котором является единственным видом.

Бактериологическое исследование

Наружные половые органы обмывают антисептическим раствором (KMnO₄ 1:1000), осушают салфетками. Стерильными тампонами берут пробы слизи из препуциальной ямки головки клитора (клиторные пробы). Цервикальные пробы (цервикальная слизь) берут при помощи стерильных полистироловых осеменительных пипеток и влагалищного зеркала. У жеребцов объектом исследования являются пробы, взятые увлажненными тампонами с головки пениса, препуция, уретрального канала.

Возбудитель отличается слабой устойчивостью. Материал доставляют в лабораторию не позднее 3-4 часов после взятия. Лучшие для транспортировки использовать специальную среду Timoney P.Y. и соавт. (1982). Если материал до посева выдерживают в закисленной среде (рН 4), то возбудитель погибает в течение 3-5 минут.

Микроскопическое исследование исходного материала

Этот метод исследования дает информацию только при клинически выраженной инфекции в случае исследования воспалительного экссудата матки. Мазки окрашивают по Граму. Возбудитель в окрашенных препаратах грамотрицательный, имеет форму коротких палочковидных, вплоть до кокковидных клеток размером 0,7 x 0,7-5,0 мкм.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Возбудитель — микроаэрофил (10% CO₂), температурный оптимум 36-37° С (диапазон 30-42° С), рН 7,2-7,6; на обычных средах не растет, на кровяном и сывороточном агаре не растет или рост очень слабый; хорошо культивируется на «шоколадном» агаре, но в зависимости от присутствия V-или X-ростового факторов не проявляет. В условиях обычной атмосферы или в анаэробных условиях возбудитель растет плохо. Материал дробно высевает на «шоколадный» агар в чашках Петри. Используют для изготовления среды кровь лошади. Поскольку материал содержит сопутствующую микрофлору, целесообразно проводить посевы на селективные среды со стрептомицином, амфотерицином и кристалливиолетом. Возможно выделение стрептомициночувствительных штаммов, поэтому рекомендуется посев производить одновременно на две селективные среды: «шоколадный» агар со стрептомицином и «шоколадный» агар с амфотерицином и кристалливиолетом (Тейлор К. и соавт., 1978).

Посевы инкубируют при 37° С в атмосфере 10% CO₂. Макроскопически видимый рост обычно появляется через 48 часов, но иногда позднее,

поэтому в отрицательных случаях посевы рекомендуется выдерживать в течение 7 суток.

На «шоколадном» агаре через 2-4 суток инкубирования в оптимальных условиях формируются круглые, выпуклые, с блестящей поверхностью и конусовидным центром полупрозрачные колонии, первоначально диаметром 0,25-1 мм, позднее — до 1,5-3 мм, цвет колоний от светлого кремового до коричневого.

На кровяном агаре колонии имеют диаметр 0,3-1 мм, цвет от светлого белого до коричневого, заметна зона α -гемолиза, которая отчетливо видна только на 5-7-й день культивирования. Гемолитическая активность в большей степени проявляется при использовании эритроцитов человека, в меньшей — овцы.

Характерна консистенция колоний на плотных питательных средах. При надавливании бактериологической петлей колонии скользят по поверхности среды. После помещения бактериальной массы старых культур в воду образуется гель, что заметно при изготовлении мазков для окраски по Граму.

В жидких питательных средах (сердечно-мозговой бульон) на 1-3 сутки инкубирования рост возбудителя проявляется легким помутнением среды.

Морфология клеток возбудителя в культуре. В мазках из культур, окрашенных по Граму, возбудитель представляет собой грамотрицательные палочковидные клетки (0,7 x 0,7-1,8 мкм), иногда почти сферические. Могут быть выявлены нитевидные формы, капсулы и жгутиков.

Идентификация возбудителя по ферментативным свойствам. *T. equigenitalis* является на сегодня единственным представителем рода *Tetrasphaera* при бактериологическом исследовании могут быть выделены штаммы других видов бактерий других родов, от которых возбудитель необходимо дифференцировать на первом этапе исследования: *Wolinella recta*, *Wolinella ureolyticus* и *Bacteroides gracilis*. Перечисленные виды обитают в организме человека и в исследуемом материале могут присутствовать как контаминанты. С указанной целью определяют у выделенных культур подвижность, наличие уреазы, оксидазы, способность к восстановлению нитрата и нитрита. Для дальнейшего изучения отбирают бактерии, имеющие жгутиков, не образующие уреазу, обладающие оксидативной активностью, не редуцирующие нитраты и нитриты.

У культур контролируют отсутствие способности к росту в анаэробной атмосфере, наличие фосфатазы. Фосфатазную активность проверяют следующим образом: в 0,5 мл трисбуфера (рН 8,0) суспензируют петлей подозрительных колоний, добавляют 0,5 мл раствора

динитрофенилфосфата (1 мг/мл), смесь выдерживают при 37° С в течение 2 часов. Положительный результат — желтое окрашивание. *T. equigenitalis* вырабатывает фосфатазу. В случае необходимости проверяют другие ферментативные свойства и ростовые потребности. Для *T. equigenitalis* свойственно отсутствие потребности В V-и X-ростовых факторах, хотя последний несколько стимулирует рост, отсутствие синтеза лецитиназы, утилизации цитратов, продукции индола, сероводорода, Р-галактозидазы, желатиназы, аргинин и лизиндекарбоксилазы, окисления глюконата, образования кислоты из сахарозы, глюкозы, мальтозы, арабинозы, рибозы, ксилозы, эскулина, декстрозы, дульцита, галактозы, маннозы, маннита, рамиозы, сорбита, целлобиозы, лактозы, раффинозы.

Сахаролитические свойства испытывают посевом на среды Гисса с 10% сыворотки крови, 1% испытуемого углевода, 0,002% бромкрезола метилового.

Серологическая идентификация возбудителя. При наличии гипериммунных сывороток возможна идентификация возбудителя в реакции агглютинации или коаггутинации. РА на стекле целесообразно использовать на стадии отбора подозрительных колоний, при этом допускается слабая спонтанная агглютинация бактерий в контроле с физиологическим раствором. Более специфической и чувствительной считается реакция коаггутинации. Антительный диагностикум готовят обычным способом, используя стафилококк, содержащий А-протеин. Для отчетливой агглютинации необходимо, чтобы исследуемая бактериальная суспензия содержала как минимум 6×10^5 клеток возбудителя. Одновременно ставят контроль на спонтанную агглютинацию. Учет результатов проводят через 15 минут.

Идентификация *T. equigenitalis* в ПЦР. Разработана тест-система для выявления возбудителя в исследуемом материале в реакции цепной полимеризации. Учитывая сложность культивирования возбудителя и его выделения, особенно в случае исследования бактерионосителей, применение ПЦР оправдано при оценке статуса животных, предназначенных на экспорт.

Биопроба. Лабораторные животные к *T. equigenitalis* не чувствительны. В случае отрицательного результата бактериологического исследования можно использовать биопробу на кобылах. Для ее постановки берут смegu у жеребцов из уретральной ямки, уретры, препуция, пениса, у кобыл из клиторного синуса и ямки. Смegu разбавляют в 30 мл дистиллированной воды и инкубируют при помощи осеменительной пипетки в

матку кобыле. Если смегма содержит возбудитель, то через три дня можно выделить из цервикальной или маточной слизи. Одновременно заражения и после заражения (7-14-е сутки) у кобылы исследуют поротку крови на наличие антител в РСК и РА.

Серологическая диагностика

Болезнь сопровождается синтезом гуморальных и секреторных антител. В основном используют методы, основанные на обнаружении гуморальных антител.

В РСК и пробирочной РА антитела удается выявить на 7-14-е сутки после заражения, и они достигают максимума к 15-20-е суткам (РСК 1:1512; РА 1:80-1:640), затем их уровень довольно быстро снижается, особенно в РСК. Поэтому позитивные показания этих серологических реакций обычно совпадают с клиническими признаками болезни и могут помочь в уточнении этиологии воспаления гениталий. Довольно трудно обнаружить бактерионосителей при помощи РСК и РА, как правило, выявить удается. В отдаленные сроки целесообразнее использовать более чувствительные серологические реакции (иммуноферментный метод, РИФ).

В России в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике контагиозного метрита лошадей» (1984) для серологической диагностики болезни рекомендована пробирочная РА. В качестве антигена применяют инактивированную формалином (0,25%) пасту бактерий концентрацией 10 млрд.м.к. в 1 мл по оптическому стандарту чистоты. РА ставят в объеме 1 мл, на 3%-ном растворе натрия хлорида (7,2-7,4) в разведениях 1:20 и 1:40. Учет результатов проводят через 30 часа. Как положительный результат оценивают реакцию интенсивнее, чем на три креста и более в разведении 1:40, сомнительный — на два креста в разведении 1:20 или на один-два креста в разведении 1:40.

При постановке РСК антиген готовят из 72-часовой культуры, высушенной на «шоколадном» агаре. Бактериальную массу смывают в буфером (рН 7,4), трижды отмывают центрифугированием, ресуспендируют в буферном растворе и консервируют мертиолатом (1:10 по объему). Более разведение антигена определяют в опыте титрации обычным способом. Реакцию ставят в объеме 1 мл. Исследуемую сыворотку крови инaktivируют при 56° С в течение 30 минут. Эритроциты барана берут в концентрации 1%.

Первую фазу РСК проводят при 4-5° С в течение 17 часов. Для стабилизации индикаторной системы компоненты выдерживают в водяной бане при 37° С в течение 1 часа.

Питательные среды

«Шоколадный» агар. Готовят обычным способом (см. «Возбудитель гемофильного полисерозита поросят») на базе агара Мартина, Хоттингера (рН 7,2-7,4) с добавлением 10% крови лошади.

Селективный агар с амфотерицином и кристаллвиолетом. К расплавленному и остуженному «шоколадному» агару добавляют амфотерицин В (5 мкг/мл) и кристаллвиолет (1 мкг/мл).

Селективный агар со стрептомицином. К расплавленному и остуженному до 45° С «шоколадному» агару добавляют раствор стрептомицина в расчете конечной концентрации 200 мкг/мл.

Лабораторная диагностика сапа

Сап - инфекционная болезнь однокопытных, протекающая преимущественно хронически, характеризующаяся возникновением на слизистых оболочках, во внутренних органах узлов, склонных к казеозному распаду с формированием язв. Восприимчивы лошади, ослы, мулы, а также львы, тигры, рыси, белые и бурые медведи. Болеет человек, но если у животных в 90% случаев наблюдается хронический сап, то у людей, как правило, он проявляется в острой форме.

Поводитель болезни — граммотрицательная, аэробная палочковидная бактерия *Burkholderia mallei*, род *Burkholderia*, семейство *Pseudomonadaceae* (ранее *Pseudomonas mallei*). Лабораторная диагностика сапа животных основана на результатах бактериологического и серологического исследований. Основными методами диагностики являются серологические, к бактериологическому исследованию прибегают редко и проводят его только в специализированных лабораториях.

Бактериологическое исследование

Для исследования берут мокроту, гной, отделяемое вскрывшихся абсцессов, пунктаты абсцессов, пораженные участки органов, лимфатические узлы, кровь. При отсутствии патологических изменений — легкие с регионарными лимфатическими узлами, подчелюстные и заглоточные лимфоузлы. При необходимости материалы консервируют 30%-ным раствором глицерина, хранение материала при 4° С в этом случае допускается до 10-15 суток.

Микроскопическое исследование исходного материала, обнаружение антигенов *B. mallei* в материале

Мазки из материала окрашивают по Граму, метиленовой синью Леффлера, по Романовскому-Гимза. *B. mallei* представляют собой тонкие прямые или слегка изогнутые грамотрицательные палочки с заостренными концами размером 0,5-1 x 2-4 мкм. При окраске по Романовскому-Гимза, синькой Леффлера, в клетках, за счет гранул метиленового гидроксibuтирата, выявляется зернистость, что нередко приводит к ложной окраске. Используют иммунологические методы обнаружения возбудителя в исследуемом материале (МФА, ИФА, РНГА).

Выделение и идентификация культур *B. mallei*

Культивирование. *Burkholderia mallei* — строгий аэроб, температурный оптимум — 37° С, диапазон 20-45° С, оптимум рН 6,5-7,2, в питательных средах не требователен, лучше растет на средах с глицирином (4-5%). Исследуемый материал высевают на глицеринизированный МПА, МПБ, кровяной МПА. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры в питательные среды рекомендуется вносить основной фунгицид 1:100 000, кристаллический фиолетовый 1:200 000, бриллиантовый зеленый 1:100 000. Посевы культивируют при 37-38° С. Макроскопически видимый рост обнаруживается уже через 24-48 часов инкубирования, позже.

На глицеринизированном агаре возбудитель образует через сутки крупные, плоские, серовато-белые, с перламутровым блеском, полупрозрачные колонии слизистой консистенции, постепенно сливающиеся в единый, прозрачный налет. На картофельно-глицериновой среде возбудитель синтезирует пигмент, что считается важным диагностическим признаком. Через 2-3 суток на картофельных пластинах вырастают мелкие, прозрачные, с желтоватым оттенком колонии, которые сливаются. Образуется слизистый медообразный налет, цвет которого меняется от желтого (1-3 дня) до буро-коричневого или буровато-красного (6-8 дней). Независимо от цвета колонии сохраняют свою прозрачность. В 5% глицерина возбудитель вначале растет в виде мутной взвеси. Через 24-48 часов формируется пристеночный осадок в виде слизистых тяжей и тонкая сероватая слизистая пленка. Образующийся осадок при взбалтывании поднимается в виде тяжелой, среда полностью не просветляется. При посеве уколом в желатину наблюдается поверхностный рост в виде сероватого налета в верхней части укола. Желатина не разжижается, в зоне роста наблюдается желтое окрашивание.

Морфология клеток *V.mallei* в культуре. При выращивании на питательных средах возбудитель проявляет склонность к полиморфизму: образуются более мелкие клетки (кокковидные формы), выявляются цепочки, концы клеток могут быть закругленными, заостренными или со шпигунами. В старых культурах на М П Б формируются пилы из 4-8 клеток. Спор, капсул, жгутиков клетки не образуют, зернистость в клетках старых культур окрашивается метакромиатично.

Идентификация выделенных культур *V.mallei*. Выделенные культуры после микроскопического исследования пересевают на глицеринизированный картофель. На стадии изучения подозрительных культур используют иммунологические методы идентификации возбудителя: РА, РНГА, МФА, ИФА. У выделенных чистых культур исследуют способность к росту при разных температурах, на разных питательных средах, ферментативные характеристики. Ключевыми тестами для дифференциации *V.mallei* от других псевдомонад является тест Хью — Ляйфсона, образование кислоты из глюкозы, отсутствие кислоты на среде с сахарозой, утилизация цитрата на среде Симмонса, восстановление нитрата, отсутствие газа из нитрата, лизиндекарбоксилазы, неспособность к росту при 42° С, синтез аргининдигидролазы (табл. 78). При дифференциации *V.mallei* от наиболее сходного вида *V.pseudomallei* существенны тесты на неспособность к образованию газа из нитрата, способность к росту в МПБ без NaCl, неитонизация молока, образование орнитиндекарбоксилазы.

Серологическая идентификация *V.mallei*. На стадии работы со смешанными, а позже — с чистыми культурами серологическая идентификация возбудителя может быть проведена в ИФА, МФА, РНГА, РА, РП.

Биопроба. Проводят с целью обнаружения возбудителя в исследуемом материале и подтверждения патогенных свойств выделенной культуры на золотистых хомячках, морских свинках.

Суспензию исследуемого материала на физиологическом растворе вводят кошкам под кожу затылка. В положительных случаях развивается генерализованный процесс с гибелью животного уже через семь суток. При менее вирулентных штаммах процесс идет медленнее — появляются язвы, главным образом на конечностях, на лицевой части головы, животное чихает, наблюдается гнойное истечение из носовой полости. Летальный исход наступает через 3 недели и позднее.

Морским свинкам (самцам) чистую культуру или неконтаминированный материал вводят внутрибрюшинно, загрязненный материал или смешанную культуру — подкожно в область шеи. На месте инъекции при возможном заражении образуется узелок, вскрывающийся на 4-5-е сутки

с формированием язвы. После внутрибрюшинного заражения и в отдельных случаях развивается отечность мошонки, орхит, периорхит (феномен Штрауса, скротальный феномен). Через 8-15 дней часть животных

Таблица 82 - Дифференциация *V. mallei* и *V. pseudomallei*

Признаки	Вид бактерий	
	<i>V. mallei</i> % положительных реакций	<i>V. pseudomallei</i> % положительных реакций
Морфология	Коккообразные прямые палочки средней длины	
Подвижность жгутики	-	+
Действие на кровь	100	40
Брожение или окисление	окисление	окисление
Образование кислоты из Д-глюкозы	100	100
Глицерола	12 (50) ¹⁾	86 (14)
Д-маннитола	62 (14) ¹⁾	94 (16)
Лактозы	12 (62) ¹⁾	99 (1)
Саламаны	0	66 (14)
Мальтозы	(75) ¹⁾	99 (1)
Каталаза	100	100
Оксидаза	25	100
Рост на среде Мак-Конки	88	100
SS	0	8 (31)
<i>C. питриозиды</i>		7 (3)
Питая среда Симмонса	0	77 (4)
Мочевина, среда Кристенсена	12	13 (8)
Восстановление нитрата	100	100
Газ из нитрата	0	100
Индол	0	0
Скошенный агар TSI, кислота	0	72
Столбик TSI, кислота	0	0
H ₂ S (столбик TSI)	0	0
H ₂ S (близко к индикатору (H ₂))	100	26
Разжижение желатина	0	79
Такисовое молоко	0	96
Пигмент пасторовимый	0	51-белый
Нерастворимый	0	
Рост при 25° С	100	100
35° С	100	100
42° С	0	100
Гипохлорит эскулина	0	59
Лизиндекарбоксилаза	0	0
Аргининдиазидолаза	100	100
Опнитиндекарбоксилаза	100	0
МПБ. 0% NaCl	0	100
МПБ. 6% NaCl	0	12

¹⁾ (—) Результат может проявиться с задержкой, необходима инкубация 7—14 суток. ²⁾ Давления 7—14 суток.

погибает. На пике заболевания морских свинок убивают, вскрывают и делают мазки — отпечатки из органов, окрашивают по Граму, исследуют материал в МФА, ИФА, РНГА, проводят посевы на питательные среды с целью выделения чистой культуры возбудителя. Следует учитывать, что скротальный феномен не является строго специфической реакцией

может наблюдаться при введении *P.aeruginosa*, *B.pseudomallei* и некоторых других бактерий. Хомячкам материал вводят в дозе 0,5-1 мл. Наблюдение за животными осуществляют в течении 15 суток.

Серологическая диагностика

Основной метод серологической диагностики сапа животных — РСК, в недавних пор — пластинчатая РА с сапным цветным антигеном. Согласно действующей инструкции предписывается применение РА вместо обычной маллеиновой пробы и РСК. Разработан и испытывается для целей серодиагностики сапа методом РНГА эритроцитарный антигенный диагностикум.

В РСК исследуют сыворотки в разведениях 1:5 и 1:10. Обычно сыворотки крови инактивируют в водяной бане 30 минут при 58-59° С, ослов и мулов — при 62-63° С. Первую и вторую фазу РСК проводят в водяной бане 20 минут при 37-38° С. Учет результатов реакции проводят сразу после завершения второй фазы РСК и на следующий день, при условии хранения пробирок в холодильнике. Диагностическим титром сыворотки считается разведение 1:10. За положительный результат принимают задержку гемолиза на 3-4 креста в разведении 1:10, независимо от результатов — в разведении 1:5. Сомнительным результатом считают реакцию на 1-2 креста в разведении 1:10, при параллельной задержке гемолиза в разведении сыворотки 1:5 — на 3-4 креста. Во всех других случаях реакцию считают отрицательной.

Лабораторная диагностика мелиоидоза

Мелиоидоз (ложный сап) — редко встречающееся инфекционное заболевание некоторых видов животных и человека в районах Юго-Восточной Азии, северных провинциях Австралии, в виде спорадических случаев в странах Европы, Африки, Северной Америке, Китае. В РФ мелиоидоз не регистрируется. Мелиоидоз характеризуется лихорадкой, катарально-гнойным воспалением слизистых оболочек, образованием кавернозных узелков и гнойных очагов в различных органах и тканях. В естественных условиях восприимчивы к мелиоидозу грызуны, собаки, кошки, свиньи, овцы, крупный рогатый скот, лошади, ослы, а также человек. Возбудителем болезни является грамотрицательная палочковидная бакте-

рия *Burkholderia pseudomallei*, род *Burkholderia*, ранее *Pseudomonas pseudomallei*. **Лабораторная диагностика** болезни основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

Материалом для бактериологического исследования при жизни служат: гнойное отделяемое язв, содержимое абсцессов, кровь, моча, мокрота, выделения из носовых отверстий, глаз. Посмертно берут участки пораженных тканей, кровь, кусочки внутренних органов, лимфатические узлы. Взятие и пересылку материала проводят согласно режиму работы с особо опасными инфекциями.

Микроскопическое исследование исходного материала, обнаружение антигенов и ДНК возбудителя

Из материала готовят мазки для окраски по Граму, люминисцентного серологического и иммуноферментного исследования. В положительных случаях в мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают полиморфно-грамотрицательные, нередко биполярные палочковидные бактерии с округленными концами размером 3-6х0,3-0,6 мкм. Клетки возбудителя окружены массивной слизистой капсулой. По данным ученых, присутствие капсулы отражает определенный антигенный состав и вирулентность возбудителя. Апробирована ПЦР с целью выявления ДНК возбудителя в исследуемом материале.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *B. pseudomallei* — факультативный анаэроб. Температурный оптимум 37° С, диапазон 14-44° С, рН питательных сред 7,0, диапазон 5,6-8,5. Возбудитель не требователен к питательным средам, но лучше растет на субстратах с добавлением 4-5% глюкозы. Обычно посев производят на мясопептонный агар и бульон с глюкозой. Контаминированный материал рекомендуется в течение 3 часов обработать пенициллином (1000 ЕД/мл) и высевать на МПА с кристаллическим телом (1:200 000), на синтетическую среду с Р-аланином и пенициллином. Посевы инкубируют при 37° С, в аэробных условиях в течение 5-6 дней.

ежедневно просматривая. *B.pseudomallei*, в отличие от *B.mallei*, не способен расти при 42° С.

Отличительной особенностью *B.pseudomallei* от *B.mallei* является способность к росту на средах без глицерина. В положительных случаях на МПА с глицерином через сутки инкубирования формируются мелкие, полупрозрачные, сероватого цвета колонии с ровными краями, выпуклые, с гладкой поверхностью, которые напоминают колонии эшерихий, но более мелкие. На кровяном агаре некоторые штаммы вызывают агемолиз. Нередко вырастают крупные слизистые колонии, диаметром до 6 мм, правильной круглой формы, выпуклые, слегка опалесцирующие. Наиболее часто колонии этой морфологии образуются при исследовании сывороты.

На вторые сутки и позднее колонии теряют прозрачность, проявляются признаки диссоциации: часть колоний остаются блестящими, гладкими, с ровными краями, у других формируется шероховатая или складчатая поверхность, неровный, зубчатый край, они отдаленно напоминают старые колонии микобактерий туберкулеза. Таким образом, в посевах могут присутствовать S-, R-, M- и промежуточные формы колоний.

В МПБ рост возбудителя через 10-12 часов характеризуется легким помутнением среды, через 24-30 часов помутнение становится сильным, образуется осадок и поверхностная пленка, которая спустя 4-5 суток делается складчатой, превращается из серо-желтоватой в коричневатую, после добавления нейтрального красного пленка окрашивается в оранжево-красный цвет. Культуры *B.pseudomallei* имеют специфический запах плесени.

Морфологические и тинкториальные свойства *B.pseudomallei* в культуре. В мазках из культуры клетки возбудителя имеют морфологию, сходную с наблюдаемой в патологическом материале; клетки мелкие, располагаются единично, парами, короткими цепочками, «обоймами» по 3-7 штук. При старении культур образуются скопления по 8-10 штук, объединенные слизистой массой; клетки с возрастом удлиняются, появляется зернистость, одновременно обнаруживаются коккобактерии. Для клеток, окрашенных по Граму и другими анилиновыми красителями, характерна биполярность, спор не образуют, подвижны, движение клеток брадикинетической или змеевидное. На сывороточных средах возбудитель образует капсулу.

Идентификация *B.pseudomallei* по ферментативным свойствам. Для *B.pseudomallei* характерно наличие аргининдигидролазы, оксидазы, желатиназы, гидролиз крахмала, денитрифицирующая активность, использование глюкозы, трегалозы, мезо-инозитола, d-валина, β-аланина,

d-аргинина, Д-рибозы, леулината, эритритола, α-амиламина, инертно по отношению к гераниолу, Д-ксилозе, d-рамнозе, сахарату, цитрату, мезаконату, Д- и мезо-тарtrat. Критерии дифференциации *B. pseudomallei* представлены в таблице 79. Согласно этим данным, для возбудителя тифоида свойственна, в отличие от *B. mallei*, способность образовывать газ из нитрата (100% штаммов), кислоту на скошенном агаре ТМ (100% штаммов), расти на среде Симмонса (77% штаммов), разжижать желатин (79% штаммов), изменять лакмусовое молоко (96% штаммов).

Отмечается непостоянство утилизации *B. pseudomallei* органических соединений. Причина такого явления окончательно не выяснена, но постоянный признак может рассматриваться окисление галактозы, маннозы, эскулина, амилона, декстрина; непостоянный — окисление арабинооксилозы, глюкозы, леулезы, лактозы, мальтозы, трегалозы, раффозы, глицерина, маннита, инулина; постоянно отрицательный — окисление окисления рамнозы, сахарозы, салицина, дульцита, инозита, сорбита, адонита. Система комбинированного тестирования ферментативной активности API 20 E позволяет идентифицировать только 50–63% штаммов возбудителя. Более эффективны системы Minitek и EPA — 18 ML. Первершенство методов идентификации возбудителя по фенотипическим признакам подтверждает перспективность молекулярно-генетической диагностики мелиоидоза.

Серологическая идентификация возбудителя. На различных этапах бактериологического исследования может быть использован метод обнаружения ресцирующих антител, РНГА, ИФА. При просмотре первичных культур на плотных питательных средах отбирают «подозрительные» колонии и проверяют их в РА на стекле. Коммерческая иммунная мелнионная пробирка агглютинирует в разведении до 1:160 культуры всех штаммов *B. pseudomallei*. В РА, при использовании поликлональной сыворотки, нельзя дифференцировать *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Возбудитель тифоида имеет антигены, родственные довольно широкому кругу гетерологичных видов бактерий, но наиболее близок по спектру антигенов с *B. mallei*. По результатам РА отбирают культуры для дальнейшего изучения ферментативных свойств с целью окончательной идентификации.

Биопроба. Проводят с целью выделения культуры возбудителя из соответствующего материала и установления патогенных свойств и патогенности культуры. Биопробу проводят на морских свинках, золотистых хомячках и крысах (крысы резистентны к *B. mallei*). Если материал не заражен посторонней микрофлорой, то его вводят животным внутрибрюшинно.

противном случае — подкожно или наносят на скарифицированную кожу. Морским свинкам и крысам вводят соответственно по 1,0 и 0,5 мл суспензии исследуемого материала. При наличии возбудителя на месте введения материала у животных развивается отек, некроз ткани, иногда образуется язва, увеличиваются лимфатические узлы, в них образуются абсцессы, в паренхиматозных органах (легкие, печень, селезенка) формируются множественные абсцессы, заболевание сопровождается лихорадкой. Морские свинки погибают через 8-10 дней после заражения, золотистые хомяки — через 3-5 дней. У зараженных самцов может развиваться феномен Штрауса (см. «Сап»). Павших и погибших животных исследуют бактериологически с использованием всех вышеперечисленных методов.

Серологическая диагностика

Для целей серодиагностики мелиоидоза применяют пробирочную РА, РСК и РПГА. РА при мелиоидозе малочувствительна и недостаточно специфична. Считается, что титры 1:8-1:160 могут иметь диагностическое значение. Но более достоверны результаты исследования парных сывороток крови, показывающие повышение титра антител. РСК по чувствительности и специфичности превосходит РА. В качестве антигена используют водорастворимые экстракты из клеток. Однако в РСК нельзя дифференцировать из-за антигенного родства возбудителей мелиоидоза и холеры. Специфичность РПГА определяется характером антигена на эритроцитах. У больных животных и людей, как правило, титры в РПГА составляют 1:320-1:2560.

Лабораторная диагностика псевдомоноза

P. aeruginosa относится к категории условно патогенных бактерий, часто обнаруживается на слизистых оболочках животных, на фоне снижения резистентности макроорганизма может вызывать септицемии, бронхопневмонии, абсцессы, маститы, аборт, поражения мочевого тракта, постоперационные осложнения. *P. aeruginosa* известен как возбудитель псевдомоноза норки. *Pseudomonas aeruginosa* является аэробной, грамотрицательной бактерией, относящейся к семейству *Pseudomonadaceae*, роду *Pseudomonas*, который объединяет более двадцати видов. Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Материал для исследования зависит от локализации патологического процесса, вызванного *P. aeruginosa*, прижизненно это может быть гнойный или гнилостный экссудат, посмертно — пораженные участки легких при пневмонии, лимфатические узлы, селезенка, печень, почки и т.д. Материал желательно отбирать непосредственно из очага воспаления, отделяя его, если таковое имеется, а также до начала антибиотикотерапии или после ее выведения антибиотика из организма.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из исследуемого материала готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму. Клетки *P. aeruginosa* имеют вид прямых или слегка изогнутых грамотрицательных палочек размером 1,5-3x0,5-1,0 мкм, располагающихся одиночно, парами, в виде коротких цепочек. Вирulentные штаммы продуцируют значительное количество капсулоподобного вязкого вещества. В мазках — отпечатках из тканевого материала возбудитель *P. aeruginosa* часто обнаруживаются внутри фагоцитов.

Выделение и идентификация культур *P. Aeruginosa*. Культуральное возращение. *Pseudomonas aeruginosa* — аэроб, температурный оптимум — 37° С, диапазон 4-42° С, рН — 7,2, к питательным средам неприхотлив. Исследуемый материал высевают на МПА, кровяной МПА или сывороточную среду, содержащую цетилтриметил аммония бромид (цетривин), в которой другие псевдомонады не растут. Посевы культивируют в аэробных условиях при 35-37° С в течение 24 часов.

На МПА *P. aeruginosa* формирует крупные (2-5 мм), сероватые, неровными, волнистыми распространяющимися плоскими краями, прозрачные, с гладкой поверхностью и приподнятым центром, часто отливающие металлическим блеском, кроме того, могут быть мелкие, шероховатые колонии, напоминающие маргаритки. Штаммы, выделенные из респираторного и мочеполового тракта, могут образовывать слизистые или мукоидные колонии. На кровяном агаре колонии окружены зоной β-гемолиза. Культуры *P. aeruginosa* имеют ферментативный запах, прозрачные среды в процессе роста окрашивают в желтый или зеленовато-желтый цвет. Пигментообразование — важный физико-химический признак, обнаруживаемый приблизительно у 80% штаммов. Для выявления пигмента исследуемую культуру выращивают на средах «А» и «В» в течение суток при 35° С. Пигмент пиоцианин растворяется в воде и хлороформе, окрашивает питательные среды в синее-зеленый

Цвет пигмента у культур на специальных средах для выявления псевдомонад варьирует от бледно-голубого до темно-синего или зеленого на среде «А» и ярко-зеленого на среде «В». *P. aeruginosa* — единственный известный вид бактерий, продуцирующий пиоцианин. В щелочной среде пиоцианин имеет голубой цвет, в кислой — розовый. Для выявления этого пигмента культуру выращивают на скошенном агаре, вносят 1-2 мл хлороформа, перемешивают, хлороформ при наличии пиоцианина синеватый. Окрашенный хлороформ переносят пипеткой в пробирку и вносят 1-2 капли 1N HCl, после чего пиоцианин розовеет (кислая среда). Пиоцианин наиболее часто образуют вирулентные штаммы *P. aeruginosa*. Пигмент флуоресцин (пиовердин) — зеленый пигмент, растворим в воде, но не в хлороформе, флуоресцирует при освещении культуры, выращенной на среде «В» в темноте, ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 254 мμ, его вырабатывают большинство штаммов. Синтез пиовердина стимулирует среда «В», а также культивирование при 25° С. Цвет пигмента пиовердина у культур на среде «А» варьирует от розового до темно-коричневого. Пигмент пиомеланин — темно-коричневый, синтезируют некоторые штаммы *P. aeruginosa* на среде «В». Часть изолированных штаммов (8-18%) может не образовывать пигменты, что затрудняет идентификацию и требует проведения дополнительных исследований свойств культуры. Спектр пигментов, образуемых *P. aeruginosa* и другими псевдомонадами, представлен в таблице 79. Определение наличия пигмента и его типа — важный этап в идентификации *P. aeruginosa*.

В МПБ рост *P. aeruginosa* проявляется образованием поверхностной серебристо-белой пленки, что считается характерным признаком. Позднее среда мутнеет (вначале в верхней части столбика среды, далее — в нижней), формируется серовато-белый осадок. За счет пигмента среда приобретает сине-зеленый цвет, который позднее становится бурым.

Морфология клеток *P. aeruginosa* в культуре. Морфология клеток в культуре идентична таковой в препаратах из патологического материала. Клетки подвижные, имеют один, иногда два полярных жгутика, способность к слизиобразованию в процессе пассирования на питательных средах быстро утрачивают, спор не образуют. Подвижность исследуют микроскопически у бульонных культур, выращенных при 18-20° С.

Идентификация *P. aeruginosa* с учетом температурного диапазона роста, пигментообразования и ферментативных признаков

При обнаружении в материале культур, способных расти на цетрином агаре, образующих колонии с признаками, характерными для *P. aeruginosa*, проводят микроскопическое исследование мазков, окра-

шенных по Граму. Исследуют способность к слизиобразованию, индолитообразованию и тип пигмента.

Таблица 83 - Пигментообразование у *P.aeruginosa* и некоторых других псевдомонад

Вид бактерий	Тип пигмента		
	Диффундирующие флуоресцирующие	Диффундирующие нефлуоресцирующие	Недиффундирующие нефлуоресцирующие
<i>P.aeruginosa</i>	+	+ сине-зеленый	-
<i>P.alcaligenes</i>	-	-	d желто-оранжевый
<i>P.caryophylli</i>	-	+ желто-зеленый	-
<i>P.cerаста</i>	-	+ различные	-
<i>P.chlorarphis</i>	+	-	+ зеленый или оранжевый
<i>P.cichorii</i>	+	-	-
<i>P.delafieldii</i>	-	-	-
<i>P.diminuta</i>	-	-	-
<i>P.facilis</i>	-	-	-
<i>P.fluorescens</i> биотип I	+	-	-
биотип II	+	-	-
биотип III	+	-	-
биотип IV	+	-	-
биотип V	+	-	+ синий
<i>P.gliadioli</i>	-	+ желто-зеленый	-
<i>P.mendocina</i>	-	-	+ желто-оранжевый
<i>P.nickettii</i>	-	-	-
<i>P.pseudoalcaligenes</i>	-	-	-
<i>P.putida</i> биотип A	+	-	-
биотип B	+	-	-
<i>P.saccharophila</i>	-	-	-
<i>P.solancearum</i>	-	d коричневый	-
<i>P.stutzeri</i>	-	-	-
<i>P.syringae</i>	+	-	-
<i>P.vesicularis</i>	-	-	+ желто-оранжевый
<i>P.viridiflava</i>	+	d сине-зеленый	-

В случае выявления типичных грамтрицательных палочек проверяют их оксидазную и каталазную активность.

Для дальнейшего исследования отбирают колонии оксидазо- и каталазопозитивных бактерий. Исследуют у выделенных культур подвижность, способность к восстановлению нитратов, образованию нитрита, нитрата, пеп-тонизации молока, гидролизу желатин, утилизации углеводов, синтезу пигментов (см. выше), аргининдигидролазы, способность к росту при 25° С, 35° С, 42° С, в МПБ без NaCl, образованию кислоты из D-глюкозы, D-ксилозы, D-маннита. Для *P.aeruginosa* характерны следующие

ства, отраженные в таблице 80. Может быть использована тест-система NITERV test 24 (PLIVA-Lachema).

Серологическая идентификация

У *P. aeruginosa* выявлено семнадцать O-сероваров. Существовало много различных схем их обозначения, которые объединены в одну международную на основе схемы Habs, соответствие которой прежним схемам представлено в таблице 81. Строение O-антигенов возбудителя внутри этих групп отражено в таблице 82.

Кроме O-сероваров у возбудителя идентифицированы H-серовары, которые в отличие от сальмонелл не имеют вариаций. По H-антигенам *P. aeruginosa* подразделяют на 1 и 2-ю группы. В свою очередь, в первой группе выделяют подгруппы H:1a и H:1b, а во второй — 6 подгрупп. По данным многих авторов, большинство клинических штаммов *P. aeruginosa* при использовании коммерческих агглютинирующих сывороток удается отнести к O-сероварам 2, 3, 6, 7 и 11.

Для идентификации культур *P. aeruginosa*, выделенных при псевдомоните норки, на уровне O-серогруппы, в РФ рекомендуется использовать набор из трех поливалентных и одиннадцати моновалентных сывороток. Как антиген применяют 18-20-часовую агаровую культуру концентрацией 3-5 млрд. микробных клеток в 1 мл, инактивированных кипячением в водяной бане в течение 1,5 часов. Культуру (антиген) первоначально исследуют с поливалентными сыворотками (№ 1 — 03, 04, 05, 06, 07; № 2 — 02, 08, 09; № 3 — 010, 011, 012) и при получении положительного результата — с моновалентными, входящими в состав той или иной поливалентной сыворотки. РА проводят в капельном варианте на стекле, результат учитывают через 3-6 минут.

Питательные среды. Цетримидный агар. Цетримид (цетилметилзонмония бромид) — 0,3 г; пептон — 20,0 г; магниевый хлористый — 1,4 г; калий серноокислый — 10,0 г; глицерин — 10,0 г; агар — 13,0 г; вода дистиллированная — до 1000,0 мл; pH среды — 7,2.

Таблица 84 - Свойства *P. aeruginosa*

Признаки	% положительных реакций
Образование кислоты из:	97
глюкозы	
галактозы	90
маннита	70
кетозы	<1
арабинозы	0
рабытозы	<1

Каталаза	100
Оксидаза	99
Рост на среде: Мак-Конки	100
SS-агаре	96
Цетримид-агаре	94
Утилизация питтата	95
Уреаза на среде Кристенсен	48
Восстановление нитратов	98
Газ из нитрата	93
Индол	0
Скошенный агар TSI. кислота	0
Столбик TSI. кислота	0
H ₂ S (столбик TSI)	0
H ₂ S (бумага с ацетатом Рb)	4
Желатиназа	82
Лакмусовое молоко	89 (пептонизация)
Пигмент:	65
Пиовердин	
Пиоцианин	46
Пиорубин	25
Другие	23 (пиомеланин)
Рост при 25° С	100
35° С	100
42° С	100
Гидролиз эскулина	0
Лизиндекарбоксилаза	0
Аргининдигидролаза	100
Орнитиндекарбоксилаза	0
МТБ, 0% NaCl	100

Примечания: SS — агар — сальмонелла — шигелла — агар.

**Таблица 85 - Соответствие схем обозначения O-антигенов
P.aeruginosa (Беляков В.Д. и соавт., 1990)**

Международная	Habs	Honma	Lanyi	Verder- Evans	Fiseher	Meitert
1	1	10	6	4	4	13
2	2	2	3	-	3,7	2
3	3	1	1	6	-	5
4	4	6	11	-	-	8
5	5	7	3	1	7	6
6	6	8	4	2	1	1,4
7	7	3	5	8	6	3
8	8	3	5	8	6	3
9	9	4	10	9	-	14
10	10	9	2	-	5	11
11	11	5	7	3	2	15
12	12	14	13	7	-	7
13	-	12	-	-	-	-

	-	12	-	5	-	-
	-	11	12	-	-	-
	-	13	3	-	-	-
	-	-	-	-	-	10
	-	16	-	10	-	16

Цетримидный агар готовят следующим образом: агар с экстрактом сердечной мышцы (Difko) — 40 г, цетримид — 4 мл 22,5%-ного раствора в дистиллированной воде, вода дистиллированная — до 1000,0 мл. Среду разливают по 5 мл в пробирки, автоклавируют при 121°C в течение 15 минут, скашивают. Испытуемую культуру инкубируют при 35°C до 7 суток. Культуры *P. aeruginosa* на этой среде растут.

Среда А («Tech») для выявления пигментообразования. Бактериотон (Difko) — 20 г; глицерол — 10; хлористый магний — 1,4 г; сернокислый калий — 10 г; агар — 15 г; дистиллированная вода — 1000 мл, pH регулируют до 7,2, автоклавируют в пробирках при 121°C 15 минут.

Среда В («Flo») для выявления пигментообразования. Протеозонтон № 3 (Difko) — 20 г; глицерол — 10 мл; фосфорнокислый калий двухзамещенный безводный — 1,5 г; MgSO₄ x 7 H₂O — 1,5 г; дистиллированная вода — до 1000 мл. Стерилизуют в пробирках при 121°C 15 минут.

Таблица 86 - Строение O-антигенов *P.aeruginosa*

Группа	O-антигены	
	групповые	парциальные
1		-
2a		2b ;2c ;2d ;2d2e ;2d2f ;2b2e ;2b2c
3a		3b;3b3c;3d
4a		4b;4c
6a		6b;6c;6d
7a		7b7c;7b7d;7d
9a		9b9d;9c;9d
10a		10b;10c
11a		11b;11c
12		-
13a		13b;13c
14		-
15		-

Примечание: Одинаковые буквенные наименования антигенов обозначают их идентичность только в пределах одной группы. Парциальный состав О-антигенов групп 1, 12, 14 и 15 не кодифицирован.

Агар с экстрактом сердечной мышцы (Difko). Экстракт сердце-мышцы крупного рогатого скота — 500 г; Васто-триптон — 10 г; водный натрий — 5 г; Васто-агар — 15 г; дистиллированная вода — 1000 мл.

Лабораторная диагностика некробактериоза

Некробактериоз — инфекционная болезнь, характеризующаяся гангрено-некротическими поражениями, локализующимися на нижних конечностях, а в отдельных случаях — в ротовой полости, на половых органах, в печени, легких, мышцах и других тканях и органах. Возбудителем болезни является анаэробная грамотрицательная бактерия — *Fusobacterium necrophorum*. Род *Fusobacterium* содержит 17 видов. В клинических образцах от животных, наряду с *F. necrophorum*, могут быть выделены другие виды фузобактерий: из кишечного тракта — *F. gonidioformans*, *F. necrogenes*, *F. russii*, *F. pseudonecrophorum*, из ротовой полости — *F. simiae*. В зависимости от вида и возраста животных проявление некробактериоза может иметь некоторые особенности.

F. necrophorum в сочетании с *Actinomyces pyogenes* вызывает фибринозно-некробактериоза, именуемую дифтерией телят, которая сопровождается образованием некротических фокусов в области гортани, трахеи, ротовой полости, а также абсцессов в печени. У взрослого крупного рогатого скота *F. necrophorum* также может быть причиной поражения конечностей, метритов, маститов. У овец *F. necrophorum* вызывает преимущественно поражение конечностей, кожи губ, слизистых ротовой полости, половых органов. У свиней некробактериоз при кожной форме сопровождается поражениями в области шеи, туловища, вымени, конечностей, ушей, хвоста. Могут развиваться некротический энтерит, абсцессы в печени. У лошадей некробактериоз чаще проявляется в виде гангренозного дерматита конечностей, у северных оленей — флегмоны, вызванной воспалением нижних фаланг конечностей, артритами. У собак поражаются хвост, кожа вокруг ануса, лапы, слизистые губ и носа.

Лабораторная диагностика некробактериоза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Для исследования прижизненно берут соскобы на границе здоровой и некротизированной ткани из области венчика, межкопытной щели, ротовой полости, ноздрей и т.д. Трупы мелких животных доставляют в лабораторию целиком, от крупных животных — паренхиматозные органы и ткани с некротическими очагами. Следует учитывать, что материалы из тяжелых поражений, слизистой ротовой и носовой полостей, гортани, кишечника, содержат другие анаэробные грамотрицательные бактерии из категории представителей нормальной микрофлоры и не только рода *Fusobacterium*, что значительно осложняет исследование. По указанной причине вероятность выделения культуры возбудителя выше, если объектом исследования является гной из абсцессов, жидкость из пораженных суставов, грудная или перитонеальная жидкость, внутренние органы с поражениями. Возбудитель отличается слабой устойчивостью, поэтому образцы материала в лабораторию необходимо направлять в кратчайшие сроки, желательно в анаэробных контейнерах. Для транспортировки образцов подходит модифицированная транспортная среда Сагу-Най. Материал лучше транспортировать и хранить при температуре выше температуры холодильника, так как при низких температурах кислород сорбируется сильнее. В любом случае материал должен быть подвергнут исследованию в течение нескольких часов после взятия.

В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике некробактериоза» (М., 1985) материал для лабораторного исследования направляют в свежем виде или консервируют 30%-ным раствором глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала. Мазки готовят по Граму, методу С.Н.Муромцева и Л.Новиковой (цит. по Борову В.М., 1960). В последнем случае препараты фиксируют спиртом-формалином (4:1) в течение 10 минут и затем 30 секунд окрашивают раствором фуксин-синьки. Микроскопическая картина: фон — фиолетово-розовый, бактерии — сине-голубые. Приготовление красителя: основной фуксин — 0,15 г, этанол 95° — 20 мл, фенол — 10 мл, метиленовый синий — 0,25 г, вода — 200 мл.

Четкая микроскопическая картина получается при фиксации мазков спиртом-эфиром и окрашивании в течение 2-3 секунд фуксином Циля. Может быть использована окраска по Романовскому-Гимза. В мазках-отпечатках из исследуемого материала *F. necrophorum* имеет форму длинных, иногда переплетающихся, неравномерно окрашенных грамотрицательных

нитей, длиной 10-100 и более мкм, шириной 0,75-1,0 мкм. Длинны часто имеют утолщения. Кроме нитей обнаруживаются единичные расположенные палочковидные клетки или цепочки из нескольких. Концы могут быть округлыми или заостренными. Нитевидные формы преобладают в пораженной ткани на границе со здоровой. Ближе к здоровой ткани количество нитей уменьшается. В мазках, сделанных со здоровой некротического фокуса, возбудитель обычно обнаруживается в виде коротких палочек, нити встречаются реже. В мазках из плевральной и перикардиальной жидкости возбудитель имеет преимущественно форму длинных нитей.

В мазках из материала могут быть выявлены формы *F.pseudonecrophorum*, которые чаще имеют форму правильных коротких палочек или кокков. *F.russii* обнаруживается в форме нитей, без утолщений, концы заостренные. Короткие и кокковидные клетки, как правило, не встречаются.

F.simiae обычно имеет форму палочек с заостренными концами. Формы с утолщениями и колбовидных форм нет. *F.necrophorum* и *F.gonidiaformans* по морфологии идентичны *F.necrophorum*. *F.simiae* преимущественно имеет форму правильных палочек с заостренными концами.

Кроме того, в материале из пораженных конечностей нередко встречаются бактерии из рода *Bacteroides* — *Bacteroides nodosus*, клеточки которого грамотрицательные, размером 1,7x3-6 мкм, нередко с утолщениями на одном или обоих концах, располагаются единично или парами. *Bacteroides melaninogenicus* имеет форму грамотрицательных палочек (0,5-0,8x0,9-2,5 мкм), иногда в виде коротких нитей; *Bacteroides fragilis* и *Bacteroides levii* имеют форму грамотрицательных палочек размером 1,3x1,6-8 мкм, располагающихся единично, парами. Таким образом, в окрашенных препаратах из контаминированного материала могут присутствовать сходные по морфологии и тинкториальным свойствам бактериальные клетки. Клетки *F.necrophorum* имеют определенное сходство не только с фузобактериями и бактероидами, но и с клетками некоторых грамположительных бактерий родов *Eubacterium* и *Clostridium*, которые при окраске по Граму легко обесцвечиваются.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Возбудитель — строгий анаэроб, оптимальное разрежение — 4-10 мм ртутного столба, температурный оптимум 37°C, pH 7,4-7,6, лучше растет на средах с добавлением крови, сыворотки крови, глюкозы, лактозы, дрожжевого экстракта.

Первичные посевы обычно производят на плотные питательные среды с последующей отливкой культур на жидкие среды. Из жидких сред посев материала проводят на среду Кита-Тароцци, мартеновский бульон, а также с добавлением 10% стерильной крови барана или крупного рогатого скота, а также 0,4% глюкозы. Используют тиогликолатный бульон с К-казеиновой добавкой. Посев на жидкие среды целесообразно проводить при малом содержании возбудителя в исследуемом материале, с последующим высевом культуры на плотные среды. Для лучшего роста в жидких питательных средах добавляют 0,4% глюкозы и витаминную и минеральную добавку, сыворотку крови. Перед использованием среды обязательно выдерживают в течение 20-30 минут в кипящей водяной бане и охлаждают до 37-38° С. По данным Я.Р.Коваленко, *F.necrophorum* растет в стерильной сыворотке крови. Из полужидких сред может быть использован ПЖА по Муромцеву с добавлением 5-10% сыворотки крови, 0,4% глюкозы, 0,2% цистина.

В качестве плотных сред для первичной изоляции возбудителя применяют глюкозный (1%), сывороточный (10-20%) агар, глюкозо-кровяной агар. Агаровые среды готовят непосредственно перед посевом или выдерживают перед использованием в течение 6-24 часов в анаэробных условиях. С целью стимуляции роста возбудителя рекомендуется добавлять кровяной экстракт, витамин К и гемин. Для создания условий анаэробности используют общепринятые методы: культивирование на жидких средах под слоем вазелинового или парафинового масла, добавление в среду редуцирующих веществ, на плотных средах в анаэрогатах с удалением воздуха при помощи вакуумного насоса до необходимой степени разрежения или заменой воздуха газовой смесью (H_2 - 10%, CO_2 - 5%, N_2 - 85%) либо с использованием газ-пакетов (см. «Культивирование анаэробов»).

При исследовании загрязненного посторонней микрофлорой материала рекомендуют для подавления протей добавлять к агару 5,5-6% этанола (10%) перед его разливом в чашки Петри. На такой среде протей теряет способность к ползучему росту и образует округлые, выпуклые, с ровными краями колонии. Культивирование посевов проводят при 36-37° С в течение 5-7 суток, с ежедневным просмотром.

На сывороточно-глюкозном агаре через 48-72 часа инкубирования возбудитель формирует очень мелкие росинчатые колонии диаметром до 1 мм, которые через 4-5 суток достигают диаметра 2-3 мм. Колонии округлые или продолговатые, с гладкой блестящей поверхностью, ровными или слегка зазубренными краями, в центре небольшое углубление, структура мелкозернистая, цвет серовато-белый или зеленоватый до жел-

товатого. При выращивании на кровяных агаровых средах (кровь барана) гемолитическая активность варьирует, гемолиз типа β или α . Колонии легко снимаются с поверхности среды и эмульгируются в физиологическом растворе. При культивировании на желточном агаре большинство штаммов проявляют липазную, но не лецитиназную активность. При засеивании методом заливок в глубине глю-козного агара на 4-5-е сутки образуются небольшие чечевицеобразные серовато-белые колонии. Цвет и форма колоний зависят от плотности агара. В сывороточном агаре на 2-3 суток формируются непрозрачные четко контурированные колонии, видимыми под малым увеличением микроскопа отходящими нитями.

На полужидком печеночном агаре (0,15%) через 24-72 часа инкубирования возбудитель растет в виде облачка с интенсивным помутнением среды и заметным газообразованием. На мозговой среде возбудитель растет хорошо, после добавления к среде раствора сернистой кислоты происходит ее почернение ввиду выделения возбудителем сероводорода. В среде Кита-Тароцци рост наблюдается через 15-48 часов инкубирования в нижних слоях питательной среды, позднее — в верхних. Через 10 часов среда просветляется, на кусочках печени формируется белый разный налет, разбивающийся при встряхивании в равномерную взвесь. Слабое газообразование отмечается только на ранней стадии роста культуры. Для улучшения роста возбудителя в среду добавляют 10% крови или сыворотки крови крупного рогатого скота или барана. В стерильной сыворотке крови *F.necrophorum* через 24-48 часов инкубирования растет в виде сероватых нитевидных хлопьев по всему столбику среды, с последующим формированием осадка.

Морфология клеток *F.necrophorum* в культуре

В первичных культурах, в печеночном бульоне с добавлением сыворотки крови клетки имеют форму нитей с утолщениями, без разветвлений, длиной 10-100 мкм и шириной 0,5-0,7 мкм. В старых бульонных культурах и агаровых преобладают палочки длиной 1,8-2 мкм, шириной 0,5-0,7 мкм. Характерным является неравномерное зернистое очертание клеток возбудителя, что хорошо проявляется при фиксации спиртом-эфиром и окрашиванием в течение 2-3 секунд фуксином Цейля или тиленовым Синим Леффлера или фуксином-синькой по Муромцеву. *F. necrophorum* спор, капсул и жгутиков не образует.

Идентификация *F.necrophorum* по ферментативным признакам

При изучении ферментативной активности у выделенной чистой культуры определяют способность гидролизовать гишшурат, эскулин, образовывать индол, сероводород, кислоту из углеводов. Для возбудителя пастеробактериоза характерно: отсутствие способности к гидролизу глицерина

меланина, образованию кислоты из галактозы, маннозы, целлобиозы, меланоны, сахарозы, трегалозы, раффинозы, салицина; возбудитель постоянно расщепляет глюкозу, дает кислотообразование на среде с фруктозой, сахарозой, мальтозой. Отдельные штаммы могут ферментировать инулин, дульцит, глицерин; не расщепляет желатину и свернутую сыrovяжку, не редуцирует нитраты, образует индол и сероводород. Критерии дифференциации *F.necrophorum* от сходных фузобактерий представлены в таблице 84. При изучении ферментативной активности фузобактерий могут быть использованы коммерческие анаэробные идентификационные системы (API 20A, API - LYM, ATB 32A, Minitek anaerobic 11). Вид *F.necrophorum* неоднороден по биологическим свойствам, что позволяет выделить в нем 4 биотипа (таблица 87).

Биопроба

Проводят с целью выделения чистой культуры возбудителя и проверки патогенных свойств. Выделение чистой культуры возбудителя, ввиду частой контаминации материала сопутствующей микрофлорой, путем посева на питательные среды не всегда успешно. Поэтому изоляция возбудителя с использованием биопробы имеет существенное диагностическое значение. Из лабораторных животных чувствительны кролики и белые мыши. Наиболее удобной лабораторной моделью является кролик. Биопробу проводят одновременно с посевом материала на питательные среды. Исследуемый материал растирают в физиологическом растворе (1:10) и вводят кроликам в дозе 0,5-1 мл подкожно в область средней трети наружной поверхности уха или внутрикожно в область живота. Белым мышам материал вводят в дозе 0,2-0,4 мл подкожно у основания хвоста. В случае необходимости аналогичным образом животных заражают выделенной культурой. Наблюдение за животными осуществляют в течение 10 суток. В положительных случаях на месте инъекции через 3-4 дня или позднее развивается воспалительный процесс с некрозом кожи.

**Таблица 87 - Дифференциальные признаки видов
рода *Fusobacterium***

Признаки	Биотипы					
	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. pestovocines</i>	<i>F. russii</i>	<i>F. simiae</i>	<i>F. gonidiformans</i>	<i>F. pseudonecrophorum</i>
Гидролиз гиппурата	-	-	-/+	+	V	н.д.
Гидролиз эскулина	-	+	-	-	-	-
Рост в среде с желчью (20% КРС)	-/+	-/+	-	+	-	+
Образование индола	+	-	-	+	+	+
Образование H ₂ S	+	+	-/+	+	+	+
Гемолиз	β/a	$\beta/-$	$-\beta$	-	$a/-$	-
Образование кислоты из: Глюкозы	-/w	w/+	-	+	-	w
Галактозы	-	н.д.	-	-	-	-
Маннозы	-	w/+	-	-	-	-
Фруктозы	w/+	w/+	-	+	-	w
Целлобиозы	-	-/w	-	-	-	-
Мелибиозы	-	-/w	-	-	-	-
Сахарозы	-	-/w	-	-	-	-
Трегалозы	-	w/-	-	-	-	-
Рафинозы	-	-/w	-	-	-	-
Салицина	-	-/w	-	-	-	-

Примечание: w — слабая реакция; н.д. — нет данных; v — варьирующая реакция

У кроликов при заражении в кожу живота процесс распространения на подкожную клетчатку, брюшные мышцы, развивается перитонит. При генерализации процесса некротические очаги возникают в печени, селезенке, легких и других органах. При заражении под кожу уха на месте инъекции формируется язва, затем наступает парез уха и некроз кожной ткани. При заражении слабовирулентными штаммами процесс развивается медленнее и некротические очаги обнаруживаются во внутренних органах.

Таблица 88 - Свойства биотипов *F. necrophorum* (Fiever, 1961)

Признаки	A	Биотип АВ	B	C
Агглютинация куриных эритроцитов	+	+/-	-	-
Гемолизин	+	+	+	-
Оседание в жидкой питательной среде	-	+/-	+	-
Патогенность для мышей суточной бу- льонной культуры	+++	++	+	-

У пораженных мышей некротический процесс локализуется в коже у основания хвоста, захватывает глубокие ткани. Мыши обычно погибают через 6-10 дней после заражения.

При обнаружении некротических очагов материал берут на границе здоровой и пораженной ткани для микроскопического исследования и посева на питательные среды. Рекомендуется брать для выделения чистой культуры возбудителя у кролика на последней стадии заболевания крови из сердца (2 мл) и высевать на сывороточный (10%) агар (рН 7,0) методом заливок. Из выросших колоний культуру возбудителя отвивают на жидкие питательные среды (10%-ный сывороточный бульон).

От павших или убитых на 4-5-е сутки зараженных животных, помимо некротических кожных поражений исследуют материал из очагов во внутренних органах. В этом случае вероятность выделения чистой культуры выше.

Лабораторная диагностика копытной гнили овец и коз

Копытная гниль — инфекционная, хронически протекающая контактная болезнь овец и коз, характеризующаяся мацерацией и воспалением кожи свода межкопытной щели, прогрессирующим гнойно-некротическим распадом копытного рога и хромотой.

Возбудитель — анаэробная, грамотрицательная, неспорообразующая палочковидная бактерия *Bacteroides nodosus*, рода *Bacteroides*, семейства *Bacteroidaceae*. Род *Bacteroides* содержит более сорока видов, часть из которых наряду с *B. nodosus* могут быть выделены из Клинических материалов от животных. **Лабораторная диагностика** копытной гнили основана на результатах бактериологического исследования

Бактериологическое исследование

Для микроскопического исследования готовят мазки-отпечатки из свежеспоразженных участков основы кожи копытцев и слизи, покрывающей кожу межпальцевых щелей. Для биопробы материал берут из различных участков копытцев и используют для постановки биопробы немедленно.

Для выделения культуры возбудителя и транспортировки жидкий материал отсасывают в стерильные шприцы, удаляют из них воздух, иглы стабилизуют. Посмертно отбирают кусочки свежеспоразженной ткани размером 1 см³. Материал можно также собирать стерильными тампонами, свободными от кислорода, стерилизованными во флаконах, заполненных азотом. Процедуру взятия материала такими тампонами проводят максимально быстро и затем тампон глубоко погружают в транспортную среду

Cary-Blair. Кусочки тканей, шприцы с материалом помещают в специальные анаэробные контейнеры, пластиковые термостабильные контейнеры с газогенерирующим содержимым и индикатором анаэробных условий. Исследуемый материал хранят (транспортируют) при температуре $4-6^{\circ}\text{C}$. Все виды материалов необходимо исследовать в течение пяти часов.

Микроскопическое исследование исходного материала

Мазки из исследуемого материала окрашивают по Граму, а затем — фуксином Циля (1:10) в течение 6-8 минут, поскольку бактерии плохо воспринимают красители, окраска по методу Грама и изучение морфологии клеток в таких мазках затруднительна. В положительных случаях в поле зрения обнаруживают крупные (3-6х1,7 мкм) грамтрицательные палочковидные бактерии, прямые или слегка изогнутые, часто один из обоих концов клетки утолщены и окрашены более интенсивно, чем остальная часть бактерии («гантелевидные» бактерии); располагаются парно или последовательно парно. Нередко клетки возбудителя окружены радиально отходящими мелкими грамтрицательными бактериями (диномен Бевериджа).

Наряду с *B.nodosus* в мазках в большом количестве присутствуют сопутствующие микроорганизмы (кокки, палочковидные клетки, споры). Клетки *F.necrophorum* обычно длинные и нитевидные с характерной неравномерностью в окраске. Обычно в поле зрения обнаруживают не более 8-10 клеток возбудителя, и при хроническом течении болезни для выявления *B.nodosus* необходимо просмотреть несколько полей зрения. Эффективно использование на этой стадии исследования методов флуоресцирующих антител.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *B.nodosus* — строгий анаэроб, температурный оптимум $37-38^{\circ}\text{C}$, pH 6,7-7,2. Анаэробные условия создают путем удаления из анаэрогастата воздуха до разрежения 25 мм ртутного столба с последующим введением 5-10% CO_2 , 5-10% H_2 или азота с 10% H_2 . Процедуры повторяют трехкратно. Для этой же цели могут быть использованы пакеты. В обоих случаях используют в качестве индикатора анаэробности раствор метиленового синего, который при pH 7,0 и Eh 71 мВ — окислен (окрашен), а при Eh 49 мВ — восстановлен (бесцветный). Выделение и культивирование осуществляют в соответствии с принципами работы для строгих анаэробов. Агаровые среды в чашках Петри инкубируют в анаэробных условиях до посева в течение 8-24 часов и сразу же после

чашки помещают в анаэробные условия. Если такой возможности нет, чашки помещают в сосуд, продуваемый CO_2 свободным от кислорода. Посевы проводят платиновыми или никелевыми, но не нихромовыми петлями. Пететки, используемые для посева, предварительно заполняют стерильным газом. Манипуляции при посеве исследуемого материала на питательные среды осуществляют в потоке CO_2 свободного от кислорода.

Первичные посевы производят на обогащенные плотные агаровые среды кровяной (5%) агар на основе сердечно-мозгового, гриппически-кислого агара, бруцелла-агара, плотной среды Бектемирова. К указанным средам в качестве стимулятора роста добавляют витамин К, гемин и дрожжевой экстракт. В качестве питательной селективной среды, а также для определения пигментообразования применяют Brucella-агар с канамицином, который добавляют до автоклавирования, ванкомицином и 5% лаковой крови. Последнюю получают путем трехкратного замораживания и оттаивания.

Посев на жидкие питательные среды особенно ценен, если по данным микроскопического исследования содержание *B.nodus* в материале невелико. Используют тиогликолатный бульон, среду Кита-Тароцци, мясопитонный бульон с глюкозой, в которые также вносят витамин К-геминную добавку. Жидкие среды перед посевом прогревают в кипящей водной бане 15-20 минут, охлаждают и при посеве по возможности не встряхивают. Посев производят пастеровскими пипетками. Инкубирование проводят при 37°C до семи суток. При соблюдении оптимальных условий рост может наблюдаться уже через 48 часов.

Посевы на плотных средах начинают просматривать через 48 часов инкубирования в потоке обескислороженного CO_2 . Обращают внимание на образование пигмента на среде с лаковой кровью. На плотных питательных средах *B.nodosus* может формировать колонии трех типов: В, М и С. Колонии В-типа сосочковидные или сферические, обычно формируют вирулентные штаммы, выделяемые от овец. Мукоидные колонии (М-тип) образуют менее вирулентные штаммы от овец и крупного рогатого скота. Колонии С-типа — гладкие, появляются в результате пассирования культур на питательных средах и характерны для штаммов, утративших вирулентность. Часто в поверхности среды под колониями, после их снятия, обнаруживаются углубления. Колонии обычно имеют серо-белый цвет и через 3-7 дней инкубирования достигают диаметра 0,5-3,0 мм.

Размер и форма колоний зависят в определенной степени от состава и концентрации питательной среды. На кровяном агаре с 1,5% агар-агара большинство штаммов образуют мелкие (до 1 мм), гладкие, плоские, прозрачные, с выпуклым центром и неровными краями колонии. На анало-

гичной среде с 3% агар-агара тот же вирулентный штамм формирует более крупные (диаметр 1,5-2,0 мм) шероховатые колонии. Гемолитическая активность *B.nodosus* не обладает.

В среде Кита-Тароцци с 0,1% агар-агара *B.nodosus* растет в виде ровато-белых вертикально опускающихся тяжей. В аналогичной питательной среде возбудитель растет с ее равномерным помутнением. На указанных средах в анаэробных условиях могут расти факультативные анаэробы. Микроскопическое исследование мазков, окрашенных по Граму, позволяет дифференцировать *B.nodosus* от некоторых представителей культуры из подозрительных колоний после микроскопического окрасивания твивают на тиогликолатный или мясной бульон с глюкозой.

Морфология клеток *B. nodosus* в культуре. В мазках из культур морфология клеток *B.nodosus* сходна с таковой у клеток в исследованном материале. Возбудитель не образует жгутики, капсулу, споры. При изучении по Граму на стадии изучения первичных культур могут быть ошибочно приняты за *B.nodosus* грамположительные анаэробы, потерявшие способность к грамположительной окраске. Для избежания таких ошибок рекомендуется следующий тест: на предметное стекло в две капли 3% (3%-ный, вес/объем) вносят бактериологическую петлю 48-часовой культуры изучаемой колонии с плотной среды и суспендируют на площади 2 см². Если при этом формируются тянущиеся нити, то микроорганизм является грамотрицательным.

Идентификация возбудителя по ферментативным свойствам

При изучении ферментативных характеристик определяют способность культуры образовывать индол, каталазу, сероводород, уреазу, трипсиназу, гемолизин, разлагать мясо, гидролизовать крахмал, эскулин, образовывать кислоты из сахаров и высокоатомных спиртов. При первичной культуре соблюдают требования относительно создания анаэробных условий, описанные выше.

Для исследования указанных признаков используют обычные или коммерческие анаэробные идентификационные системы API 20E, API-ZYM, АТВ 32А, Minitec anaerobic II и др. Для *B.nodosus* характерны инертность в отношении углеводов и многоатомных спиртов, образование сероводорода, желатиназы, разложение мяса, отсутствие гемолизина, уреазы, пигмента на агаре с лаковой кровью, отсутствие роста или очень слабый рост на питательных средах с 20% желчи крупного рогатого скота.

Серологическая идентификация *B.nodosus*. На стадии работы с смешанными и чистыми культурами *B.nodosus* идентификация возбудителя

ция может быть проведена при помощи непрямого метода иммунофлуоресценции.

Биопроба. Проводят с целью обнаружения возбудителя в исследуемом материале. Лабораторные животные к *B.nodosus* не чувствительны. Биопробу ставят на здоровых овцах (ягнятах). Материал используют в нативном виде или разводят стерильным физиологическим раствором 1:5. В межпальцевой щели скальпелем делают 10-15 поверхностных линейных разрезов эпидермиса кожи и втирают исследуемый материал. Дополнительно в копытцевые щели помещают ватные тампоны, пропитанные материалом, и копытца на 2-3 дня забинтовывают. Заражение овец проводят в дне конечности, животных содержат на влажной подстилке. Как положительный результат биопробы расценивают появление на 4-6-е сутки гармиев в результате отторжения рогового и производящего слоев эпидермиса. Позднее отслаиваются внутренние боковые стенки копытцев, и через 2-3 недели процесс распространяется на подошву и наружные боковые стенки. По мере развития процесса из пораженных тканей готовят мазки и микроскопически подтверждают наличие *B.nodosus*.

В соответствии с действующей инструкцией «Лабораторная диагностика копытной гнили овец и коз» лабораторный диагноз на копытную гниль в РФ устанавливают на основании результатов микроскопического исследования материала с подтверждением, в случае необходимости, в биопробе.

Питательные среды

Рецепты базовых питательных сред для культивирования *B.nodosus* вложены в других разделах (*Brucella*-агар, агар Schadler и др.).

Стимулирующая ростовая добавка для выращивания *B.nodosus*

а) Раствор гемина: 50 мг гемина растворяют в 1 мл 1 N NaOH, добавляя 100 мл воды, автоклавируют при 121° С 15 минут.

б) Раствор витамина К (менадион): 100 мг менадиона растворяют в 10 мл 95%-ного этанола и стерилизуют фильтрацией.

в) смешивают 1 мл менадиона и 100 мл гемина. К 100 мл питательной среды добавляют 1 мл смеси.

г) В питательную среду вносят 0,5% дрожжевого экстракта.

Питательная среда с селективными свойствами.

Базовая среда *Brucella*-агар, селективные добавки: канамицин — 75 мкг/мл, ванкомицин — 75 мкг/мл.

Плотная среда в модификации Бектимирова. Тщательно очищенные от волосяного покрова голяшки овец вместе с роговым башмаком

копытец заливают водопроводной водой и варят в закрытой кастрюле 1 часа до отделения тканей от костей. Полученный бульон фильтруют через бельтинг-ткань или ватно-марлевый фильтр. Добавляют 0,5% пептона, 0,5% хлорида натрия и 2% агара. Кипятят до полного растворения и устанавливают рН 7,6 и стерилизуют при 120° С 30 минут. В расплавленную и остуженную до 45-50° С среду вносят асептически 0,05% раствора кислого цистеина (в виде 2%-ного раствора), 20% среды № 199, 20% фибринированной крови лошади. Посевы инкубируют в атмосфере углекислого газа.

Жидкая среда в модификации Бектимирова. Смешивают 630 мл бульона из голяшек овцы и 300 мл экстракта головного мозга, добавляют 1 г пептона, 50 мл экстракта копытного рога, 5 г хлорида натрия. Стерилизуют при 120° С 30 минут и разливают по пробиркам. Культивирование проводят в анаэробе в течение 24 ч.

Приготовление экстракта из головного мозга. Головной мозг или крупного рогатого скота заворачивают в марлю, заливают водой и кипятят 15-20 минут, после чего выжимают и растирают в небольшом количестве мясо-пептонного печеночного бульона (МППБ) до получения кашицеобразной массы. Полученную массу суспендируют в МППБ в отношении 1:9 и автоклавируют при 120° С 30 минут. Отстоявшуюся после автоклавирования смесь центрифугируют, надосадочную жидкость стерилизуют через фильтр Зейтца и хранят при 4° С.

Приготовление экстракта копытного рога. Копытный рог высушивают и тонко измельчают до получения порошка, смешивают 1 часть порошка и 9 частей 0,8%-ного раствора хлорида натрия. В полученной смеси добавляют 20% трипсина и инкубируют в течение 2-3 суток при 37° С, поддерживая рН 7,5-7,8. Смесь нагревают до 60° С, охлаждают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют через фильтр Зейтца.

Лабораторная диагностика дизентерии свиней

Дизентерия свиней — инфекционная болезнь, характеризующаяся геморрагическим поносом и некротическим поражением толстого кишечника. Восприимчивы свиньи всех возрастов, но чаще молодняк 1-6 месяцев возраста. Возбудитель — анаэробная, грамотрицательная, подвижная бактерия *Serpulina hyodysenteriae* (ранее *Treponema hyodysenteriae*), относится к роду *Serpulina*, семейству *Spirochaetaceae*. Под *Serpulina* сохранился

вид, один из которых, *S. innocens*, не является патогенным для свиней, обнаруживается в фекалиях здоровых Свиней и собак. Существуют данные, что *S. hyodysenteriae* проявляет свои патогенные свойства, только будучи в ассоциации с некоторыми другими представителями кишечной микрофлоры. **Лабораторная диагностика** дизентерии свиней основана на обнаружении возбудителя в исследуемом материале методом микроскопии, с помощью иммунологических реакций, а также на выделении и идентификации культуры возбудителя.

Бактериологическое исследование

Прижизненно берут стерильным ватным тампоном фекалии из прямой кишки, плотно прижимая тампон к поверхности слизистой. Тампон помещают в пробирку со стерильным физиологическим раствором. У павших и убитых с диагностической целью животных не позднее двух часов после гибели берут соскобы слизистой пораженного сегмента кишки, предварительно освобожденного от содержимого. Материал также помещают в пробирку со стерильным физиологическим раствором (1-2 мл). Исследование проводят в кратчайшие сроки после взятия (2-8 ч), в случае необходимости материал транспортируют в термосе со льдом.

Микроскопическое исследование исходного материала

Результаты микроскопического изучения материала имеют существенное диагностическое значение, поскольку культивирование возбудителя представляет трудную задачу. Морфологически *S. hyodysenteriae* и *S. innocens* неразличимы, поэтому существенно количественное содержание характерных спирохет в материале. У больных животных в одном поле зрения обычно обнаруживают 5-10 и более спирохет. Клетки *S. hyodysenteriae* грамтрицательные, спиралевидные, завитки крупные, правильной формы в количестве 2-4, может быть 8-10, концы заостренные, размер 0,3-0,4x7-9мкм.

Обнаружение *S. hyodysenteriae* в исследуемом материале проводят путем темнопольной, фазово-контрастной микроскопии или исследованием окрашенных препаратов.

Для обнаружения живых, подвижных трепонем берут 1-2 капли исследуемого материала, готовят препарат «раздавленная капля» и просматривают его в микроскопе с увеличением 280-400 раз (7-10x40, водная иммерсия). Характер движения спирохет зависит от температуры: при 22°C наблюдается изгибание клетки и медленное скользящее движение. Кишечные клетки-добактерии гораздо толще спирохет, имеют тупые концы, движут-

ся, вращаясь вокруг оси. Для увеличения контрастности можно в выделенному материалу добавлять каплю следующего красителя: метиленовый синий — 3 г, спирт этиловый 96° — 25 мл, 1%-ный раствор КОН — 1 мл, глицерин — 10 мл, вода дистиллированная — 90 мл. Смешивают спирт и глицерин, затем растворяют метиленовый синий, смесь выдерживают при температуре 37°C в течение 48 часов, фильтруют и к фильтрату добавляют КОН и глицерин.

При изготовлении окрашенных препаратов мазки фиксируют не только метанолом, но лучше этанолом или метанолом. Окрашивают по Романовскому, фуксином Пфейффера, по Романовскому-Гимза, краской Виктории голубой. Последний краситель готовят следующим образом: в 5 мл метанола (абсолютного) растворяют 0,5 г Виктории голубой 4-R, затем добавляют 95 мл дистиллированной воды, компоненты перемешивают. Мазки при этом методе окрашивания фиксируют 10%-ным формалином в течение 15 минут, окрашивают 5 минут раствором Виктории голубой, промывают водой, подсушивают на воздухе и исследуют с масляным иммерсионным объективом.

При наличии соответствующих иммунных сывороток обнаружение и идентификация возбудителя может быть проведена методом флуоресцирующих антител, иммуноферментным методом.

Выделение и идентификация культур *S. hyodysenteriae*

Культивирование. Возбудитель является анаэробом, растет в анаэробной среде, обогащенной CO₂ или N₂ 10% CO₂ температурный оптимум роста при 30°C не растет, оптимум pH питательных сред 7,0-7,2. Лучше растет на жидких средах с ОКВП выше 125 мВ и pH 6,9. Требуется для роста холестерин, поэтому в среды добавляют бычий сывороточный альбумин и сыворотку крови. Поскольку исследуемый материал содержит много анаэробных контаминантов, то для первичной изоляции обычно используют плотные селективные среды с добавлением крови, так как высокая ферментативной активности ориентировочно можно дифференцировать *S. hyodysenteriae* и *S. innocens*, например кровяной агар на транспортной основе или на базе перевара Хоттигера.

Для культивирования (субкультивирования) можно использовать жидкую или полужидкую среды, содержащие сердечно-мозговую среду с 10% эмбриональной телячьей или кроличьей сыворотки.

Исследуемый материал суспендируют в стерильном забуференном физиологическом растворе 1:10, крупные частицы осаждают слабым центрифугированием или отстаиванием (20-30 минут). Набавляют жидкость засевают на питательные среды в настольном боксе, вы-

дном от кислорода. Рекомендуется для освобождения от контаминантов жидкость перед посевом последовательно пропускать через фильтры с уменьшающимся диаметром пор: 0,8-0,65- 0,45 мкм.

Культивирование осуществляют в анаэро-статах типа МП-115, Лабор МММ (Венгрия), вакуумных термостатах, заполненных газовой смесью, состоящей из 80% H_2 и 20% CO_2 , при 42°C в течение 48-72 часов.

Возможен несколько иной вариант выделения серпулии. В агаровой среде в чашке Петри вырезают углубление диаметром 2-10 мм и глубиной до 8-10 мм, но не доходящее до дна чашки. В углубление вносят 0,2 мл пробы (суспензия каловых масс, содержимое кишечника), или, если углубление небольшое, пробу вносят в толщу агара уколом пастеровской петли в стенку углубления. Посевы инкубируют в анаэро-стате от 4 до 7 дней при 37° С. Серпулины могут мигрировать в агаре, в отличие от других бактерий, и растут (помутнение) на некотором расстоянии от углубления. Из периферической зоны помутнения часть агара переносят в восстановленную полужидкую (0,15%) среду, инкубируют и далее (для получения чистой культуры, поскольку возможно присутствие других спиритов) засевают субкультуру на восстановленную плотную среду с целью получения изолированных колоний.

На кровяных плотных средах *S. hyodysenteriae* через 48 часов инкубирования образует плоские, прозрачные, с ровными краями, слизистой консистенции колонии диаметром 0,1-0,2 мм, с зоной четкого бета-гемолиза. *S. innocens* дает слабо выраженный бета-гемолиз.

Морфология клеток в культуре. Морфологию клеток из колоний исследуют в неокрашенных препаратах методом темнопольной микроскопии или готовят окрашенные препараты. В окрашенных препаратах из периферических культур серпулины имеют 3-8 завитков, несколько крупнее (10-26x0,3-0,4 мкм), чем в дальнейших пассажах. В субкультурах их длина обычно составляет 7-14 мкм, количество завитков — 2-4.

Идентификация *S. hyodysenteriae* по ферментативным признакам

С учетом происхождения исследуемого материала дифференцировать *S. hyodysenteriae* приходится от *S. innocens*. Отличия *S. hyodysenteriae* от связанных вибрионов по морфологическим критериям изложены выше.

Для дифференциации видов рода *Serpulina* используют следующие критерии (табл. 89). Дифференциация этих двух видов серпулин наиболее доступна по характеру гемолиза, тестам на интенсивность гемолиза и ингибирование.

Таблица 89 - Дифференцирующие признаки видов рода *Setibacillus*

Признаки	<i>S. hyodysenteriae</i>	<i>S. innocens</i>
Сбраживание	-	+
	+	-
Образование индола	+	-
β-гемолиз	выпаженный	слабый
Тест на интенсивность гемолиза	+	-
Оптимальная температура	42° С	37° С
Патогенность для свиней	+	-

1) *S. hyodysenteriae* не ферментирует арабинозу, целлобиозу, эскулин, эритрит, галактозу, лактозу, гликоген, амидалин, маннит, маннозу, меле-цитозу, рибозу, салицин, арабинозу, трегалозу, ксилозу, кроме мальтозы расщепляет глюкозу (Smibert, 1984).

Тест на интенсивность гемолиза проводят следующим образом. Культуру выращивают в течение 4 суток на агаровой среде, затем вырезают агаровый блок (0,5 см²), помещают его на свежий кровяной агар и инкубируют 4 дня. Если это культура *S. hyodysenteriae*, то по периметру агарового блока образуется светлая зона бета-гемолиза шириной 1-2 мм. *S. innocens* такой гемолитической реакции не дает.

Для выявления способности образовывать индол на поверхности агаровой культуры помещают индикаторную бумажку. *S. hyodysenteriae* в отличие от *S. innocens*, образует индол, и бумажка синееет. Индикаторные бумажки пропитывают 1%-ным раствором пара-диметиламинобензоальдегида в 10%-ном растворе соляной кислоты.

Питательные среды

Триптический соевый кровяной агар со спектомицином. Соевую муку смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1:1 и, тщательно перемешивая, кипятят в течение 15-20 минут. Остужают до 40°С, при этом в 20%-ного едкого натра доводят рН до 8,0, вносят фарш поджаренной печени крупного рогатого скота (10%) и 2% хлороформа (объем 0,5 мл). Емкость закрывают резиновой пробкой, перемешивают чередой 10-15 минут.

и далее ежедневно в течение 3-4 дней. Контролируют pH и поддерживают его на уровне 7,8-8,0. Через три недели (после формирования осадка) определяют содержание аминного азота, устанавливают добавлением дистиллированной воды его уровень 140-160 мг%, доводят pH до 7,2-7,4, вносят 1% пептона, 0,5% натрия хлорида, 0,25% глюкозы. Смесь кипятят 3-3 минуты, фильтруют, добавляют 2% агара. Затем емкости с питательной средой переносят в герметический настольный бокс, в течение Пяти минут через среду пропускают свободный от кислорода CO_2 или азот, вносят в среду 0,05% солянокислого L-цистеина, раствором бикарбоната натрия (5%) устанавливают pH на уровне 7,2-7,4. Флаконы со средой закрывают пробками из силиконовой резины и стерилизуют при 110°C в течение 30 минут. Перед использованием среду расплавляют, переносят в настольный бокс, пропускают через нее стерильный CO_2 или азот, после расплавления агара до 42-45°C в него вносят спектиномицин (400 мкг/мл), 10% дефибрированной крови барана, разливают по чашкам Петри и охлаждают в боксе до застывания. Слой агара в чашках должен быть толщиной около 0,5 см.

Кровяной агар со спектомицином на основе перевара Хоттингера

К перевару Хоттингера добавляют 0,001% резазурина (индикатор ОКП), 0,5% натрия хлорида, 0,25% глюкозы, 1% пептона, 2% агара, кипятят, пропуская через среду азот или углекислый газ в течение 10-15 минут, устанавливают pH 7,0-7,2, вносят 0,05% солянокислого цистеина, автоклавируют при 110°C в течение 30 минут, охлаждают до 42-45°C, пропуская при этом через среду обескислороженный газ, вносят 10% стерильной дефибрированной крови барана (КРС) и 400 мкг/мл спектомицина. Среду разливают по культуральным сосудам в атмосфере CO_2 (в ванне).

Среда RGCA-SC (Holdeman L.V. et al., 1977). Глюкоза — 0,0248 г, мальтоза — 0,0248 г, растворимый крахмал — 0,05 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,1 г, раствор резазурина (0,025%) — 0,4 мл, дистиллированная вода — 20 мл, раствор солей — 50 мл, рубцовая жидкость (Randolph, Bidogicals, Houston, Tex) — 0,05 г, раствор гемина (2) — 1 мл, раствор витамина К — 0,02 мл.

Среду разливают по 10 мл в пробирки, содержащие 0,2 г агара, и автоклавируют. На последнем этапе среду в двух пробирках расплавляют, охлаждают до 50° С и добавляют в каждую из них следующие компоненты: стерильную, инактивированную (60° С, 4 часа) сыворотку крови кролика — 1,5 мл; раствор кокарбоксилы (тиаминпирофосфата 0,025%), стерилизованный фильтрованием — 0,2 мл; стерильный, предварительно восстановленный бульон РУ — 2,0 мл. Компоненты перемешивают и со-

держимое обеих пробирок выливают в чашку Петри. Среду хранят в анаэробных условиях либо используют немедленно.

Для поддержания серпулин в лабораторных условиях используют среды без селективных добавок. Применяют для этой цели кровяной агар со спектиномицином на основе перевара Хоттингера, триптиказо-солевой агар. Например, кровяной агар Хоттингера готовят следующим образом: к перевару Хоттингера добавляют 0,001% резазурина (индикатор О100), 0,5% натрия хлорида, 0,25% глюкозы, 1% пептона, 2% агара, культуру пропускают через среду азот или углекислый газ в течение 10-15 минут, устанавливают pH 7,0-7,2, вносят 0,05% цистеина гидрохлорида, автоклавируют при 110°C в течение 30 минут, охлаждают до 40-45°C, пропускают при этом через среду обескислороженный газ, после чего вносят 10% дефибрированной стерильной крови барана (КРС) и 400 мкг/мл стрептомицина. Среду разливают в атмосфере углекислого газа.

Лабораторная диагностика кампилобактериозов

Кампилобактерии представляют собой грамотрицательные подвижные бактерии, которые объединены в род *Campylobacter*, включающий 11 видов. Экология и патогенные свойства видов, представляющих интерес для ветеринарных бактериологов, представлены в таблице 87.

Лабораторная диагностика кампилобактериозов основана на результатах бактериологического исследования. При генитальном кампилобактериозе крупного рогатого скота дополняется данными по обнаружению секреторных антител во влагалищной слизи, у овец применяют как серологическую диагностику пробирочную РА.

Бактериологическое исследование

Для диагностики генитального кампилобактериоза при болезни крупного рогатого скота берут слизь из шейки матки от 10-20 животных стада, препуциальные смывы у быков. Слизь получают с помощью резиновых пипеток, соединенных со шприцом, или стерильным марлевым тампоном при помощи инструментов Жабоедова или Павлова.

Тампоны со слизью помещают в пробирки с 3-5 мл стерильного физиологического раствора. Если нет возможности произвести посев материала на месте, непосредственно после взятия, то его доставляют в лабораторию в термосе со льдом не позднее 6 часов.

Для получения смывов с препуция и транспортировки целесообразно использовать тиогликолатный бульон, транспортные среды.

При абортах крупного рогатого скота и овец (*C. fetus subsp. fetus*, *C. jejuni*) в лабораторию направляют абортированный плод, плодовые оболочки, плаценту (часть плаценты). От крупного плода берут желудок, голову, легкие, печень. При непригодности указанных материалов для исследования направляют цервикальную слизь, взятую в первые 4 дня после аборта. В холодное время года плоды рекомендуется замораживать.

При подозрении на кампилобактериоз от коров и половозрелых телок в период полового покоя берут пробы влагалищной слизи для серологической диагностики при помощи следующего устройства. Используют стеклянную трубку с полированными концами длиной 40 см и диаметром 1-1,4 см. Через трубку пропускают прочную нитку. Один ее конец привязывают к марлевому тампону из куска марли размером 10x10 см, тампон втягивают внутрь цилиндра, концы которого и всю трубку в целом обертывают бумагой и стерилизуют в автоклаве (30 минут, 1 атм). Наружную часть половых органов промывают водой. Трубку освобождают от бумаги, вводят во влагалище до упора, металлическим стержнем выталкивают тампон, удаляют стержень и трубку, оставляя на 40-60 минут во влагалище тампон. По истечении указанного срока тампон за нитку извлекают и помещают в пробирку с 5 мл формализованного (0,3%) раствора натрия хлорида (3%). Пробирку закрывают резиновой пробкой, транспортируют в лабораторию. При задержке до 24 часов пробы лучше хранить и транспортировать в термосе со льдом.

Для диагностики кишечных кампилобактериозов при диареях животных, предположительно кампилобактериозной этиологии (*C. jejuni* и другие виды), для исследования берут фекалии, содержимое кишечника с помощью ректальных тампонов.

Таблица 90 - Экология и патогенные свойства кампилобактерий

Вид кампилобактерий	Хозяин	Патогенные свойства
1	2	3
<i>C. fetus subsp. venerealis</i> (синон. <i>Vibrio fetus subsp. venerealis</i>)	Крупный рогатый скот. Обитает в препуции клинически здоровых быков.	Вызывает генитальный кампилобактериоз крупного рогатого скота (энзоотический аборт). Возбудитель передается половым путем, при искусственном осеменении, у не иммунных коров вызывает катаральный и гнойный метрит, гибель эмбрионов в 2-4-недельном возрасте. На более поздней стадии развития плода аборты не характерны.

C. fetus subsp. fetus (син. C. fetus sb. intestinalis, Vibrio fetus sb. intestinalis)	Овцы. Комменсал кишечника тракта.	Возбудитель генитального кампилобактериоза у овец, передается орально-фекальным путем. Точником возбудителя являются животные-носители. Проявляется абортными кровотечениями в половине случаев.
	Крупный рогатый скот. Комменсал кишечника	Возбудитель спорадических абортов. Передается в основном орально-фекальным путем.
	Человек	Зид редко встречающийся при патологическом течении.
C. jejuni (син. C. fetus sb. jejuni, V. jejuni).	Является комменсалом кишечника тракта домашних, диких животных и птицы. По серотипам, за исключением людей, у этого вида хозяино-специфических антигенов нет.	Вызывает у животных энтерит с медленным течением, у молодняка более выраженным. Клинически проявляется у собак, кошек, свиней обычно до 14-дневного возраста. У овец, свиней и лошадей наблюдают энтериты этой формы. У кур, гусей, уток, индюков, цыплят, утят, жаб и лягушек вызывает спорадические аборты, у уток — энтериты. У птицы является причиной инфекционного гепатита. Возбудитель передается орально-фекальным путем. Является возбудителем острой кишечной инфекции у человека.
C. mucosalis C. hyointestinalis	Основной хозяин — свинья. Обитают в кишечном тракте здоровых свиней.	Возбудители кишечного аденоматоза у свиней 6-20-недельного возраста: пролиферация и некроз слизистой илеоцекума, одновременно развивается некротизирующий энтерит. Кампилобактерии локализуются интрацеллюлярно, поэтому фекалии для лабораторного исследования брать не следует.
C. coli (син. V. jejuni /коли вибрион).	Свиньи, человек	Комменсал кишечника тракта свиней. Может быть причиной легких диарей у свиней и детей у человека. Нередко ассоциируется с холерой, вызываемой у свиней S. hyodysenteriae.
C. sputorum биовар bubulus	Крупный рогатый скот	Комменсал генитального тракта коров и оленей. Вспредается как непатогенный вид.
C. sputorum биовар faecalis	Овцы, крупный рогатый скот	Обнаруживают в кишечном тракте, влагалище и сперме крупного рогатого скота. Рассматривается как непатогенный вид.
C. sputorum биовар sputorum	Человек	Комменсал ротовой полости. Рассматривается как непатогенный вид.
C. lari	Собаки, лошади, свиньи	Выделяют из фекалий. Патогенные свойства неизвестны.
C. upsaliensis	Собаки, человек	Изолируют от клинически здоровых животных. Патогенные свойства неизвестны.
C. sphaerophila	Крупный рогатый скот, овцы, лошади	Выделяют из кишечника тракта здоровых животных, иногда из абортировавшихся самок.

Для транспортировки и хранения материала целесообразно применять среду Кэрри-Блер или ее модификационный вариант с добавлением трифрита агара. Готовую среду разливают высоким столбиком (почти до пробки) в центрифужные пробирки, стерилизуют, пробки пропитывают расплавленным парафином, хранят при комнатной температуре. Кампилобактерии в фекалиях, помещенных в среду, через двое суток сохраняют жизнеспособность при 4°C в 100% проб. В случае аденоматозного комплекса у свиней (*C. mucosalis*, *C. hyointestinalis*) берут участки пораженного кишечника. Фекалии для исследования не используют.

Для диагностики вибрионного гепатита (*C. jejuni*) в лабораторию направляют печень.

Микроскопическое исследование исходного материала

При диагностике генитального кампилобактериоза мазки из исследуемого материала окрашивают 4 минуты разведенным (1:5) фуксином Циля. По Граму кампилобактерии в препаратах окрашиваются слабо, грамотрицательные, капсул нет, есть жгутики. В мазках из абортированных плодов и другого материала кампилобактерии имеют характерную форму запятой, летящей чайки, S-образную форму, средние размеры 0,5-8x0,2-0,8 мкм. В материале от давно зараженных или леченных животных могут быть выявлены клетки возбудителя в виде длинных спиралл, слабо извитых нитей и мелких кокковидных форм.

В мазках из исследуемого материала возбудителей генитального кампилобактериоза можно обнаружить и идентифицировать при помощи прямого метода флуоресцирующих антител. Результаты люминесцентной микроскопии позволяют дифференцировать патогенные кампилобактерии от спирофитирующего вида (*C. sputorum*).

С целью диагностики кишечного аденоматоза свиней микроскопируют препараты из соскобов слизистой пораженного кишечника, окрашенные по модифицированному методу Циля-Нильсена. В положительных случаях находят расположенные внутриклеточно тонкие, изогнутые бактерии красного цвета.

При микроскопическом исследовании фекалий целесообразно применять методы темнопольной или фазово-контрастной микроскопии, ориентированные на выявление живых, подвижных клеток. Основанием для выявления на кампилобактериоз является обнаружение подвижных бактерий штопоровидной формы.

Выделение и идентификация кампилобактерии

Культивирование. Кампилобактерии являются микроаэрофильными, будучи по типу дыхания аэробами, они требуют в то же время пониженного содержания в атмосфере молекулярного кислорода (5-10% — микроаэрофильность) и повышенного CO_2 (1-10% — капнофильность). Необходимый состав газовой среды получают следующими способами.

Пробирки, чашки Петри с посевами помещают в анаэроаэрозонатор, удаляют 2/3 воздуха (следят по манометру), затем добавляют углекислоту до отметки 0,5.

Из микроанаэрозонатора с посевами удаляют 2/3 воздуха, затем снова навливают обычное атмосферное давление, вводя газовую смесь из 88% азота и 10% углекислого газа. Конечная газовая смесь содержит 94% азота, 6% углекислого газа и 88% азота.

Чашки Петри с посевами помещают в герметичные полиэтиленовые пакеты, которые заполняют из баллона газовой смесью (азот — 88%, углекислый газ — 10%, кислород — 5%). Пакет сжимают, удалив лишнюю смесь, и вновь заполняют ею, процедуру повторяют двукратно, после чего пакет заклеивают липкой лентой.

Используют газогенераторные пакеты. В герметично закрытый сосуд (микроанаэрозонатор, эксикатор) помещают чашки Петри с посевами. Увлажненные газопакеты и сосуды закрывают. Могут быть использованы пакеты фирм BBL (Campy Pak 2) Oxoid.

В эксикатор с посевами помещают зажженную свечу, закрывают. После затухания свечи газовый состав в сосуде составляет: азот — 88%, углекислый газ — 3%, кислород — 17%. Чистые культуры кампилобактерии в этих условиях растут недостаточно хорошо.

Микроаэрофильные условия также достигаются посевом микроорганизмов (культур) в ПЖА (0,15-0,2%) и среду СЖН, налитые в бактериологические пробирки высоким столбиком. По высоте столбика питательной среды имеется градиент концентрации кислорода. Пробирки с посевами помещают в анаэрозонатор с заменой 10-15% объема углекислотой. Кампилобактерии растут в оптимальной для себя микроаэрофильной зоне.

Материал, поступающий для бактериологического исследования, обычно контаминирован посторонней микрофлорой. При исследовании спермы (секрета), цервикальной слизи, препуциальных смывов материал трифугируют 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость выливают непосредственно на питательные среды или подвергают фильтрации через мембранные фильтры, благодаря чему задерживаются только крупные бактерии. Проходят только мелкие бактерии размером 0,5-1,0 мкм.

ним, в том числе кампилобактерии. Предназначенный для этого смонтированный фильтр Зейтца и колбу Бунзена стерилизуют в автоклаве, мембранные фильтры № 2 и № 5 кипятят в дистиллированной воде 10 минут со сменной воды. В стерильных условиях мембранные фильтры закладывают в фильтры Зейтца в последовательности № 5 — № 2 — № 5. Фильтрат засевают на питательные среды.

При исследовании абортированных плодов посевы делают из содержимого сычуга, легких, печени, головного мозга, амниотической жидкости, измененных участков плаценты. На ПЖА высевают по 0,5 мл содержимого желудка, двенадцатиперстной кишки, околоплодных вод и желчи. Кусочки селезенки, печени, котиледонов, мозга и легких растирают в ступке и высевают отдельно из каждого органа на 3-4 пробирки с ПЖА и три чашки плотной среды. Также можно производить посевы пастеровскими решетками. Посев материала на ПЖА проводят пастеровской пипеткой на дно, перенося после перемешивания часть материала аналогичным путем последовательно еще в четыре пробирки.

При исследовании на генитальный кампилобактериоз посев целесообразно производить на полужидкий агар ВГНКИ, 0,15% ПЖА с 10% дефибринированной крови или сыворотки крови, на 2%-ный мясо-печеночный питательный агар, агар Мартена. Вместо мясной воды при изготовлении указанных сред используют экстракт мышцы сердца крупного рогатого скота, обогащают их кровью крупного рогатого скота, овец, кроликов (5-10%), сывороткой крови лошади (10%), экстрактом сухих дрожжей (5 г/1000 мл), а также добавляют тиогликолат натрия (0,5 г/1000 мл).

Посев загрязненного материала, кроме перечисленных питательных сред, делают на среды с селективными свойствами: плотную среду ВГСВ, среду СЖН, оптимальные плотные питательные среды с селективной добавкой Скирроу, собственно среду Скирроу или другие селективные среды. В среду СЖН материал засевают в 5 пробирок, как и в пробирки с ПЖА. Чашки Петри, пробирки с посевами инкубируют при 37°С 4-10 дней в атмосфере с 6% кислорода, 10% углекислого газа, 84% азота, просматривая посевы каждые 3 дня.

Смешанные культуры кампилобактерии дробно засевают (без фильтрации, с фильтрацией) на плотные питательные среды в чашках Петри с целью получения изолированных колоний или заражают такими культурами беременных морских свинок. В последнем случае 0,5 мл смешанной культуры вводят внутрибрюшинно или интравагинально морским свинкам. Если в течение 10-12 дней аборт не происходит, свинок убивают и делают посевы из полости матки и эмбрионов.

Для выделения *C. fetus* из содержимого кишечника рекомендуется фекалий развести в 50 мл бульона, для удаления крупных частиц фильтр тровать через марлю, затем фильтр из стеклянной ваты и мембранный фильтр с порами 0,65 мкм. Фильтрат высевают в чашки Петри с агаром для бруцелл, содержащим бацитрацин (2 ед/мл) и нонобон (2 мкг/мл). Посевы инкубируют при 37° С в течение 4-5 суток в атмосфере с 5% O₂, 10% CO₂ и 5% N₂.

С целью выделения культур кишечных кампилобактерии из фекалий содержимое кишечника в количестве 1 г разводят 1:10 физиологическим раствором. Исследуемую взвесь центрифугируют, как описано выше. Надосадочную жидкость пропускают через нестерильные мембранные фильтры с диаметром пор 8 и 1,2 мкм, а затем через стерильные фильтры с порами 0,65 мкм. Несколько капель фильтрата высевают на кровяной или «шоколадный» агар и культивируют в условиях соответствующей газовой атмосферы. Возможен упрощенный вариант фильтрации. В этом случае на поверхность плотной неселективной питательной среды (железной агар) помещают мембранный фильтр с диаметром пор 0,65 мкм, на него наносят несколько капель исследуемого материала, через некоторое время фильтр удаляют и чашки Петри подвергают инкубированию. Другим вариантом изоляции кампилобактерии из фекалий является посев материала в жидкие обогатительные питательные среды (среда Престон-Уотермана, Дойля, Camru-Thio и др.) или плотные среды с селективными добавками (среды Скирроу, Бутцлера, Camru-VAR, Престон).

Материал, находящийся в транспортных средах, допускается выживать в холодильнике до 24 часов. Если посев может быть произведен непосредственно после поступления материала в лабораторию, то его хранение в холодильнике нецелесообразно. Метод фильтрации при низком содержании в материале кампилобактерии, несколько снижает чувствительность исследования. Из отечественных питательных сред первичной изоляции кампилобактерии в качестве основы рекомендуют эритроцит агар Дагестанского НИИ с 5%-ной лизированной диализованной водой крови барана. Для придания селективных свойств к расплавленную среду предварительно вносят рифампицин — 10 мкг/мл, фотерицин В — 2 мкг/мл, полимиксин В — 2 мкг/мл, ристомицин — 10 мкг/мл. Помимо эритроцит агара, сред Скирроу, Престон может быть использован бруцелла-агар с 5% крови овцы, ванкомицина — 10 мкг/мл, полимиксина В сульфата — 2-5 ЕД/мл, триметаприм лактата — 5 мкг/мл, цефалотина — 15 мкг/мл, амфотерицина В — 2 мкг/мл.

Посевы с целью выделения инкубируют при 42-48°С в течение 3 суток, что обеспечивает угнетение роста многих энтеробактерий.

Для изоляции *C. mukosalis* (возбудитель кишечного аденоматоза свиней) пораженную ткань кишечника гомогенизируют и засевают на кровяной агар, лучше с бриллиантовым зеленым (1:60 000). Первичные посевы инкубируют в анаэробных условиях при 37°C 3-5 суток. В последующих пассажах возбудитель хорошо растет в микроаэрофильных условиях. Для выращивания *C. sputaerophila* используют полужидкий агар с 5-флуороцином (100 мкг/мл). Температурный оптимум 30°C. Выделенные культуры поддерживают в аэробных условиях на кровяном агаре.

На ПЖА (0,15%) культуры *C. fetus* растут в виде серо-голубоватого кольца на глубине 1-4 мм под поверхность среды, в 0,5%-ном ПЖА их рост более поверхностный. Культуры непатогенного вида *C. mucosalis* в 0,15%-ном ПЖА растут диффузно или в виде кольца под поверхность, а в 0,5%-ном ПЖА растут в виде «елочки» по уколу. На среде СЖН при росте чистой культуры кампилобактерий цвет среды не меняется (розовый), рост смешанной культуры или посторонней микрофлоры сопровождается ярко-желтым окрашиванием среды. Оба подвида *C. fetus* образуют на плотных оптимальных средах мелкие (около 1 мм) колонии, округлые, слегка приподнятые, просвечивающие, с влажной поверхностью. На плотной питательной среде ВИЭВ возбудители ге-нитального кампилобактериоза формируют изолированные, круглые, с ровными краями, гладкой поверхностью, полупрозрачные, с серовато-розовым оттенком колонии диаметром 1-2 мм. В принципе, возможно наличие трех типов колоний: S — с ровными краями, гладкой поверхностью, содержащие преимущественно клетки в виде запятой и летящей чайки; M — слизистые, клейкие, с трудом отделяющиеся от поверхности среды, плотные, состоят из неподвижных и слабоподвижных клеток; R-колонии — с шероховатой поверхностью, плотные.

Наиболее частый возбудитель диарей — *C. jejuni*, который на среде Кери-Блер с эритрит агаром через 48 часов культивирования растет, так же как и *C. fetus*, в виде диска под поверхность среды. На эритрит агаре через 2 суток образуют полупрозрачные, блестящие, влажные, плоские колонии, как бы расплывающиеся по агару. Штаммы, выделенные от животных, формируют оптически более плотные, вплоть до беловатого оттенка, а от человека — более нежные колонии. При наличии подозрительных колоний на плотных питательных средах и типичного для микроаэрофилов роста на полужидких средах из культур готовят мазки,

Морфология клеток кампилобактерий в культуре. В мазках из 3-5-дневных культур, выращенных на полужидких или плотных средах, преобладают длинные спиралловидные формы (*C. fetus*) размером 1-10x0,2-0,3 мкм. На одном или обоих концах клетки имеются жгутики. Для опре-

дления подвижности кампилобактерий удобен следующий метод. В предметном стекле смешивают каплю культуры и каплю красителя (метиленовый эозин 0,1 г, кристаллвиолет — 0,1 г, щавелевокислый аммоний — 0,1 г, этанол — 5 мл, дистиллированная вода — 120 мл, после растворения компонентов добавляют 180 мл физиологического раствора). Готовый препарат «раздавленная капля» и исследуют под иммерсионной линзой микроскопа.

В 6-9-суточных культурах на плотной среде могут присутствовать клетки с колбообразными вздутиями, на недоброкачественных средах в старых культурах много кокковидных клеток.

Таблица 91 - Дифференциальные признаки кампилобактерий

Признаки	C. coli	C. styaceopiflia	C. fetus		C. hyointestinalis	C. jejuni		C. lari	C. musosalis	C. sputorum		C. fetus subsp. jejuni
			subsp. fetus	subsp. venerealis		subsp. jejuni	subsp. cluylei			биовар sputorum	биовар bubus	
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Рост при 25°C ¹⁾	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
При 42°C	+	d	-	+	+	+	w	+	+	+	+	-
Рост при наличии в среде: 1% глицина	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1% бычьей желчи	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Рост на агаризованной среде с 1,5% NaCl								+	-	D	+	-
Гидролиз гиппурата	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Образование H ₂ S ²⁾	+	-	-	+	+	+	НД	+	+	+	+	-
Щелочная фосфатаза	D	-	-	-	-	+	+					

Результаты окислительных	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Устойчивость к налидиксовой кислоте (10 мкг на диск)	+	d	+	+	+	+	+	+	d	D	d	+	+
Цефалотин (30 мкг на диск)	D	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: * культивирование проводят в тиогликолатной среде;

Примечание: * культивирование проводят в тиогликолатной среде;
 * — признак приведен по результатам определения H₂S при помощи бумажек с уксуснокислым спиртом на полужидких или жидких средах с 0,02% цистеина: «d» 89% штаммов положительные, «+» — нет данных; «+» — 90% и более штаммов положительные, «-» — 90% и более отрицательных штаммов, «W» — слабая реакция.

Идентификация кампилобактерий на уровне вида, биовара

Обнаружение бактерий, проявляющих микроаэрофильный рост и обладающих типичными для кампилобактерий морфологией и тинкторными свойствами, дает основание для изучения других признаков, позволяющих уточнить родовую и видовую принадлежность культур роста при 25°C и 42°C, на среде с 1,5% NaCl, 1% глицина, 1% бычьей желчи, чувствительность к налидиксовой кислоте и цефалотину, а так же гидролиз пиперата, образование сероводорода, щелочной фосфатазы, редуцирование нитратов (табл. 88). Применяют тест-систему APICampy (Bio Merieux)

Культивирование при 25°C и 42°C позволяет дифференцировать возбудителей генитального кампилобактериоза (подвиды *C. fetus*), а также *C. sputorophila* от «термофильных» представителей рода, способных расти при 42°C. Ряд штаммов *C. fetus subsp. fetus* могут расти при 42°C.

Идентификацию выделенных культур также проводят в реакции агглютинации с диагностическими сыворотками и в реакции иммунофлуоресценции.

Серологическая идентификация выделенных культур кампилобактерий. Отечественные диагностические лаборатории обеспечиваются кампилобактериозными агглютинирующими сыворотками, предназначенными для идентификации возбудителей генитального кампилобактериоза (*C. fetus subsp. fetus*, *C. fetus subsp. venerealis*) и дифференциации их от непатогенного вида *C. sputorum*.

Идентифицируемые, адаптированные (прошедшие 2-3 пассажа в питательных средах) культуры выращивают 2-3 суток на ПЖА, затем высевают для накопления необходимого количества бактериальной массы на питательную плотную среду в чашках Петри следующего состава: мясная вода — 25%, печеночный настой — 25%, вода — 50%, 0,3% натрия хлорида, 1% пептона, 2-3% агар-агара (вес/объем). Среда стерилизуют при 115°C 30 минут, охлаждают и добавляют 10% кроличьего или 20% стерильного обезжиренного молока (объем/объем). Посевы инкубируют в микроаэрофильных условиях 2-3 суток. Бактериальную массу смывают формализованным раствором (0,3%) натрия хлорида (0,8%). Бактериальные клетки двукратно отмывают аналогичным раствором путем двукратного центрифугирования (3000 об/мин). По оптическому стандарту мутности устанавливают концентрацию бактериальной взвеси 1 млрд.м.к. в 1 мл. Идентификацию культур проводят в РА на стекле и в пробирках.

РА на стекле. Используют для ориентировочной идентификации. Иммунные сыворотки против *C.sputorum subsp.bubulus*, *C.fetus subsp.fetus* *C. subsp. venerealis* разводят изотоническим раствором NaCl в качестве контроля используют стерильный физиологический раствор. Для окончательной идентификации испытуемую культуру исследуют в пробирочной РА с перечисленными сыворотками, разведенными в 3%-ном растворе NaCl с 0,3% формалина в разведениях 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 (объем 0,5 мл). К каждому разведению добавляют 0,3 мл приготовленного антигена (500 млн.м.к.). В качестве контроля используют аналогичные разведения нормальной сыворотки кролика.

Пробирки с компонентами выдерживают при 37°C 24 часа, 3-4 часа при комнатной температуре и учитывают результат по объему в 4-балльной системе. При отсутствии агглютинации в контроле испытуемую культуру относят к тому виду (подвиду), с сывороткой против которого получен положительный результат. Культуры, имеющие слабые диссоциации, могут агглютинировать с несколькими сыворотками. В последнем случае опыт теряют, используя разведения сывороток до предельного титра. Выделенные культуры бактерий могут быть идентифицированы с аналогичными люминесцирующими сыворотками в прямой реакции иммунофлуоресценции.

Метод флуоресцирующих антител. Для серологической идентификации возбудителей генитального кампилобактериоза в чистой и смешанной культурах может быть применен прямой метод флуоресцирующих антител с использованием коммерческих кампилобактериозных иммуно-

свирующих сыворонок: бивалентной — против *C.fetus* сероваров 1 и 2, моновалентной — против *C.sputirum subsp. bubulus*.

Биопроба. Используют преимущественно для очистки смешанных культур при диагностике генитального кампилобактериоза. Морских свинок массой 250-300 г заражают внутрибрюшинно, вводя 1,0-1,5 мл смешанной культуры кампилобактерий. Через 5-10 минут из сердца берут пробы и высевают в 6-8 пробирок с ПЖА. При значительной контаминации возможно проведение нескольких пассажей.

Белым мышам культуру вводят внутрибрюшинно в дозе 0,3-0,5 мл. Через 3-4 дня животных убивают и кровь из сердца, материал из печени, селезенки, рогов матки высевают на питательные среды.

Крупным белым мышам культуру в дозе 0,1 мл вводят пипеткой в вагину. Через 24 часа заражение повторяют. Через 6-7 дней мышей убивают, вырезают стерильно кусочки рогов матки и засевают материал в пробирки с ПЖА.

Беременным морским свинкам вводят внутрибрюшинно или во влагалище 0,5 мл культуры. При аборте производят посевы из абортированных плодов. Если аборт не происходит, животных убивают и делают посевы из эмбрионов и слизистой матки.

Серологическая диагностика

Для выявления секреторных антител при генитальном кампилобактериозе крупного рогатого скота применяют реакцию агглютинации с влагалищной слизью (РАВС).

Техника постановки РАВС. Используют кампилобактериозный антиген биофабричного производства (*C.fetus subsp. venerealis*), который разводят 3%-ным раствором NaCl с 0,3% формалина до концентрации 1 млрд. м.к./мл (1:10). Тампон с вагинальной слизью выдерживают в бактериологической пробирке с 5 мл стерильного раствора NaCl (3%) в течение 12-14 часов при 4°C. Тампон отжимают, жидкость центрифугируют при 3000 об/мин 30 минут. Надосадочную жидкость исследуют в следующих разведениях: неразведенный экстракт, 1:2, 1:4, 1:8. Средой разведения служит 3%-ный раствор NaCl. К 0,5 мл каждого разведения исследуемого экстракта добавляют 0,5 мл взвеси антигена. Контролями служат: антиген (0,5 мл) + 0,3%-ный раствор NaCl (0,5 мл); разведения диагностической агглютинирующей сыворотки против *C.fetus subsp. venerealis* (1:50-1:400) + 0,5 мл антигена; разведение нормальной кроличьей сыворотки (1:100, 1:200) + 0,5 мл антигена. Опытные и контрольные пробы после встряхивания помещают в термостат на 24 часа при 37° С. Через

3-6 часов выдерживания компонентов при комнатной температуре получают результат по общепринятым для РА критериям. Положительным результатом считается наличие РА на + + +, + + + + креста во всех или в первой и второй пробирках. Как сомнительный результат оценивают наличие РА на (+ +) или (+) крест в первой и второй пробирках. Отрицательный результат: отсутствие агглютинации во всех пробирках. У серологическую диагностику проводят при помощи пробирочной РА. Сыворотку крови исследуют в разведениях 1:100, 1:200 и 1:400. Как положительный результат оценивают РА на четыре-три креста в разведении 1:200, сомнительный — на четыре-три креста в разведении 1:100 или два-один крест в разведении 1:200. Сыворотки крови от вакцинированных животных не исследуют.

Питательные среды

Транспортная среда Кери-Блер. Тиогликолат натрия — 1,5 г; фосфат натрия двузамещенный — 1,1 г; хлорид натрия — 5 г; агар 1,6 г; дистиллированная вода — 991 мл. Устанавливают рН среды 8,4, стерилизуют текучим паром 4 мин.

Транспортная среда для *S.fetus*. Свежая сыворотка крови крупного рогатого скота с содержанием в 1 мл: 5-флуорацил — 300 мг; нитрофуран В сульфат — 100 ЕД; бриллиантовый зеленый — 50 мкг; палидромин кислота — 3 мкг; циклогексимид — 100 мкг.

Смесь разливают в 30 мл флаконы по 10 мл, закрывают резиновой пробкой, помещают на 2 минуты в кипящую водяную баню для выдерживания. После охлаждения среду перемешивают стеклянной палочкой, прокалывают пробку иглой, переносят флакончики в емкость, содержащую 2,5% O₂, 10% CO₂, 87,5% N₂. Иглу удаляют после помещения флакона в сосуд. Среду хранят при 4°C, используют не ранее чем через 3 месяца после течения 3 месяцев.

Среда Скирроу для выделения *S.fetus*. Состав: кровяной агар (Oxoid CM 271) — 1000 мл; лизированная дефибрированная овечья кровь — 50 мл; ванкомицин — 10 мг; полимиксин В — 2500 ЕД; триметоприм — 5 мг. Автоклавированные кровяной агар охлаждают до 37°C, добавляют другие компоненты. Селективная добавка Скирроу (ванкомицин, полимиксин В, триметоприм) в указанных пропорциях может быть заменена в другую подходящую как основу среду.

Жидкая обогатительная среда. Состав: питательный бульон № 2 — 25 г; дистиллированная вода — 1000 мл; лизированная кровь лошади — 50 мл; ванкомицин — 10 мг; полимиксин В — 2500 МЕ; триметоприм — 10 мг.

Модифицированная обогатительная среда Престон. Состав: питательный бульон № 2 — 25 г; дистиллированная вода — 1000 мл; лизированная кровь лошади — 50 мл; полимиксин В — 5000 МЕ; триметоприм — 10 мг; рифампицин — 10 мг; циклогексимид — 100 мг; сульфат железа — 0,025%; метабисульфит натрия — 0,025%; пируват натрия — 0,025%.

Сафранин-железо-новобиоционовая среда. Приготовление экстракта мышцы сердца. Сердце крупного рогатого скота освобождают от жира, вентральных клапанов и пропускают через мясорубку. 1 кг фарша настаивают в 2 л водопроводной воды в течение 24 часов. Затем кипятят в течение 1 часа, после чего доливают дистиллированную воду до первоначального объема. Фильтруют среду через бумажный фильтр, разливают по колбам и стерилизуют при 1 атм 30-40 минут.

Приготовление печеночной воды. Свежую печень крупного рогатого скота освобождают от жира, канальцев и режут на небольшие кусочки. 1 кг печени кипятят в 1 л водопроводной воды в течение 1 часа. После чего доливают дистиллированную воду до первоначального объема. Фильтруют через бумажный фильтр, разливают по колбам и стерилизуют при 1 атм 30-40 минут.

Приготовление полужидкого агара. Берут 250 мл экстракта из мышечного сердца, 250 мл печеночной воды и 500 мл дистиллированной воды. К этой смеси добавляют 10 г пептона, 5 г поваренной соли и кипятят 15 минут, доводят до первоначального объема дистиллированной водой, регулируют pH 7,1-7,2, добавляют 1,5-2 г агар-агара и кипятят 15 минут до полного растворения агар-агара.

Приготовление среды. Предварительно в отдельных темных флаконах готовят следующие водные (на дистиллированной воде) растворы: 2%-ный раствор сернокислого закисного железа ($\text{FeSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$); 0,5%-ный раствор сафранина Т; 0,2%-ный раствор новобиоцина (при наличии новобиоцина в таблетках одну таблетку, содержащую 125 тыс. ЕД, растворяют в 62,5 мл дистиллированной воды, что соответствует 0,2%-ному раствору). Указанные растворы можно хранить в холодильнике (при 4°C) в течение месяца. К 985 мл полужидкого агара добавляют 5 мл 2%-ного раствора сернокислого железа, 5 мл 0,5%-ного раствора сафранина Т и 5 мл 0,2%-ного раствора новобиоцина, тщательно перемешивают и филь-

труют через бумажный фильтр. Среду разливают в пробирки по 4 мл и стерилизуют при 0,8 атм 25 минут. После стерилизации рН среды 6,8, цвет розовый. Пробирки со средой хранят при комнатной температуре (не выше 25°C), в темном месте в полиэтиленовых пакетах. При этих условиях среда пригодна для употребления в течение месяца.

Плотная среда ВИЭВ. Приготовление компонентов среды. Отвар из мозга крупного рогатого скота. Свежий мозг крупного рогатого скота освобождают от оболочек, пленок и измельчают на мясорубке. В фарш добавляют 1 л водопроводной воды, настаивают в течение 10 часов, затем кипятят в течение 1 часа. После кипячения добавляют дистиллированной воды до первоначального объема, фильтруют через слой марли, разливают по колбам и стерилизуют при 1 атм в течение 40 минут.

В отдельных темных флаконах готовят на дистиллированной воде 0,5%-ный раствор сафранина Т и 0,2%-ный раствор новобиоцина. Растворы годны для применения в течение 1 месяца, при условии хранения в холодильнике при 4-6°C.

Приготовление среды. Смешивают 745 мл сердечного (см. выше) и 245 мл мозгового отвара. К полученной смеси добавляют 10 г пептона, поваренной соли, 20 г агар-агара, 1 г цистеина, по 5 мл приготовленных растворов сафранина Т (25 мкг/мл) и новобиоцина (10 мкг/мл). Среду разливают во флаконы и стерилизуют при 0,8 атм в течение 25 минут. После автоклавирования рН среды 6,8-7,0. В таком состоянии среду хранят при комнатной температуре в течение 2 недель. Перед употреблением среду расплавляют, охлаждают до 45-50°C, добавляют в нее 10% водно-бринированной крови барана или крупного рогатого скота и разливают в чашки Петри по 20 мл.

Полужидкий агар ВГНКИ с 1% глицина. В смесь, состоящую из 250 мл водопроводной, 250 мл мясной и 250 мл печеночной воды, добавляют 10 г пептона, 2 г агара. Кипятят до полного растворения агара (15-20 минут). Устанавливают рН 7,3-7,4. Добавляют 10 г глицина, 35 г хлорида натрия, 10 мл желчи, 1-3 мл раствора бриллиантового зеленого 1:1000, разливают и автоклавируют при 115°C 30 минут.

Лабораторная диагностика боррелиоза птиц

Боррелиоз птиц (спирохетоз, трепонемоз) — инфекционное септическое заболевание птиц, передающееся через укусы клещей, распространенно на всех континентах. Восприимчивы куры, гуси, реже — утки, индейки и другие домашние птицы. Заражение птиц в естественных условиях происходит через укусы клещей *Argas persicus*, *A.reflexus*, *A.minutus*, *Deilthodoros avium*. Особенно тяжело переболевает молодняк, птица становится малоподвижной, худой, развивается зеленоватый понос; гребень, сережки и слизистые оболочки приобретают желтовато-коричневый цвет, смертность достигает 10-99%. Возбудителем болезни является извитая граммотрицательная бактерия — *Borrelia anserina*, род *Borrelia*. **Лабораторная диагностика** боррелиоза основывается на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование. Для исследования берут кровь, печень, селезенку, желчный пузырь, яичники и костный мозг. Материал исследуют в кратчайшие сроки после взятия, учитывая, что в трупах птицы боррелии быстро лизируются.

Микроскопическое исследование исходного материала, обнаружение антигенов возбудителя. Готовят мазки крови, взятой прижизненно из подкрыльцовой вены, гребешка, посмертно — из сердца; мазки — отщипки из печени, селезенки, почек, костного мозга. Мазки окрашивают по методу Романовского (48-72 ч при комнатной температуре), метилновым синим и др. методами, используемыми для окраски лептоспир. Применяют метод негативного окрашивания с тушью: каплю крови смешивают на предметном стекле с 1-2 каплями туши, разведенной 1:2 дистиллированной водой, препарат подсушивают и микроскопируют. На темном фоне туши видны клетки неокрашенных боррелий. Для выявления возбудителя в живом виде каплю материала помещают на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и просматривают в микроскопе с темнопольным конденсором — в положительных случаях на темном фоне видны серебристые, светящиеся клетки возбудителя. Клетки *B.anserina* спиралевидные, с заостренными концами длиной от 8 до 20 мкм, количество витков от 2 до 15 с шагом витка от 0,3 до 3 мкм. Толщина клеток 0,2-0,4 мкм. В препарате «раздавленная капля» можно наблюдать движение клеток возбудителя: поступательное, вращательное, штопоробразное. Никогда боррелий образуют сиплетения из нескольких клеток или выпрямляются, приобретая нитевидную форму. Для обнаружения и идентификации клеток возбудителя, при наличии меченых антисывороток, применяют реакцию иммунофлуоресценции, для растворимых антигенов — реакцию диффузионной преципитации. До настоящего времени микроскопи-

ческое исследование остается основным методом диагностики боррелиоза у птиц.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

B. anserina — микроаэрофил, температурный оптимум 28-30° С, pH 7,3-7,5. Посевы производят из крови, печени, селезенки, желчного пузыря, яичников. Особенно эффективны посевы крови, взятой у птицы во время лихорадки. Для культивирования применяют стерильную сыворотку крови, яичный белок с добавлением сыворотки крови, среду Терман-Джонсона. Для выделения культур возбудителя применяют также 7-10-дневные куриные эмбрионы, которым вводят 0,2 мл материала (кровь, взвесь тканей паренхиматозных органов) в хориоалантоисную полость. В положительных случаях эмбрионы погибают через 6-8 суток, у них выявляют воспалительные и дегенеративные изменения.

Рост возбудителя на плотных и жидких питательных средах осуществляют для поддержания культур пересевы проводят с интервалом 5-8 суток. В жидких средах рост *B. anserina* можно подтвердить только путем микроскопии препаратов из культуры.

Для длительного хранения штаммов боррелий используют метод быстрого замораживания в жидком азоте. С целью замораживания берут свеженолученную цитратную кровь, содержащую около 6 млрд возбудителей в 1 мл и замораживают в жидком азоте. Боррелии сохраняют жизнеспособность и вирулентность в течение года хранения. Боррелии можно хранить при 2-6° С в стерильной цитрированной или гепаринизированной крови, однако в этом случае инфекционные свойства материала постепенно снижаются.

Биопроба. Проводят в случаях, когда микроскопическое исследование материала дает отрицательные результаты. Заражают молодых цыплят, кроликов, морских свинок, белых мышей, куриные эмбрионы.

Кровь и кусочки паренхиматозных органов объединяют, помещают в пробирку, разводят физиологическим раствором 1:10-1:20 и вводят внутримышечно по 2 мл или внутрибрюшинно, соответственно по 1-2 и 0,5 мл. При использовании для заражения свежей крови от больной птицы ее вводят животным внутривенно. О результатах биопробы судят по результатам микроскопического исследования крови животных в течение 48 до 72 часов после заражения (позднее боррелий могут обнаружить в крови). Зараженные птицы могут погибать, но не всегда. Для обнаружения возбудителя у зараженной птицы, кроме того используют РИФ и РДТ.

Питательные среды

Сыворотка крови кролика или лошади. Стерильную, инактивированную (58-60° С, 30 минут) сыворотку разливают по пробиркам, вносят небольшое количество стерильного вазелинового масла.

Свернувший куриный белок с сывороткой крови. Стерильно взятый куриный белок разливают по стерильным пробиркам и свертывают в свернутом состоянии в водяной бане. Затем в каждую пробирку вносят по 5 мл инактивированной сыворотки крови, разведенной стерильным физиологическим раствором 1:5 (сыворотка кролика), 1:50 (сыворотка лошади).

Среда Терских. См. «Лептоспироз».

Лабораторная диагностика микоплазмозов

Микоплазмы — прокариоты, не имеющие клеточной стенки и ограниченные лишь трехслойной мембраной. Обладают полиморфизмом (кокки, палочки, ветвистые структуры), растут на бесклеточных питательных средах. В связи с отсутствием клеточной стенки чувствительны к осмотическому шоку. Для предотвращения осмотического лизиса в состав питательных сред включают стабилизирующие соли и другие вещества. Патогенные микоплазмы для роста на искусственных питательных средах требуют добавления многих компонентов, которые они не способны синтезировать сами. В состав сред обязательно включают сыворотку крови как источник липопротеина. Наряду со стеринами, фосфолипидами, липидами патогенным микоплазмам необходим низкомолекулярный белок. В связи с патогенностью микоплазмы выращивают на средах с сывороткой крови, экстрактами дрожжей, сердечной мышцы, добавлением мембранных липидов или их предшественников.

Температурный оптимум для микоплазм, уреоплазм и ахолеплазм составляет 37-38° С, рН 7,8-8,0, кроме уреоплазм (оптимум рН 6,0).

Все микоплазмы выделены в самостоятельный класс *Mollicutes* с одним отрядом — *Mycoplasmatales*, который подразделяется на три семейства: *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*. Семейство *Mycoplasmataceae* включает два рода: *Mycoplasma* и *Ureaplasma*. Семейство *Acholeplasmataceae* имеет один род — *Acholeoplasma*. Семейство *Spiroplasmataceae* представлено одним родом — *Spiroplasma*.

Схема бактериологического исследования при диагностике микоплазмозов

Материал берут на ранних стадиях клинического проявления болезни от трупов животных не позднее 2-3 ч после гибели, с максимальным соблюдением стерильности и транспортируют в термосе со льдом. Инфекция микоплазм наиболее вероятна, если посев на питательные среды произведен в первые пять часов после взятия материала. Для хранения в течение 2-3 суток материал замораживают при -20°C , для более длительного — при -70°C или помещают в жидкий азот. Материал, взятый трупами, целесообразно помещать в транспортную среду для микоплазм. При транспортировке образцов маститного молока рекомендуется добавлять 5 мкг/мл ампициллина.

Прямое микроскопическое обнаружение микоплазм в окрашенных препаратах из исследуемого материала из-за полиморфизма, слабого окрасления красителями и хрупкости клеток имеет небольшую диагностическую ценность. Более эффективно обнаружение и идентификация микоплазм при помощи метода флуоресцирующих антител, ИФА, ПЦР.

С целью выделения культуры микоплазм обычно материал помещают в две пробирки с жидкой питательной средой и в две чашки Петри с твердой средой. Экссудат и фетальную жидкость высевают на среды после предварительной обработки. Тканевый материал и внутрисуставная жидкость могут содержать ингибиторы, поэтому их разводят в жидкой питательной среде до 10^{10} и каждое разведение инкубируют. Ткани предварительно гомогенизируют. Гомогенизацию проводят в фосфатном буферном растворе или жидкой питательной среде. Чрезмерно измененный материал не рекомендуется из-за выделения ингибиторов, приготовления разведений гомогената преследует эту же цель.

Наряду с посевом гомогената рекомендуется производить посев в среду на ткани, например легочной, непосредственно на агаровую среду с целью подавления роста обычных бактерий и грибов исследуемый материал (гомогенат) перед посевом обрабатывают. Для этого взвесь тканевого материала разводят фосфатно-солевым раствором 1:10, фильтруют через стерильный ватно-марлевый фильтр, к фильтрату добавляют пенициллин (5000 ЕД/мл), при значительной контаминации — полимиксин В (1000 ЕД/мл), ацетат таллия (1:2000-1:4000), для подавления грибов — амфотерицин В (50 мкг/мл), чаще используют пенициллин и ацетат таллия. Взвесь с антибиотиками выдерживают при комнатной температуре 15 минут и делают контрольный высеv на МПА и МПБ. Материал хранят при $5-10^{\circ}\text{C}$. В случае роста бактерий деконтаминацию проводят

Черно. Другим способом освобождения от контаминантов является пропускание материала через мембранные фильтры 3 и 4.

Плотные питательные среды лучше разливать в стеклянные чашки Петри, т.к. некоторые виды пластмасс ингибируют рост микоплазм.

Посевы на плотных средах инкубируют в течение 5-14 суток в аэробных и анаэробных условиях при 37-38°C, а поскольку культивирование достаточно длительное, во избежание подсыхания сред его проводят при относительной влажности около 75-80%. Наилучшие результаты удается получить при использовании культуральных сосудов с 5-10% CO₂. Пробирки с посевами в жидкие питательные среды инкубируют в аэробных условиях и ежедневно контролируют на наличие роста.

Для подтверждения роста микоплазм на жидких питательных средах проводят высевы на плотную питательную среду. Результат посева на плотные среды признают отрицательным при отсутствии роста в течение 14 суток. На плотных средах наличие колоний обнаруживают под малым увеличением микроскопа (x25 x50). При отсутствии роста проводят до 5 пассажей на жидкой среде с пятидневным интервалом, прежде чем дают отрицательное заключение. С целью выделения уреоплазм пассажи проводят на специальных средах ежедневно.

Микоплазмы образуют довольно характерные колонии на плотных питательных средах. Центр колонии темный, периферия прозрачная. Рельеф центр приподнятый («пуговчатый»), периферическая часть колонии плоская (форма «яичницы-глазуньи»). Центральная часть колонии врастает в толщу питательной среды, что обнаруживают путем снятия бактериальной массы фламбированным скальпелем или бактериологической петлей с последующим изучением участка среды под колонией при помощи микроскопа.

При обнаружении колоний, сходных с колониями микоплазм, проводят пассирование на средах без ингибиторов с целью получения чистой культуры. Из бульонной культуры готовят разведения 10⁻¹-10⁻¹⁰, каждое из которых (0,2-0,3 мл) высевают на две чашки Петри с агаровой средой. Для выделения чистой культуры используют два основных методических приема. В первом случае вырезают блок агаровой среды, содержащий одну колонию, переворачивают и засевают на поверхность плотной питательной среды. Посевы инкубируют 48-72 часа. Процедуру повторяют уже с тремя изолированными колониями. Во втором случае агаровый блок помещают в пробирку с 2-3 мл жидкой питательной среды, инкубируют 48 часов при 37° С, культуру пропускают через мембранные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм). Фильтрат разводят свежей средой 1:10 и 1:100 и на бактериологической петле каждого разведения высевают на агаровую

среду. Процедуру повторяют троекратно с несколькими колониями, не все колонии дают хороший рост.

Под воздействием ингибиторов, входящих в состав питательной среды для первичного культивирования микоплазм, возможна L-трансформация бактериальных контаминантов, что требует дифференциации между L-форм бактерий и микоплазм.

Колонии L-форм бактерий имеют сходную морфологию, но они прозрачны и имеют выраженную зернистую структуру.

Для более точной дифференциации микоплазм от L-форм бактерий производят высев колоний на питательную агаровую или жидкую среду без пенициллина и ацетата таллия. Посевы инкубируют в течение 7-10 дней, периодически просматривая на наличие колоний на агаре и жидких бактериальных клетках в жидкой среде. Их присутствие свидетельствует о реверсии L-форм в исходное состояние.

Кроме того, колонии микоплазм и L-форм бактерий дифференцируют при окраске по методу Динес. Для этого вырезают агаровый блок (содержащий колонией), наносят несколько капель красителя Динес (содержит метиленовый голубой — 2,4 г, мальтоза — 10 г, азур II — 1,25 г, натрий хлорид — 0,25 г, дистиллированная вода — 100 мл) на несколько минут, промывают блок водой и исследуют. Первоначально все колонии окрашиваются в синий цвет, но через пятнадцать минут колонии бактерий, в отличие от микоплазм, обесцвечиваются за счет редукции метиленового голубого. Также учитывают, что колонии обычных бактерий при окраске легко смываются, а микоплазм нет.

Для определения морфологических и тинкториальных свойств микоплазм готовят на стеклах отпечатки колоний, бульонную культуру центрифугируют при 10-15 тыс. g, осадок однократно отмывают дистиллированной водой и готовят мазки. Препараты фиксируют метанолом, ацетоном и окрашивают по Граму и краской Романовского-Гимза (3-4 часа). По Граму микоплазмы окрашиваются отрицательно, краской Романовского-Гимза микоплазмы и ахолеплазмы — в фиолетовый, уреоплазмы — в красно-фиолетовый цвет.

Культуры микоплазм в процессе работы поддерживают путем перевива на жидких питательных средах с интервалом 2-3 недели и хранят при 4-5° С. Агаровые культуры сохраняют в замороженном состоянии в агаровых блоках при -30-40° С.

Родовую идентификацию выделенных чистых культур микоплазм (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*) осуществляют по чувствительности к дигитонину и уреазной активности с учетом диаметра колоний по схеме, представленной ниже.

Полную идентификацию микоплазм осуществляют путем дальнейшего изучения дополнительных характеристик, ферментативной активности. На различных этапах бактериологического исследования применяют серологические методы идентификации микоплазм. При диагностике некоторых микоплазмозов практикуется проведение биологической пробы и серологическая диагностика.

Основные методы исследований, используемые при идентификации микоплазм, изложены ниже.

Методы идентификации микоплазм

При росте некоторых видов микоплазм на плотных питательных средах образуется пленка и зерна. Пленка состоит из холестерина и фосфолипидов, зерна — из выпавших в осадок солей магния и кальция, что является следствием липолитической активности микоплазм в отношении жирных кислот. Для проведения данного теста расплавляют 75 мл агара с термическим отваром («Дифко»), добавляют 20 мл сыворотки крови лошади, инaktivированной при 56°C в течение 30 минут, 5 мл стерильного дрожжевого экстракта. До автоклавирования агаровой основы устанавливают pH 7,8, после автоклавирования агар охлаждают до 56° C, вносят остальные ингредиенты и разливают по чашкам Петри. Посевы инкубируют при 37°C. Использование стереоскопического микроскопа облегчает раннее обнаружение изменений. Не рекомендуется инкубирование посевов более двух недель, так как возможны ложные положительные реакции.

Определение потребности в холестерине. От стерола не зависят кокцидии, требуют его для своего роста микоплазмы, уреаплазмы и трихоплазмы.

Прямое определение потребности микоплазм в холестерине проводится следующим образом. Бульонную культуру микоплазм логарифмической стадии роста центрифугируют при 20 тыс. g в течение 20 минут. Осадок отмывают фосфатным буферным раствором (0,1M, pH 7,4). Вспень микоплазм засевают на питательную жидкую среду без холестерина (1 мл взвеси на 9 мл среды) и 0,1 мл взвеси — на аналогичную агаровую среду. Посевы инкубируют и затем проводят пять пассажей на аналогичных средах. Ахолеоплазмы удается пассировать, микоплазмы и трихоплазмы погибают через 1-2 пассажа.

Определение чувствительности к дигитонину. Исследуемую культуру разводят до 10 КОЕ/мл, 0,2 мл культуры засевают в виде стекающей капли на плотную оптимальную питательную среду, содержащую 10-20% сыворотки крови. Затем, после подсушивания в течение 10 минут, на зону

посева помещают стерильный диск фильтровальной бумаги, пропитанный раствором дигитонина. Посев инкубируют в течение времени, необходимого для роста микоплазм, и измеряют зону задержки роста на дисках. Представители семейства *Mycoplasmataceae* и *Spirorhynchus* растут не ближе 2-15 мм от диска. Рост ахлеплазм не ингибируется вообще, или зона задержки роста не более 1-1,5 мм. Приготовление дисков дигитонином. Готовят 1,5%-ный раствор дигитонина в 95% спирте при подогревании в водяной бане. На диск из стерильной фильтровальной бумаги диаметром 6 мм наносят по 0,025 мл раствора дигитонина, высушивают при 37°C и хранят при 4°C.

Определение гемагглютинирующей активности. Бульонную культуру микоплазм трехкратно отмывают фосфатным буферным раствором (0,1 М, рН 7,4) с 0,3 М фтористого натрия. В восемь пробирок (10 мл планшета) вносят по 0,1 мл фосфатного буфера. В первую пробирку вносят 0,1 мл суспензии микоплазм и готовят последовательные десятикратные разведения до 1:256. Затем в каждую пробирку вносят 0,1 мл взвеси эритроцитов (1%). В контрольную пробирку вносят все компоненты, но вместо микоплазм — аналогичный объем буферного раствора.

Определение гемолитической активности. Исследуемую культуру выращивают на плотной питательной среде и заливают агаровой средой эритроцитами. Чашки Петри заклеивают и инкубируют при 37°C в течение суток с ежедневным контролем. Положительный результат: гемолиз вокруг колоний микоплазм. Используют эритроциты различных видов животных. Гемолиз может быть α - и β -типа.

Приготовление агаровой среды с эритроцитами. Эритроциты трехкратно отмывают в фосфатном буферном растворе. Готовят 20% взвесь, готовят 3,5%-ную основу агаровой среды, разливают по 1 мл в пробирки, автоклавируют, охлаждают до 50°C, вносят в пробирку 0,1 г взвеси эритроцитов, перемешивают и используют.

Разжижение сыворотки. В качестве субстрата используют питательную среду следующего состава: 16 мл сердечного экстракта, автоклавированного при 121°C в течение 20 минут, 60 мл сыворотки крови, 1,6 мл 25% дрожжевого экстракта, 2,4 мл стерильной воды (рН 7,8). В пробирки разливают по 2 мл в пробирки, подсушивают под вакуумом 20 минут, прогревают в скошенном положении текучим паром в течение 10 минут. В пробирки со средой вносят различные разведения исследуемой культуры и параллельно контрольной культуры, обладающей известной

тисковой активностью. Посевы инкубируют в течение 14—20 суток, просматривая каждые 2 дня. Положительный результат: появление на поверхности свернутой сыворотки просветлений, углублений, отверстий, пазух, небольшого количества жидкости.

Гидролиз казеина. Приготовление питательной среды. В 120 мл воды растворяют 2 г агара (Оксид). Устанавливают pH 7,6, автоклавируют 15 минут при 121°C. Параллельно в 90 мл воды растворяют 8 г снятого молока («Дифко»), устанавливают pH 7,6, автоклавируют при 121°C в течение 15 минут. Расплавляют агаровый компонент с раствором молока и разливают по 2 мл в пробирки. Проведение опыта. Испытуемую культуру выращивают на агаровой среде, колонии расплавляют в водяной бане, охлаждают и несколько капель переносят в пробирку с колониями испытуемой культуры. Посевы инкубируют при 37°C в течение 14 суток, результат учитывают через каждые 48 часов. Положительный результат: просветление молочного агара над колониями микоплазм.

Разжижение желатины. Приготовление питательной среды. В 100 мл воды растворяют 2,5 г сердечного экстракта («Дифко»), 12 г желатин («Дифко»), устанавливают pH 7,6, разливают по пробиркам по 3 мл и автоклавируют при 121°C в течение 10 минут, охлаждают и в каждую пробирку 1 мл сыворотки крови лошади и 0,25 мл 25% дрожжевого экстракта. Проведение опыта. Исследуемую культуру и контроль (положительный) штамм выращивают на агаровой среде, вырезают ровный блок с колониями и переносят в пробирку с желатиновым субстратом. Посевы инкубируют при 37°C в течение 30 суток. Результат учитывают с интервалом 14-15 суток, предварительно охладив пробирку до 4°C. В качестве контроля (отрицательного) инкубируют положительную пробирку.

Определение уреазной активности. На поверхность колонии индикатор, состоящий из 10%-ной мочевины и 0,8% $MgCl_2 \times 4H_2O$, смешанных в равной пропорции. Колонии уреазоположительных микоплазм окрашиваются в темно-коричневый, а позднее — черный цвет. Так же выявлять уреазу посевом культуры в жидкую питательную среду — уреоплазм, содержащую 1% мочевины (см. «Среда Ливингстона»). Контролем служат среды без мочевины, а также пробирки, засеянные азопозитивным штаммом. Посевы инкубируют при 37°C в течение 5 суток. Защелочение pH среды на 0,5 ед. по сравнению с контролем оценивают как положительный результат.

Ферментация глюкозы. Известно несколько способов определения ферментации глюкозы. Их общим недостатком является необходимость измерения pH за счет присутствующих в среде сыворотки крови и дрожжевого экстракта, причем даже у микоплазм, не ферментирующих глюкозу. Чтобы избежать ошибок, из PLO-среды исключают дрожжевой экстракт.

снизжают количество сыворотки до 1%, делают соответствующие контро-ли. Исследуемую культуру трижды пассажируют на основной среде для активизации. Посевы инкубируют в течение 14 дней. При учете результа-тов используют контроли в диапазоне рН от 8,2 до 6,0 с интервалом 0,2, при помощи которых и учитывают уровень закисления рН. Различия рН в опыте и контроле на 0,5 рН расценивают как положительный результат. При проведении данного теста в качестве базовой используют следую-щую питательную среду: PPLO-бульон — 70 мл, свежий дрожжевой экс-тракт (25%-ный раствор) — 10 мл, инактивированная сыворотка крови свиньи или лошади 10—20 мл, глюкоза (50%-ный раствор) — 1 мл, пени-циллин (200 000 ед/мл) — 0,5 мл, феноловый красный (1%-ный раствор) — 0,4 мл. В качестве посевного материала берут 24-часовую бульонную культуру с хорошим ростом, которую в объеме 0,5 мл засевают в пробир-ку со средой, содержащей глюкозу, со средой без глюкозы. Кроме того, в качестве контролей инкубируют незасеянные среды с глюкозой и без глюкозы. В процессе инкубирования через 24 и 48 часов контролируют наличие роста. Если испытывается анаэробная культура, то поверхность среды заливают стерильным вазелиновым маслом. Как положительный результат принимают пожелтение среды вследствие ее закисления.

Гидролиз аргинина. Базовая среда: PPLO-бульон (рН 7,0) — 70 мл, свежий дрожжевой экстракт (25%-ный раствор) — 10 мл, инактивирован-ная сыворотка крови свиньи или лошади — 20 мл, L-аргинин HCl (10%-ный раствор) — 5 мл, пенициллин (200 000 ед/мл) — 0,5 мл, феноловый красный (1%-ный раствор) — 0,4 мл. Инокуляция питательных сред, сроки инкубирования, контроли и методы оценки из-менения рН такие же, как и при изучении ферментации глюкозы. В каче-стве контролей используют засеянные пробирки с аргинином и без, неза-сеянные пробирки с аргинином и без него. Как положительный результат оценивают покраснение среды (защелочение).

Выявление фосфатазы. Фосфатаза гидролизует фенолфталеина дифосфат в свободный фенолфталеин, что приводит к защелочению рН до 9-10. Питательная среда: PPLO-бульон — 74 мл, агар Дифко — 08 г. Смесь автоклавируют, охлаждают до 56° С, добавляют инактивирован-ную сыворотку крови свиньи или лошади — 20 мл, дрожжевой экстракт (25%-ный раствор) — 10 мл, натрия фенолфталеин дифосфат (1%-ный раствор) — 1,0 мл, пенициллин (200 000 ед/мл) — 0,2 мл. Испытуемой культурой засевают в двух чашках Петри 7₂ площади среды, вторая поло-вина служит контролем. После инкубации в течение 3 и 5 дней на по-верхность опытной и контрольной частей чашки Петри вносят капли 5N

NaOH. Наличие покраснения в течение 30 с расценивают как положительный результат. Для проверки качества среды используют индикатор *M.bovis* — положительный результат и *M.arginini* — отрицательный результат.

Определение способности редуцировать тетразол. Агаровую среду заливают 4 мл смеси из ионагара и трифенилтетразолийхлорида (водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолий-хлорида и ионагара) инкубируют 4-5 часов при 35° С, результат учитывают через каждые 10 мин. Положительный результат — окрашивание колоний в красный, а затем в пурпурный цвет за счет образования формазана.

Бульонная культура. Испытуемую культуру засевают в две пробирки бульоном, содержащим 1% трифенилтетразолийхлорида, одну из пробирок заливают парафином, культивируют 14 суток при 37° С. Параллельно аналогичным образом поступают с двумя незасеянными пробирками (контроль). Положительный результат — красно-коричневое окрашивание среды в аэробных и анаэробных условиях (пробирка с парафином).

Серологическая идентификация микоплазм

Реакция иммунофлуоресценции. Данный метод серологической идентификации микоплазм может быть использован в различных модификациях: окраска отпечатков колоний на предметных стеклах, препаратов бульонных культур, колоний на дисках мембранных фильтров, микоплазм в гистосрезках, клеточных структурах. Общие принципы идентификации микроорганизмов прямым и непрямым методом иммунофлуоресценции изложены в разделе «Серологические реакции». Методы идентификации микоплазм в микроколониях на мембранных фильтрах описаны в разделе «Микоплазмоз свиней». Наибольшее применение имеет метод иммунофлуоресцентного окрашивания колоний на плотной среде, который оценивают как более специфический, чем тесты ингибирования роста и метаболизма. Реакцию иммунофлуоресцентного окрашивания колоний на агаровой среде (эпифлуоресценция) проводят следующим образом. В чашки с агаровой средой высевают дробно 0,1-0,2 мл буферной культуры, инкубируют посевы при 37° С в течение 3-5 дней, вносят в чашку 2 мл буферного раствора на 30 минут, сливают, вносят 2 мл новой сыворотки (прямой вариант) в рабочем титре, выдерживают при 37° С 30 минут, сливают копьютат, трижды промывают буферным раствором.

Вместо чего просматривают колонии под люминесцентным микроскопом. Колонии, связавшие гомологичные антитела, ярко флуоресцируют. При постановке реакции в непрямом варианте на первом этапе колонии обрабатывают немеченой иммунной кроличьей сывороткой, промывают буфером, наносят антикроличью люминесцирующую сыворотку, инкубируют при 37° С 30 минут, сливают конъюгат, трижды промывают буфером и исследуют колонии под люминесцентным микроскопом.

С целью экономии дорогостоящих компонентов реакцию рекомендуют проводить с колониями на агаровых блоках. Отбирают участок агаровой среды с изолированными колониями, вырезают блок размером 5x5 мм, наносят на предметное стекло, фиксируя его смесью парафина (65%) и вазелина (35%). На одном стекле можно помещать 6-10 блоков. Затем на каждый блок наносят каплю фосфатного буфера (рН 7,2-7,4), удаляют избыток буфера. Наносят на блок каплю немеченой кроличьей сыворотки в рабочем разведении и инкубируют 30 минут при комнатной температуре во влажной камере. Отмывают препарат дважды в буферном растворе по 10 минут. Удаляют буфер с каждого блока и наносят на блоки антикроличью меченую сыворотку в рабочем титре, инкубируют 30 минут при комнатной температуре. Отмывают препарат двукратно, по 10 минут в буферном растворе, и исследуют под люминесцентным микроскопом.

Для идентификации колоний на плотных средах рекомендуют агаровые блоки помещать на предметное стекло колониями вниз. Затем стекла помещают в водяную баню с температурой 85° С до расплавления агара, при этом колонии фиксируются, затем препарат дополнительно фиксируют 10 минут ацетоном и далее окрашивают по непрямому варианту.

Тест ингибции роста. Основан на ингибции роста микоплазм специфической иммунной сывороткой в жидкой или плотной питательной среде (употребляют для идентификации на уровне вида). Требуется наличие достаточно активных, моноспецифических, неконсервированных иммунных сывороток. Антисывороткой (0,025 мл), при проведении теста на жидких питательных средах, пропитывают диски фильтровальной бумаги диаметром 6 мм непосредственно перед использованием или хранят их в вакуумном состоянии при -20° С. Для тестирования берут чистую культуру концентрацией 10^4 - 10^5 КОЕ, которую в объеме 0,2 мл равномерно распределяют по поверхности плотной питательной среды. Чашки инкубируют 1 час при 22-37° С и затем на поверхности агара помещают диски с антисывороткой. Лучшие результаты получают на срезах с субоптимальными концентрациями сыворотки и дрожжевого экстракта.

Быстрорастущие микоплазмы дают меньшую зону задержки роста. Зону задержки роста измеряют от края диска. Зону задержки менее 2 мм принимают как сомнительный результат. При проведении теста ингибиции роста в жидкой или полужидкой среде предварительно готовят двукратные разведения иммунной и контрольной (нормальной) сыворотки в объеме 0,2 мл на изотоническом растворе натрия хлорида, добавив 0,2 мл культуры микоплазм, содержащей 10^2 - 10^3 КОЕ, смесь выдерживают при комнатной температуре, добавляют к ней 1,6 мл питательной среды и инкубируют 72-96 часов. За титр принимают максимальное разведение пробирки, ингибирующее рост.

Тест ингибиции метаболизма. Может быть проведен на базе реакции, отражающей ферментативную активность идентифицированной микоплазмы. Условием должно быть наличие определенного фермента. В качестве субстратов обычно используют глюкозу (1%), аргинин (0,1%), мочевины (1%), тетразолий хлорид (0,33%) в жидкой питательной среде. В готовой питательной среде готовят двукратные разведения иммунной сыворотки и в пробирку с каждым разведением вносят 0,1-0,2 мл исследуемой культуры микоплазм (10^2 - 10^3 КОЕ/мл). Контролем служат пробирки без антисыворотки. Посевы инкубируют 3-5 суток. Для сравнения опытных и контрольных пробирок делают заключения о реакции диффузионной ингибиции антителами той или иной метаболической реакции.

Реакция диффузионной преципитации. Используют растворимый антиген, например полученный путем двадцатикратного замораживания и оттаивания суспензии микоплазм. Реакцию ставят обычным способом. Готовят пробойником лунки диаметром 3 мм на расстоянии 5 мм от центральной лунки вносят антиген, в периферические — сыворотку. Результаты проводят через 48 часов. С гомологичной сывороткой антиген дает обычно несколько линий преципитации, с гетерологичной — редко одну, слабо выраженную.

Кроме перечисленных серологических реакций используют для идентификации некоторых видов микоплазм иммунопероксидазную реакцию РСК. В последние годы с успехом апробирована для указанных целей реакция цепной полимеризации. Штаммы *M.gallisepticum*, *M.synoviae*, *M.meleagridis* и других птичьих микоплазм имеют антигенные вариации антигенных и вирулентных свойств, что может быть выявлено путем электрофореза белков в полиакриламидном геле с окраской ДНК.

Питательные среды для культивирования микоплазм

Транспортная среда для микоплазм. Дистиллированная вода — 800 мл, PPLO-бульон — 16,8 г, сыворотка крови лошади — 200 мл, 50%-ный дрожжевой экстракт — 10 мл, DNA (Sigma) — 0,02 г, пенициллин — 2000 ед./1 мл среды, ацетат таллия — 1:100 000. Среду разливают по 2 мл в пробирки.

Приготовление дрожжевого экстракта для среды Friss. 125 г дрожжей суспендируют в 750 мл деионизированной воды, выдерживают 30 минут при 37° С, помещают на 5 минут в кипящую воду, остужают, центрифугируют, стерилизуют супернатант фильтрованием, хранят в замороженном виде.

Приготовление дрожжевого экстракта для культивирования *M. hyosynoviae*. 250 г дрожжей суспендируют в 1000 мл деионизированной воды, далее поступают так же, как и при изготовлении экстракта для среды Friss.

Среда Фрея. Основной PPLO-бульон — 22,5 г, декстроза — 10 г, свиная или лошадиная сыворотка¹ — 100—150 мл, феноловый красный — 15 мг, натриевая соль пенициллина G — 1000 ед./мл, ацетат таллия (1:4000 — 1:2000) — 2,5 — 5,0 мл 10%-ного раствора, дистиллированная вода — 1000 мл. Устанавливают рН 7,8 и стерилизуют фильтрацией.

Модифицированная среда Фрея. Основной PPLO-бульон — 22,5 г, декстроза — 3,0 г, свиная сыворотка — 120 мл, цистеина гидрохлорид — 0,1 г, никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD)² — 0,1 г, феноловый красный — 1%-ного раствора 2,5 мл, ацетата таллия 10%-ного раствора — 5 мл, натриевой соли пенициллина G 1 000 000 ед, дистиллированная вода — 1000 мл. Устанавливают рН 7,8 при помощи 20% NaOH, фильтруют стерилизацией.

Плотная среда Фрея. Все компоненты, кроме цистеина, NAD, сыворотки и пенициллина, стерилизуют автоклавированием при 121° С в течение 15 минут. Предварительно в среду добавляют 1% агара Дифко.

Расплавленную агаровую среду охлаждают до 50° С и добавляют стерилизованные фильтрацией и подогретые до 50° С растворы термолabile компонентов (сыворотка, NAD, цистеин, пенициллин).

Модифицированная среда Хейфлик. Жидкая среда. Бакто Бульон (Difco) — 2,1 г в 70 мл H₂O, сыворотка крови лошади — 20 мл, свежий дрожжевой экстракт — 8 мл, пенициллин 1000 ед/мл, декстроза, бонуклеиновая кислота (Sigma) — 0,002%, ацетат таллия — 1:2000, устанавливают рН 7,6 -7,8, стерилизуют фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, разливают по пробиркам и хранят при 5° С. Могут добавлять глюкозу (0,5-1,0%) и феноловый красный (1:1000).
Агаровая среда. Бакто PPLO-агар (Difco) — 3,5 г в 70 мл H₂O, сыворотка крови лошади — 20 мл, свежий дрожжевой экстракт — 8 мл, пенициллин G — 1000 ЕД/мл, ацетат таллия — 1:2000, устанавливают рН 7,2 -7,6, стерилизуют в автоклаве, остальные компоненты стерилизуют фильтрацией, смешивают расплавленный агар (56° С) и остальные компоненты, разливают по чашкам Петри, хранят при 5° С. Жидкая питательная среда для *M. hyosynoviae*

PPLO-бульон с кристаллвиолетом (Difco) — 10,3 г; деионизированная вода — 470,0 мл. Среду стерилизуют и затем добавляют следующие стерильные ингредиенты: дрожжевой экстракт — 25,0 мл; пенициллин G (100 000 ед/мл) — 1,5 мл; таллия ацетат (5,6% раствор) — 1,2 мл; феноловый красный (0,5%-ный раствор) — 1,8 мл; аргинин-муциновая сульфатизия¹ — 16,0 мл; индюшиная сыворотка крови 129,0 мл. Устанавливают рН 7,2, хранят в замороженном виде.

Среда для гомогенизации материала при исследовании на наличие микоплазмы. Модифицированный солевой раствор Хенкса (HBSS) — 40 мл; HBSS-B — 40 мл; сердечно-мозговой экстракт (Difco) — 5 г; PPLO-бульон с кристаллвиолетом — 5,2 г; деионизированная вода — 1170 мл. Стерилизуют текучим паром, т.к. при автоклавировании могут образовываться токсические продукты. Хранят при -40° С.

Состав HBSS-A: NaCl — 80 г; KCl — 4 г; MgSO₄ x 7H₂O — 1 г; CaCl₂ x 6H₂O — 1 г растворяют в 400 мл деионизированной воды, добавляют 1,4 г CaCl₂ и воды до 500 мл, хранят при 4° С.

Состав HBSS-B: Растворяют Na₂HPO₄ x 12H₂O — 1,5 г в 400 мл деионизированной воды, добавляют 0,6 г KH₂PO₄ и воды до 500 мл. Хранят при 4° С. Бульон Friss. HBSS-A — 40 мл, HBSS-B — 40 мл, сердечно-мозговой экстракт (Difco) — 5 г, PPLO-бульон с кристаллвиолетом — 5,2 г, деионизированная вода — 1170 мл. После стерилизации охлаждают и добавляют следующие стерильные компоненты: дрожжевой экстракт — 25,0 мл, бацитрацин (5 000 ед/мл) — 2,9 мл, метициллин (100 мг/мл) — 1,8 мл, феноловый красный (0,5% раствор) — 4,5 мл, свиная сыворотка (инактивированная при 56° С 30 минут) — 165 мл, лошадиная сыворотка

— 165 мл. Устанавливают pH 7,5 — 7,6. Хранят при -40° С. Для выделения *M. hyorheumoniae* добавляют антисыворотку *M. hyorheumoniae* (5 мл/100 мл) и циклосерин (0,5 мг/мл).

Среда WJB (Lefevre P.C. et al., 1987). Бакто PPLO-бульон с кристаллвиолетом — 1,5 г, бакто-триптон (Difco) — 1,5 г, бакто-нептон (Difco) — 0,1 г, бакто-дрожжевой экстракт (Difco) — 0,1 г, деионизированная вода — 70 мл. Компоненты стерилизуют автоклавированием, затем добавляют ингредиенты, стерилизованные фильтрованием: инактивированную сыворотку крови новорожденных телят — 45 мл, среду 199 (x 10) без NaHCO_3 , с глутамином — 5 мл, свежий дрожжевой экстракт — 5 мл, ДНК тимуса КРС (0,2%) — 1,0 мл, глюкоза (50%) — 0,5 мл, NaNH (10%) — 0,1 мл, ампициллин (100 мкг/мл) — 0,25 мл, ацетат таллия (10%) — 0,25 мл, феноловый красный (0,4%) — 1,5 мл. Устанавливают pH 7,6 — 7,8. Для получения плотной среды добавляют 0,9% агарозы. Модифицированная среда Friss для выделения микоплазм мелкого рогатого скота (Friss N.F., 1974)

Раствор Хенкса (x10) — 3,0 мл, деионизированная вода — 72 мл, сердце-мозговой экстракт (Difco) — 0,5 г, основной микоплазменный бульон (BBL Microbiology Systems) — 0,75 г, гидролизат лактоальбумина — 0,125 г, дрожжевой экстракт (Difco) — 0,05 г, феноловый красный (0,1%) — 1,37 мл. Стерилизуют автоклавированием, добавляют стерилизованные фильтрованием компоненты: свежий дрожжевой экстракт (25%) — 1,65 мл, [глюкоза (50%) — 0,25 мл, ацетат таллия (2%) — 0,55 мл, лошадиная сыворотка — 10 мл, инактивированная свиная сыворотка — 10 мл. Для получения плотной среды добавляют 0,9% агарозы.

Модифицированная среда Хейфлик для выделения микоплазм мелкого рогатого скота. Бакто PPLO-бульон с кристаллвиолетом (Difco) — 2,1 г, деионизированная вода — 70 мл. Стерилизуют автоклавированием и добавляют компоненты, стерилизованные фильтрованием: инактивированная сыворотка новорожденных телят — 20 мл, свежий дрожжевой экстракт — 10 мл, ДНК тимуса КРС (0,2%) — 1,0 мл, ампициллин (10 мкг/мл) — 0,25 мл, ацетат таллия (10%) — 0,25 мл, трифенил тетразолиум сульфид (2%) — 1,0 мл. Устанавливают pH 7,6-7,8. Плотный вариант среды получают включением вместо бакто PPLO-бульона бакто-агара PPLO.

Среда Ливингстона. 1 г PPLO-бульона (Difco) без кристаллвиолета растворяют в 70 мл дистиллированной воды, стерилизуют автоклавированием (121° С, 15 минут), добавляют стерилизованные фильтрованием

следующие компоненты: неинaktivированную сыворотку крови — 20 мл, дрожжевой экстракт — 10 мл, раствор мочевины (10%) — 10 мл, феноловый красный (1%) — 0,2 мл, пенициллин (100 000 ед/мл) — 100 ед. Устанавливают рН 6,04. Для получения плотного варианта среды добавляют 1% агар-агара № 2.

Среда Мартена. В 1 л теплой (50° С) кипяченой водопроводной воды суспендируют 250 г фарша из свежих свиных желудков и добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь выдерживают при 45-50° С, периодически помешивая. Прогревают 30 минут над паром и оставляют на 5 суток при 4° С. Надсадочную прозрачную жидкость декантируют, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120° С.

Модифицированная плотная среда ВИЭВ. К горячему 20% агару на дистиллированной воде добавляют с-месь (поровну) среды Мартена и мясной воды с таким расчетом, чтобы получить 1,5-2% концентрацию агара. Далее разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120° С. Перед использованием в расплавленный и остуженный до 45-50° С добавляют 10% дрожжевого экстракта, 20% стерильной сыворотки крови лошади и 0,5% глюкозы.

Модифицированная жидкая среда ВИЭВ. Смешивают равные объемы среды Мартена и мясной воды, устанавливают рН 8-8,3 и стерилизуют 30 минут при 120° С. Перед использованием в среду добавляют стерильного дрожжевого экстракта, 20% сыворотки крови лошади и 0,5% глюкозы.

Среда Эдварда. Смешивают 500 мл водопроводной воды и 100 г агара. Устанавливают рН 8,4. Стерилизуют 30 минут при 120° С. При использовании в среду асептически добавляют 20% инактивированной сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта.

Для получения полужидкой или плотной среды Эдварда в среду добавляют соответственно 3 г или 20 г агар-агара.

Приготовление отвара сердечной мышцы. К 1 л дистиллированной воды добавляют 1 кг фарша из мышцы сердца крупного рогатого скота и оставляют на 16-18 часов, периодически перемешивая. Кипятят 30 минут, отстаивают, надсадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр. Полученный отвар разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120° С.

при 120° С. Приготовление дрожжевого экстракта. В 200 мл дистиллированной воды суспендируют 50 г хлебных (пекарских) дрожжей, нагревают до закипания с пенообразованием. Охлаждают, после центрифугирования надосадочную жидкость стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца. Экстракт пригоден в течение 2 недель.

Среда Надь-Погани. В 1 л дистиллированной воды растворяют 2,5 г натрия хлорида, 0,075 г пептона, 2,5 г гидрофосфата натрия. Добавляют 1 мл 2,4%-ного водного раствора фенолового красного. Устанавливают рН 8,0-8,2. Стерилизуют 30 минут при 120° С. Перед использованием в среду асептически добавляют 200 мл дрожжевого экстракта и 200 мл стерильной сыворотки крови лошади.

Среда из гидролизата мышцы сердца крупного рогатого скота. Смешивают 1 часть фарша из мышцы сердца крупного рогатого скота с 1,5 частями дистиллированной воды, кипятят 10-15 минут. Остывшую массу пропускают через мясорубку, отстаивают. К 600 г отстоявшегося фарша добавляют 1 л полученного бульона. Устанавливают рН 8,0. Вносят 150 г измельченной свежей поджелудочной железы крупного рогатого скота и 30 мл хлороформа. Оставляют в закрытой бутылке в темном месте при 45-48° С на 10 суток. Периодически перемешивают. Надосадочную жидкость фильтруют через ватно-марлевый или полотняный фильтр. Устанавливают рН 8,0. Добавляют 2% хлороформа и хранят при 4° С.

К 200 мл гидролизата сердечной мышцы добавляют 400 мл мясной воды, 400 мл дистиллированной воды, 5 г натрия хлорида. Устанавливают рН 8,2. Прокипятив 15-20 минут, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют 30 минут при 120° С.

Среда Хофстад-Доерр. В 2 части дистиллированной воды вносят 1 часть фарша из мяса, сердца I и печени кур, перемешивают. Выдерживают 12 ч при 4-8° С, прогревают I на водяной бане (кипящей) 30 минут, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. К фильтрату добавляют 0,5% натрия хлорида, 5% крови птиц. Устанавливают рН 7,8 и кипятят 30 минут на водяной бане, фильтруют, добавляют 0,5% мальтозы, 20% сыворотки крови птиц, ацетат таллия и пенициллин до конечной концентрации 1:4000 и 100 ИЕ/мл соответственно. Стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца.

Лабораторная диагностика контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота

Контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота — контагиозная болезнь, протекающая в виде крупозной пневмонии в рита с последующим развитием анемических некрозов (сероватки) легких. Возбудитель — *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, род *Mycoplasma*, семейство *Mycoplasmaataceae*. Лабораторная диагностика проводится на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

Прижизненно берут носовую слизь тампонами, носовые истечения жидкость путем пункции грудной полости, кровь. Посмертно берут кусочки пораженных легких, плевральную жидкость, регионарные лимфатические узлы. Материал транспортируют в термосе со льдом в замороженном виде или в питательных средах, в последнем случае в среду добавляют ингибиторы. Материал должен быть подвергнут бактериологическому исследованию в течение нескольких часов, это время может быть увеличено, если материал транспортируют и хранят при -70°C .

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Для посева используют среду Хейфлика, среду ВИЭВ, УНИИЭВ, мартеновский бульон с 10-15% сыворотки крови крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта.

Жидкий исследуемый материал, а также гомогенат легочной ткани засевают на агаровые и бульонные среды. Можно делать посев из тонкости агаровой среды кусочками легочной ткани и лимфатических узлов. Целесообразно из жидкого материала (легочная лимфа, плевральная жидкость), тканевого гомогената (10%-ная взвесь в сердечно-мозговой ткани) готовить последовательные десятикратные разведения и по 0,1 мл разведений 10^{-1} - 10^{-5} высевать на агаровую среду. Нередко из-за присутствия тканевых ингибиторов рост микоплазм получается в более высоких разведениях при отсутствии в малых. Посев материала в полуагарах Хейфлика с 0,15% агара увеличивает частоту выделения возбудителя. Севы инкубируют при 37°C во влажной камере в аэробных условиях.

Рост возбудителя в жидких питательных средах обычно наблюдается через 3-7 суток в виде легкого помутнения, опалесценции, помутнения

С целью выявления колоний микоплазм из пробирок с признаками роста производят высев на агаровые среды. Посевы на агаровых средах начинают ежедневно просматривать через 48 часов инкубирования в течение 5-7 суток, используя стереоскопический микроскоп с увеличением $\times 25-40$. Колонии возбудителя имеют типичную для микоплазм форму «вашиищи-глазуньи» и диаметр 0,1-0,6 мм. На следующем этапе проводят идентификацию колоний микоплазм (или ахлеплазм), дифференцируя их от колоний классических бактерий или L-форм, используя методы, описанные выше, а также посев на среды без селективных факторов. Чистые культуры микоплазм отвивают на жидкую питательную среду и поддерживают путем субкультивирования с интервалом 7 суток.

Идентификация культуры возбудителя. Идентификацию обычно осуществляют серологическими методами: окраска колоний на агаре при помощи референтных флуоресцирующих антисывороток, в тестах ингибции роста и метаболизма — с диагностическими сыворотками, а также определяют ферментативную активность выделенных культур. Для *M. mycoides subsp. mycoides* характерна чувствительность к дигитонину, способность к ферментации глюкозы, редукции тетразолия натрия в аэробных и анаэробных условиях, разжижению сывотки в аэробных условиях при слабой про геолитической активности в анаэробных условиях, инертность по отношению к аргинину и отсутствие фосфатазы (табл. 94).

Таблица 94 - Биохимические свойства видов и серогрупп микоплазм, выделяемых от крупного рогатого скота

Вид или серогруппа	Аргинин	Глюкоза	Фосфатаза	Разжижение сывотки	Редукция тетразолия натрия	Образование пленки и пятен	Гидролиз желатина	Гидролиз казеина	Гемолизирующие свойства колоний
<i>M. mycoides</i>	+	-	+	-	++	-	-	п.д.	+
<i>M. mycoides</i>	+	-	-	-	-/+	-	-	п.д.	-
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i>	-	-	+	-	-/+	+	-	-	d
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i>	-	+	-	d	+/+	-	-	п.д.	d
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i>	-	-	+	-	+/+	d	-	п.д.	+
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i>	-	+	-	-	+/+	+	-	п.д.	-
<i>M. mycoides subsp. mycoides</i>	+	-	Слабая реакция	-	-/+	-	-	п.д.	п.д.

У крупного рогатого скота пневмонию могут, кроме *M. mycoides subsp. mycoides*, вызывать *M. bovis* и *M. dispar*, у гнотобактериальных животных изменения в легких обуславливают уреоплазмы, *M. bovis genitalium*. Инфекция *M. bovis* известна как пневмоартрит крупного рогатого скота, поскольку наряду с поражением легких сопровождается артритами и маститами.

Из генитального тракта крупного рогатого скота могут быть изолированы микоплазмы, уреоплазмы, ахлеоплазмы. *Ureaplasma diversum* вызывает гранулярные вульвиты, эндометриты, аборт, сальпингиты, бесплодие, причем заболевание воспроизводится экспериментально.

Mycoplasma bovis genitalium является причиной бесплодия, некротизирующего эндометрита, везикулита семенников. Причиной эндометритов, сальпингитов, оофоритов, абортов, везикулитов семенников может быть и *M. bovis*, хотя в основном этот вид вызывает пневмонии, артриты, маститы. Из генитального тракта часто выделяют *M. canadense*, *A. laidlawii*, *M. bovirhinis*, *M. alkalencens*, *M. arginini*, *M. verecundum*, *M. alvi*, *A. axanthum*, *A. oculi*. При маститах крупного рогатого скота выделяются *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*. **Лабораторная диагностика** перечисленных микоплазмозов в основном базируется на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

При респираторной патологии материал берут влажными тампонами из глубины носовых ходов, с миндалин. Посмертно берут аналогичным способом материал из трахеи, бронхов, а также кусочки легочной ткани. Материал замораживают и транспортируют. В случае генитальной патологии у коров для исследования берут тампонами мазки из вульвы, так как в матке микоплазмы обнаруживаются редко, при наличии аборта — детритидоны, карункулы, амниотическую жидкость, кусочки легких, у быков — препуциальную слизь, сперму. При подозрении на микоплазменный мастит для исследования с соблюдением асептики отбирают пробы молока. Тампоны помещают в транспортные среды Amies или Stuart, тканевый материал, сперму, молоко транспортируют в замороженном ви-

Выделение и идентификация культур возбудителей

Культивирование. Материал, взятый при респираторной патологии в максимально сжатые сроки после поступления высевают на агаровые среды Фрисс и Хейфлик. Параллельно материал засевают на анаэробные и жидкие питательные среды. Материал, взятый тампонами, а также трахеальные и бронхиальные смывы засевают в бульон в трех разведении (10^1 - 10^3), легочный гомогенат разводят до 10^9 . Посевы инкубируют при 37°C в CO_2 -инкубаторах при высокой влажности. Бульонные посевы через 2-3 дня культивирования высевают на агаровые среды с последующим отщипывкой выросших колоний на жидкие среды. *M. dispar* лучше растет на жидких средах, при изоляции этого вида микоплазм до посева на агаровую среду целесообразно провести несколько пассажей на жидких средах. В материалах больных животных в материале доминируют патогенные микоплазмы, в материалах здоровых животных преобладает смешанная микоплазменная флора.

Материал, взятый из репродуктивных органов для выявления уреаплазм, высевают на уреаплазменный агар и бульон. Крупные куски тканей обжигают в спирте, нарезают и засевают штрихом на агаровую среду, мелкие измельчают в нескольких миллилитрах бульона, оставляют на 5 минут, затем из надосадочной жидкости делают пять десятикратных разведений и засевают на агаровую среду. Из материала, взятого тампонами, делают 5-7 десятикратных разведений, которые высевают на уреаплазменный агар и бульон. Часть посевов инкубируют при 37°C в аэробных, другую — в анаэробных условиях в атмосфере H_2 и CO_2 . Наличие роста уреаплазм в бульоне устанавливают по зашелоачиванию в течение 1-7 суток инкубирования, при наличии которого производят посевы на агаровую среду. Следует иметь в виду, что зашелоачивание может быть вызвано не только уреаплазмами. Посевы на агар производят на наличие колоний в течение 2-10 суток инкубирования.

При исследовании на микоплазмозные маститы образцы молока лучше высевать на агаровую среду Хейфлик.

Идентификация культур микоплазм

При идентификации микоплазм, выделенных из респираторных органов, как экспресс-метод используют метод эпифлуоресценции с применением в первичных посевах на агаровой среде или из разведенной жидкости на агар из бульона. После получения чистых культур путем многократного клонирования колоний идентификацию осуществляют на основании изучения ферментативных характеристик, чувствительности к эритромицину, а также при помощи серологических методов. Для дифферен-

ности представителей родов *Mycoplasma*, *Ureaplasma* и *Acholeplasma* обусловлены чувствительностью к дигитонину и наличием уреазы. Дальнейшее исследование ферментативной активности и культуральных признаков позволяет провести видовую идентификацию основных микоплазм (табл. 94).

Чистые культуры микоплазм, при наличии соответствующих антител, могут быть идентифицированы методом флуоресцирующих антител, в тесте ингибции роста. Имеются сообщения об идентификации *M. bovis* в подмерзавшей цепной реакции, а также обнаружении и идентификации микоплазм в гистосрезах легочной ткани методом флуоресцирующих антител.

Лабораторная диагностика микоплазмозов мелкого рогатого скота

В патологии овец и коз играют роль ряд видов рода *Mycoplasma*, а также при исследовании могут быть выделены некоторые представители родов *Acholeplasma* и *Ureaplasma*.

M. agalactiae является возбудителем контагиозного заболевания овец и коз — инфекционной агалактии, характеризующегося поражением молочной железы, суставов и глаз.

M. mycoides subsp. capri является специфическим патогеном для коз, вызывает септицемию, артриты, маститы, может быть изолирован из легких при пневмониях. Данный вид микоплазм рассматривается как возбудитель контагиозной плевропневмонии, но поскольку в экспериментальных условиях он проявляет низкую вирулентность, то, по мнению некоторых авторов, не может быть признан причиной классической контагиозной плевропневмонии коз.

Микоплазмы таксона F-38 в настоящее время рассматривают как основного возбудителя классической плевропневмонии коз, они отличаются от *M. mycoides subsp. capri*, *M. capricolum*, *M. mycoides subsp. mycoides* типа LC большей требовательностью к питательным средам и антигенными характеристиками. *M. mycoides subsp. mycoides* типа LC вызывает септицемию и полиартриты у молодняка коз, иногда пневмонию. У взрослых коз вызывает маститы, инфицированное молоко которых является причиной септицемии козлят. Микоплазмы типа LC часто выделяют из легких и плеврального экссудата животных с поражениями, напоминающими контагиозную плевропневмонию коз. *M. capricolum* патогенна для овец и

коз, вызывает заболевание, сходное с агалактийным синдромом и с метастатическим заболеванием, обусловленным микоплазмами типа *M. ovirneumoniae* патогенна для овец, вызывает в ассоциации с *P. Anseris lytica* пролиферативную экссудативную пневмонию. *M. putrefaciens* ассоциируется с маститами и агалактией коз, инфекция может также вызывать артриты, септицемией. *M. conjunctivae* известна как возбудитель инфекционного кератоконъюнктивита овец и коз. Микоплазмы типа 2 Дизолируют из генитального тракта овец с репродуктивными расстройствами, вульвовагинитами. Патогенность *M. arginini*, микоплазм типа G, U, V для овец и коз не установлена. *A. oculi* считается возбудителем кератоконъюнктивита коз. Уреаплазмы выделяют из урогенитального репродуктивного трактов овец и коз, их роль в патологии не ясна.

Лабораторная диагностика микоплазмозов мелкого рогатого скота основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

При подозрении на инфекции *M. agalactiae*, *M. capricolum* для исследования берут пробы молока, синовиальную жидкость. От павших в этих животных отбирают часть печени, селезенку, почку, регионарные лимфатические узлы, пораженную часть вымени, суставную жидкость пораженный глаз. Пробы молока отбирают асептически, после сцеживания первых порций молока. Синовиальную жидкость получают путем пункции сустава при помощи стерильного шприца.

При поражении органов дыхания в лабораторию направляют материал из легких, экссудат грудной полости, регионарные легким лимфатические узлы, части печени, селезенки, пораженные глаза, пробы молока.

Во всех случаях при поражениях репродуктивного тракта берут пробы вагинальной слизи, органов зрения — конъюнктивальную жидкость.

Материал доставляют в лабораторию в термосе со льдом или в замороженном виде. В последнем случае допускается хранение материала в течение нескольких суток («Методические указания по лабораторной диагностике инфекционной агалактии овец и коз», 1984; «Методические указания по лабораторной диагностике инфекционной плевропневмонии коз», 1984).

Микроскопическое исследование исходного материала

Для прямого обнаружения микоплазм в мазках-отпечатках из конъюнктивы, плевропневмонии, суставной жидкости при диагностике конъюнктивальной плевропневмонии коз, инфекционной агалактии овец и коз и других

Специально используют окраску по Романовского-Гимза. Препараты фиксируют 15-20 минут этанолом или 5 минут метанолом. Окрашивают краской Романовскому-Гимза (1:10), подогретой до 90°C в течение 20 минут или при комнатной температуре в течение 24 часов. Микоплазмы обнаруживаются в виде мелких полиморфных кокковидных, нитевидных, спириллированных структур розового цвета. В препаратах, окрашенных по Граму, микоплазмы обычно выявить не удастся.

Для подтверждения микоплазмозной этиологии наблюдаемых маститов микоплазмы в молоке обнаруживают окраской акридиновым оранжевым. Готовят 0,01%-ный раствор акридинового оранжевого в фосфатно-цитратном буфере (рН 3,0). Краситель можно хранить при 4° С до 6 месяцев. Исследуемое молоко центрифугируют 5 минут при 1000 г, смешивают равные объемы раствора красителя и молока, оставляют на 5 минут. Затем 10 микролитров смеси помещают на агаровую поверхность и покрывают покровным стеклом. Препарат исследуют под микроскопом как при методе эпифлуоресценции. Микоплазмы имеют яркий зеленый цвет, обычно выглядят округлыми или слегка удлинёнными. Классические бактериальные клетки также флуоресцируют, но слабее; клетки имеют иную морфологию и взаимное расположение.

Выделение и идентификация микоплазм от овец и коз

Культивирование. Исследуемый материал после соответствующей обработки высевают согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике инфекционной плевропневмонии коз, инфекционной агалактии овец и коз на среды Эдварда, Мартена, триптический перевар сердца крупного рогатого скота. Хороший рост *M. agalactiae*, *M. arginini*, *M. putrefaciens*, *M. conjunctivae*, микоплазм таксонов 2D, G, U, V, *A. oculi*, *A. laudlavii* наблюдается при посеве на среду Хейфлик.

Для изоляции микоплазм таксона F-38 посев материала производят на среду Yones и Wood (WYB-сред), так как этот вид микоплазм отличается повышенной требовательностью к составу среды. При выделении микоплазм таксона F-38 рекомендуется материал измельчать, но не растирать и не гомогенизировать и разводить в бульоне до 10^4 .

С целью выделения *M. ovirpneumoniae* посев производят на модифицированную среду Фрисс с использованием методики разведения. Уреаплазма — на среду Ливингстона, Ховарда, Робертсона. *M. conjunctivae* выделяют посевом на плотную среду Хейфлик.

Посевы инкубируют при 37-38° С в течение 5-7 суток, ежедневно просматривая. При отсутствии роста микоплазм в течение этого срока проводят пять последовательных пассажей на средах без ингибиторов с

интервалом 5-8 суток. Рост микоплазм на жидких питательных средах проявляется опалесценцией, легким помутнением. В случае роста на средах Фрисс, «WJB» микоплазм, расщепляющих глюкозу (*M. putrifaciens*, F-38), наблюдается изменение цвета среды. При росте уреазазы в среде Ливингстона происходит ее окрашивание в красный цвет (слабая среда) или формирование окрашенных в соответствующий цвет колоний на плотной среде.

Выделение чистых культур микоплазм и их дифференцирование L-форм бактерий проводят по стереотипной схеме. Морфология микоплазм на плотных средах соответствует типичной, т.е. имеет форму «яичницы-глазуньи». Исключением является *M. ovipneumoniae*, колонии которой на средах с 1,5-2% агара не образуют вырастающего темного центра, что затрудняет, из-за смывания колоний, применение методов дифлуоресценции для идентификации.

Отличительным культуральным признаком *M. putrifaciens* является характерный для микоплазм гнилостный запах при росте на плотных жидких питательных средах, образование пленки и пятен на яичной среде. Штаммы *M. mycoides subsp. mycoides* типа LC (козьи штаммы) отличаются от типового штамма *M. mycoides subsp. mycoides* (тип SC, овечьи штаммы) размером колоний. Колонии микоплазм типа LC достигают 1 и более миллиметров в диаметре (LC — large colony — большие колонии), при 0,5 и менее миллиметров у микоплазм типа SC (SC — small colony — мелкие колонии). Кроме того, «козьи штаммы» более активно растут в жидких питательных средах, расщепляют казеин, устойчивы к температуре 45° С, способны к росту на агаре с 5% кровяного барана или крупного рогатого скота.

Идентификация выделенных культур микоплазм. С целью точной идентификации изолированных микоплазм, помимо вышеперечисленных культуральных признаков, исследуют ферментативные свойства: чувствительность к дигитонину, образование пленок и пятен, наличие уреазы, казеиназы, фосфатазы, способность расщеплять аргинин и дифференцируют по критериям, изложенным в таблице 95.

Таблица 95 - Критерии дифференциации микоплазм, выделенных от мелкого рогатого скота (Rosendal S., 1994)

(тип таксона) микоплазм	Чувствительность к динитрофу	Урепла	Глюкоза	Аргинин	Фосфатаза	Тяжелки и легкая	Расщепление казеина
<i>M. agalactiae</i>	+	-	-	-	+	+	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> , тип LC	+	-	+	-	+	+	+
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> , тип SC	+	-	+	-	-	-	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	+	-	+	-	-	-	+
<i>M. capricolum</i>	+	-	+	(+)*	+	-	-
Таксон F-38	+	-	+	-	+	-	+
<i>M. thermophilum</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. agalactiae</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>M. putrefaciens</i>	+	-	-	+	-	+	-
<i>M. conjunctivae</i>	+	-	-	-	-	+	-
Таксон 2D	+	-	-	-	+	+	-
Таксон G	+	-	+	+	-	-	-
Таксон U	+	-	-	+	-	-	-
Таксон V	+	-	+	-	-	-	-
Уреоплазмы	+	+	-	-	н. д.	-	н. д.
<i>A. ovis</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>A. laidlawii</i>	-	-	+	-	-	-	-

Для серологической идентификации *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* типа LC, *M. mycoides* subsp. *capri* и других микоплазм, изолированных от овец и коз, при наличии соответствующих антисывороток используют тест ингибиции роста, метод флуоресцирующих антител, РДП и другие серологические реакции. *M. mycoides* subsp. *capri* имеет много общих признаков с микоплазмами типа LC, но отличается антигенно. Микоплазмы таксона F-38 проявляют антигенное родство с *M. capricolum* в РДП, реакции иммунофлуоресценции.

Биопроба. При лабораторной диагностике инфекционной агалактии овец и коз согласно действующей в РФ инструкции биопробу проводят на кроликах (масса 2,5- кг) или, в случае необходимости, на естественно восприимчивых животных (овцы или козы 1--месячного возраста). Животных заражают исследуемым материалом или выделенной культурой микоплазм. Исследуемый материал -гомогенизируют 1:10 в стерильном физиологическом растворе с ингибиторами (пенициллин — 1000 ЕД/мл, ацетат таллия — 1:2000000), выдерживают 1 час при комнатной температуре. При заражении культурой применяют 3--суточную бульонную культуру. Кроликам прокалывают переднюю камеру глаза шприцом с тонкой иглой, отсасывают 0,05-0,1 мл жидкости и, не вынимая иглы, вво-

дят 0,1-0,2 мл материала. Контролем служит другой глаз, в который вводят 0,1-0,2 мл стерильного бульона. Положительный результат — реакция через 5-2 дней после заражения кератита. Срок наблюдения — 30 дней. Овец и коз заражают введением материала в дозе 5 мл подкожно в молочный канал или в дозе 2 мл в сустав. Наблюдение за животными проводят в течение 30 суток. Положительный результат — появление клиники, характерной для инфекционной агалактии. Больных животных убивают и подвергают бактериологическому исследованию.

Инструкцией по лабораторной диагностике инфекционной пневмонии коз в РФ предусматривается проведение биопробы на 1-2 месячных козлятах. Заражения проводят исследуемым материалом в суточной бульонной культурой 3-го пассажа. Материал предварительно подвергают обработке ингибиторами (см. выше). Двум козлятам материал в дозе 10 мл вводят внутримышечно. Наблюдение за животными осуществляют в течение 30 дней. В положительных случаях летальный исход обычно наступает через 7-10 суток. На вскрытии обнаруживают характерные патологоанатомические изменения. Трупы животных подвергают бактериологическому исследованию.

Серологическая диагностика

Для обнаружения антител при инфекции *M. agalactiae* апробированы РСК, ELISA -тест, тест ингибиции образования пленки и пятна.

Ретроспективную диагностику инфекции *M. mycoides subsp. mycoides* проводят при помощи ELISA, РСК, РИГА. Для групповой диагностики инфекции *M. mycoides subsp. mycoides* типа LC апробирована РИГА, инфекции *M. capricolum* — РСК и РИГА, инфекции *M. ovipneumoniae* — РИГА, инфекции *M. putrefaciens* — РСК и пробирочная РА, инфекции *M. putrefaciens* — тест ингибиции метаболизма.

Лабораторная диагностика микоплазмозов свиней

Основную роль в патологии свиней играют следующие виды микоплазм: *M. hyopneumoniae* (*M. suis pneumoniae*) — возбудитель пневмонии (энзоотической) свиней, *M. hyorhinis* — возбудитель полисерозитов и лиарtritов поросят. Обычным представителем микрофлоры верхних дыхательных путей является *M. hyosynoviae* — возбудитель артритов свиней 12-24-недельного возраста. Кроме того, из клинических образцов могут быть выделены другие виды микоплазм (*M. flocculate*, *M. suis*, *M. A. granularum*, *M. arginini*, *A. laidlavii* и др.). Лабораторная диагностика

диагностика пневмозов свиней основывается на результатах бактериологического исследования, а в случае инфекции *M. hyopneumoniae* также на данных серологических тестов.

Бактериологическое исследование

Материал для исследования. Для исследования на инфекцию *M. hyopneumoniae* берут на острой стадии болезни фрагменты верхушечных, сердечных и добавочных долей легких, бронхиальные лимфатические узлы. Рекомендуется брать участки легких, включающие как пораженную, так и здоровую ткань. Для предупреждения контаминации участка легочной доли пережимают широким пинцетом, обрезают позади пинцета и, не раскрывая его, помещают ткань на 7-8 секунд в кипящую воду, удаляют избыток воды и переносят материал в стерильный флакон с 8-10 мл стерильной среды для гомогенизации, затем вырезают кусочки ткани объемом 1 см³, погружают в среду, измельчают в ступке или другим способом.

Часть тканевой взвеси высевают на обычные бактериологические среды, вторую половину используют для обнаружения микоплазм. Для иммунофлуоресцентного исследования берут блок ткани размером 1 см³.

При подозрении на инфекцию *M. hyorhinitis* и *M. hyosynoviae* для исследования отбирают внутрисуставную жидкость, в случае полисерозитов — плевру, перикардиум и перитониум.

Микроскопическое исследование исходного материала

Прямое обнаружение микоплазм в препаратах, окрашенных обычными способами, имеет малую диагностическую ценность. Практикуется выявление *M. hyopneumoniae* в материале методом иммунофлуоресценции. В этом случае один из приготовленных на предметном стекле препаратов обрабатывают антисывороткой *M. hyopneumoniae*, другой — нормальной сывороткой. Используют иммунопероксидазный тест для выявления *M. hyopneumoniae* в бронхиальном эпителии.

Выделение и идентификация свиных микоплазм

Культивирование. Выделение культур *M. hyopneumoniae* проводят путем посева исследуемого материала в жидкие питательные среды, т.к. на плотных средах в первичных посевах данный вид микоплазм растет плохо. Образцы исследуемого материала рекомендуют высевать в среду на основе перевара Хоттингера с дрожжевым и печеночным автолизатом. Отдельные ученые предлагают использовать модифицированную среду ИИЗ на основе мартеновского бульона с добавлением сыворотки крови

лошади, экстракта дрожжей, глюкозы, лактальбумина гидролизата. В следующем материале достаточно часто могут присутствовать другие виды микоплазм, в том числе растущие более быстро, *M. hyorhyniae*, что затрудняет выделение и идентификацию возбудителя. Наиболее эффективно использование среды Friss с добавлением антисыворотки против *M. hyorhyniae* и циклосерина, что обеспечивает ингибирование роста *M. flocculata* и *M. hyorhyniae*.

Рекомендуется тканевой материал после измельчения в питательной среде в ступке или гомогенизаторе подвергнуть центрифугированию со скоростью 1,5 тыс. об/мин в течение 15 минут, надосадочную жидкость обработать уксусной кислотой и пропустить через стерилизующие фильтры, поместить в среду для микоплазм и с целью контроля на МПА, МПБ, среду Friss и Тароцци. Инкубирование проводить при 37° С до 10 суток с ежедневным просмотром сред. При отсутствии изменений в среде через 4-6 суток делают до 2-5 «слепых пассажей» с параллельными посевами на питательную среду.

Другие исследователи предлагают следующую апробированную методику бактериологического исследования: тканевый гомогенат (1:10) разводят в среде Friss до 10^4 и инкубируют при 37° С до трех суток. *M. hyorhyniae* лучше растет, если культивирование осуществляют на роликовом способе. Посевы просматривают ежедневно на наличие помутнения и изменения pH. В положительных случаях помутнение наступает в 5-6-е сутки, при малом содержании возбудителя — позднее. Аналогичные изменения на среде Friss без ингибиторов и антисыворотки против *M. hyorhyniae* могут вызвать *M. flocculata* и *M. hyorhyniae*, причем последний вид растет быстро. Параллельно к 1 мл миллилитр разведения 10^2 добавляют к 50 мл среды, пропускают через целлюлозный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Затем фильтр помещают в питательную среду, культивируют, отслеживая изменения pH, помутнение, высушивают и исследуют на наличие микроколоний в реакции иммунофлуоресценции.

При подозрении на инфекцию *M. hyorhyniae* (полиартриты, пневмония) производят посев материала на среду Friss без циклосерина, антисыворотки или на другие среды для микоплазм, на большинстве из которых этот вид микоплазм хорошо растет. Из материала делают разведения в среде Friss до 10^3 - 10^4 , инкубируют при 37° С, отслеживая изменение pH и появление помутнения. При наличии бактериальных контаминантов наблюдается интенсивное помутнение среды в низких разведениях, изменение pH или защелочение pH. С целью выявления *M. hyosynoviae* материал (сывороточная жидкость, синовиальные мембраны) измельчают 1:10 и помещают

на бульоне для *M. hyosynoviae* разведения 10^3 - 10^4 . Посевы инкубируют при 37°C с ежедневным контролем. Рост *M. hyosynoviae* сопровождается слабым помутнением среды или его отсутствием, защелочением pH и образованием пленки, на стенках пробирки формируется мыло-подобный налет. При посеве на агаризованную среду (7% агар Нобеля) большинство штаммов образуют пленки и пятна, а также отложения на колониях «перламутровых кристаллов». Выделение чистых культур *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* проводят по стереотипной схеме.

Идентификация выделенных культур микоплазм. Выделенные чистые культуры микоплазм идентифицируют по совокупности культуральных, ферментативных признаков, гемогглютинирующей активности. При этом определяют способность микоплазм утилизировать глюкозу, маннозу, аргинин, разжижать желатин, казеин, сыворотку, редуцировать тетрациклин, образовывать фосфатазу, пленки и пятна при росте на питательных средах, а также агглютинировать эритроциты. Характеристики основных видов свинных микоплазм приведены в таблице 94.

При идентификации *M. hyopneumoniae* в реакции иммунофлуоресценции рекомендуется 2 мл первичной культуры в разведении 10^1 пропустить через мембранный фильтр с порами диаметром 0,2 мкм, потом поместить их в среду Friss и инкубировать при 37°C 5-6 дней, что приводит к образованию на фильтрах микроколоний возбудителя, которые идентифицируют непосредственно на мембранных фильтрах следующим образом.

Таблица 96 - Дифференциальные признаки свинных микоплазм

Признаки. тесты	Вид микоплазм			
	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. hyosynoviae</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. flocculate</i>
Глюкоза	+	-	+	+
Аргинин	н.д.	+	-	-
Уреаза	-	-	-	-
Фосфатаза	н.д.	-	+	-
Тетрациклин	-/w	+/+	+/+	-/w
Желатин	н.д.	н.д.	-	W
Билесин	н.д.	н.д.	-	н.д.
Разжижение сыворотки	н.д.	+	-	н.д.
Пленки, пятна	н.д.	+	-	

Примечание: аэробно/анаэробно, w — слабая реакция, н.д. — нет данных

Фильтр помещают в стерильный фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,5) и отмывают на магнитной мешалке в течение 10 минут.

Фильтр берут пинцетом и ополаскивают в аналогичном буфере.

Просушивают мембраны на стерильной фильтровальной бумаге, выписывают, разрезают на 3 части, в соответствии с подписями (1,2,3).

Каждую часть фильтра помещают в лунку планшета; к отдельным частям фильтра добавляют предварительно разведенные сыворотки *M. hyopneumoniae*, *M. flocculate* и нормальную кроличью сыворотку, инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут.

Каждую часть фильтра споласкивают в фосфатно-солевом буфере (рН 7,5), а затем отмывают в аналогичном растворе на магнитной мешалке в течение 10 минут.

Фрагменты фильтра просушивают на бумаге, вновь помещают по отдельности в лунки планшета, к каждому сегменту фильтра добавляют большее разведение антикроличьей люминесцирующей сыворотки и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут.

Споласкивают в фосфатно-солевом буфере (рН 7,5), затем отмывают в аналогичном растворе при помощи магнитной мешалки в течение 10 минут.

Подсушивают кусочки фильтра на бумаге, помещают все три фрагмента на предметное стекло, наносят на них по капле забуференной цитратной ризы, покрывают покровным стеклом и исследуют при помощи флуоресцентного микроскопа как при методе эпифлуоресценции.

При исследовании антисыворотку *M. hyopneumoniae* необходимо проверить на перекрестные реакции с *M. flocculate*. При обнаружении реагирующих антител проводят адсорбцию сыворотки: 10 мл антисыворотки *M. hyopneumoniae* смешивают с центрифугатом 100 мл бульонной культуры *M. flocculate*, смесь выдерживают 1 час при 37° С, ночь при 4° С, центрифугируют, надосадочная жидкость представляет собой адсорбированную иммунную сыворотку.

Обычно идентификацию микоплазм осуществляют методом флуоресцентного окрашивания колоний на агаровой среде Friss или на мембранных фильтрах. Тест ингибиции роста также может быть использован для этой цели, но из-за штаммовых антигенных различий результат может быть неоднозначным.

Идентификацию культур *M. hyosynoviae* осуществляют на основании изучения признаков, а также в тесте ингибиции роста, иммунофлуоресцентного окрашивания колоний на агаровой среде или микроколониальных мембранных фильтрах.

Биопроба. Используют при диагностике инфекции, вызываемой *M. hyorhinis*. Для заражения берут поросят-сосунов или животных 2-3-месячного возраста, желательны выращенных без молозива, из хозяйств, неблагополучных по данной инфекции. В качестве материала для заражения используют надосадочную жидкость легочной суспензии (1:100), обработанную ингибиторами, проверенную на наличие бактериальных контаминантов, или тканевый материал предварительно пропускают через мембранные фильтры. Заражение проводят интраназально или трахеально.

Инкубационный период обычно составляет 7-10 суток, диагностический убой целесообразно проводить через 15-20 суток. Из клинических симптомов наиболее типичен кашель, температурная реакция может быть слабой или совсем отсутствовать. В положительных случаях в легких обнаруживают характерные изменения, подтверждением служит реизоляция культур, наличие серологического ответа.

Серологическая диагностика

Методы серологической диагностики инфекций *M. hyorhinis* и *M. hyosynoviae* не разработаны. Серодиагностику микоплазменной пневмонии свиней используют в основном как групповой метод, наиболее апробирована с этой целью РСК. Иммунопероксидазный тест более чувствителен, но менее специфичен.

Лабораторная диагностика микоплазмозов птиц

Перечень наиболее значимых в патологии птицы микоплазм представлен в таблице 97.

Таблица 97 - Основные патогенные микоплазмы птиц

Вид микоплазм	Патология
<i>M. gallisepticum</i>	Респираторный микоплазм кур и индеек. Характеризуется поражением воздухоносных мешков, хроническим течением. Наиболее восприимчивы цыплята 20-45-дневного возраста, а также молодняк кур
<i>M. synoviae</i>	Инфекционный синовит кур и индеек, болят и другие виды птиц. Характеризуется артритами, тендовагинитами, анемией. Наиболее восприимчива птица 4-12-недельного возраста
<i>M. melagroidis</i>	<i>M. melagroidis</i> - инфекция индеек (ММ-инфекция). Характеризуется воспалением воздухоносных пазух, нарушением развития перьевого покрова, деформацией костей.
<i>M. iowae</i>	<i>M. iowae</i> - инфекция цыплят и индюшат. Характеризуется поражением сухожилий, дегенеративными изменениями в печени и селезенке

M.anatis	Микоплазмоз уток. Характеризуется респираторным синдромом. У взрослых уток, у молодняка, у взрослой птицы инфекция протекает бессимптомно, за исключением периода яйцекладки
----------	--

Бактериологическое исследование

При подозрении на респираторный микоплазмоз, вызванный *M.gallisepticum*, для исследования берут соскобы со слизистой гортани, трахеи, стенки воздухоносных мешков, фрагменты легких, головного мозг. В случае отсутствия изменений у взрослой птицы исследуют: точный мешок, трахею, легкие эмбрионов последних дней инкубации и 2-суточных цыплят.

Для исследования на инфекционный синовит (возбудитель *M.synoviae*) отбирают ткани из пораженных суставов, сухожильных влагалищ, стенки воздухоносных мешков. На начальной стадии болезни возбудитель присутствует в крови сердца и паренхиматозных органах.

Значительный экономический ущерб птицеводству причиняют инфекции, вызываемые *M.gallisepticum*, *M.synoviae*, *M.melagris*.

При исследовании на инфекцию *M.melagris* берут слизистую носовых и подглазничных синусов, воздухоносных мешков, трахеи, фабрициев фаллус. Объектом исследования также является фабрициева сумка, а также пораженные эмбрионы.

Тканевый материал замораживают и в термосе со льдом доставляют в лабораторию. Материал, взятый стерильными тампонами, помещают в транспортную среду.

Микроскопическое исследование исходного материала

Рекомендуется мазки-отпечатки фиксировать этанолом (15-20 минут) или метанолом (5 минут) и окрашивать краской Романовского. Для фиксированные мазки окрашивают при комнатной температуре краской разведенной 1:10, в течение 24 часов, промывают и микроскопируют. На подогретую до 90° С краску наливают под стекло, положенное на предметный столик, окрашивают 20 минут, периодически внося горячую краску. Морфология микоплазм в окрашенных препаратах изложена ниже. Наиболее эффективным является выявление и идентификация отдельных видов микоплазм методом флуоресцирующих антител.

Выделение и идентификация культур микоплазм

Культивирование. Выделение *M.gallisepticum* проводят в соответствии с действующей в РФ инструкцией по диагностике респираторного микоплазмоза из материала готовят суспензию 1:10 в МПБ с последующей ее обработкой ингибиторами (ацетат таллия, пенициллин) или фильтрацией через мембранные фильтры № 3,4. Посев производят на одну из питательных сред: Эдварда, Хоттингера, Мартена. Из головного мозга посев проводят без обработки материала ингибиторами. Посев материала, взятого тампонами из трахеи, воздухоносных мешков, а также жидкости из синусов и суставов (0,1 мл) может быть проведен непосредственно в 3-5 мл жидкой питательной среды. При этом оптимальной жидкой питательной средой является среда Фрея, модифицированная для птичьих микоплазм. Для культивирования *M.gallisepticum* в среду Фрея добавляют свиную или лошадиную сыворотку. Инкубирование посевов проводят при 37° С в аэробных условиях до 14 суток, прежде чем результат исследования признают отрицательным. Посевы просматривают ежедневно на наличие роста, который проявляется легкой опалесценцией и слабым помутнением среды. На среде Фрея за счет расщепления глюкозы рост возбудителя сопровождается изменением ее цвета до оранжевого или желтого. Рекомендуется проводить до 4-5 слепых пассажей с интервалом между посевами в 5 дней, для чего 1 мл засеянной среды переносят в пробирку с 5-10 мл свежей среды без ингибиторов. Параллельно производят посев на аналогичную агаровую среду. Посев материала может быть произведен первоначально непосредственно на агаровые среды, однако предварительные пассажи на жидкой среде дают лучшие результаты. Засеянные агаровые среды в чашках Петри инкубируют 3-5 дней при 37° С во влажной камере, во избежание подсыхания среды, лучше в атмосфере с 5% CO₂. Наличие колоний на плотных средах исследуют при помощи микроскопа (x20-x50) в косо падающем пучке света. Типичные колонии имеют диаметр 0,1-1 мм, темный растущий в питательную среду центр, прозрачную периферию (форма «яичницы-глазуньи»). В первичных культурах возвышающийся центр может отсутствовать и проявляется у культур 2-3-го пассажа. Одновременно из культур готовят препараты, окрашенные по Романовскому-Гимза. В положительных случаях в препаратах из седимента бульонной культуры или колоний обнаруживают коккоидные образования светло-фиолетового цвета, диаметром около 0,25 мкм.

Патогенные микоплазмы вырастают на агаровых средах через 4-5 дней, а непатогенные виды (*M.gallisepticum*, *M.gallinarum*,

Acholeplasma) уже через сутки инкубирования. Для подавления роста патогенных микоплазм рекомендуется добавлять в среду соответствующие им иммунные сыворотки. Параллельно проводят дифференциацию обнаруженных колоний от L-форм бактерий.

Из отобранных колоний культуру отвивают в жидкую питательную среду или агаровым блоком на свежую агаровую среду без ингибиторов. Процедуру повторяют до получения чистой культуры.

Выделение культуры *M.sinoviae*. Подготовленный материал для высева этого вида микоплазм высевают на среду Фрея с 10-15% нормальной сыворотки свиньи, инактивированный при 56° С в течение 30 мин, кроме того, в среду добавляют 0,1% восстановленного никотинадениндинуклеотида. Все последующие процедуры по получению чистой культуры возбудителя проводят по вышеописанной схеме.

Выделение культуры *M.melagris*. Исследуемый материал для высева *M.melagris* лучше, как и для изоляции *M.iowae*, высевать на агаровую питательную среду с добавлением лошадиной сыворотки. Рост *M.melagris* отличается замедленным ростом. Колонии *M.melagris*, *M.sinoviae* и *M.gallisepticum* сходны по морфологии.

Идентификация культур микоплазм. Выделенные культуры микоплазм идентифицируют на основании изучения ферментативных, культуральных особенностей, а также при помощи серологических методов. Исследование чувствительности к дигитонину и уреазной активности позволяет определить родовую принадлежность микоплазм (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*). Определение способности к ферментации глюкозы, аргинина и образованию фосфатазы дает возможность отнести isolate к той или иной ферментативной группе. Дальнейшее изучение ферментативных характеристик позволяет установить видовую принадлежность выделенной микоплазмы (табл. 98).

Таблица 98 - Дифференциальные признаки видов микоплазм, выделяемых от птиц

Признаки	Вид микоплазм										
	<i>M. gallisepticum</i>	<i>M. synoviae</i>	<i>M. melagris</i>	<i>M. iowae</i>	<i>M. anatis</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. gallopovans</i>	<i>M. pullorum</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. columbinium</i>
Глюкоза	+	+	-	+	+	+	+	+	+		
Манноза	+	нд	-	нд	д	нд		нд	н	н	
Аргинин (гидролиз)	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Фосфатаза	-	-	+		+					+	

Свойство, патина	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Свойство (функция)	+ / +	- / w	- / +	+ / +	- / +	- / +	- / +	d / d	- / -	- / -	- / +	+ / +	- / -	- / -
Свойство жести	-	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	н.д.	н.д.	н.д.	-	-	-	н.д.
Свойство и	-	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	-	н.д.
Свойство	-	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	-	н.д.	н.д.	н.д.	-	-	-	н.д.
Свойство	+	d	d	+	-	н.д.								

Примечание: аэробно/анаэробно; н.д. — нет данных; d — варьирующий признак.

Гемагглютинирующими свойствами обладают *M. gallisepticum*, *M. sinoviae*, *M. iowae* и иногда некоторые штаммы *M. melagroidis*.

Серологическую идентификацию *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. melagroidis* обычно осуществляют при помощи кроличьих антисывороток в реакциях эпифлуоресценции, РДП, тесте ингибции роста. Штаммы *M. gallisepticum*, *M. sinoviae*, *M. melagroidis* и другие микоплазмы птиц имеют внутривидовые варианты антигенных свойств, что может быть выявлено путем электрофореза белков в полиакриламидном геле.

Биопроба. При диагностике респираторного микоплазмоза биопробу проводят для выделения культуры возбудителя, а также для подтверждения патогенных свойств выделенной культуры микоплазм. Исследуемый материал вводят 7-9-дневным куриным эмбрионам в хориоаллантоисную полость в объеме 0,2 мл. Исследуют эмбрионы, погибшие через 48 часов и позднее после заражения. В положительных случаях обнаруживают отеки и кровоизлияния на коже головы, тела, лапках, застойные и дегенеративные изменения в паренхиматозных органах, отеки и кровоизлияния в околоплодных оболочках, аэросаккулиты, пневмонию. Обычно эмбрионы погибают на 5-7-е сутки. Однако часто требуется один или более пассажей, прежде чем наступают характерные изменения и гибель эмбрионов. При первичном заражении за положительный результат принимают гибель 50% и более зараженных эмбрионов при выживании контрольных.

При диагностике инфекции, вызванной возбудителем *M. synoviae* заражают бульонной культурой интраплантарно, интраартикулярно щипот, индишат и через 3-5 недель в РПГА или РДП регистрируют появление в крови антител к возбудителю, что позволяет титровать изолиро-

ванную культуру. Заражение куриных эмбрионов вызывает их гибель в 4-14-е сутки.

Испытание патогенных свойств *M. meleagridis* показало штаммовую вариабельность вирулентных свойств возбудителя. При заражении культурой возбудителя куриных эмбрионов гибели не наблюдают. В результате заражения 7-14-дневных эмбрионов у 30-70% вылупившихся птенят обнаруживают патологические изменения.

Штаммы *M. iowae* варьируют по вирулентным свойствам, некоторые штаммы вызывают гибель куриных и индюшиных эмбрионов при заражении в желточный мешок.

Серологическая диагностика

Серологические тесты применяют при диагностике болезней, вызванных *M. gallisepticum*, *M. sinoviae*, *M. meleagridis*. Серологические реакции, из-за низкого титра антител, практически не используют для диагностики *M. iowae* — инфекции.

Реакция агглютинации на стекле. Используют РА на стекле с чистой кровью или сывороткой крови. Используют окрашенные антигены *M. gallisepticum*, *M. sinoviae*, *M. meleagridis*. На предметном стекле помещают 0,02 мл исследуемой сыворотки и 0,03 мл антигена, компоненты перемешивают в течение 2-3 минут и учитывают результат по общепринятой системе. Зараженная птица становится серопозитивной через 10 дней после инфицирования. Чувствительность и специфичность реакции зависят от метода изготовления антигена.

Возможно наличие ложных положительных реакций после применения-гетерологичных эмульгированных вакцин. При оценке эпизоотической ситуации в хозяйствах обследуют приблизительно 5-10% поголовья. Положительная РА у 50% птиц и более указывает на наличие инфекции *M. gallisepticum*.

Для подтверждения результатов исследование разведенных сывороток крови. Агглютинация в титрах 1:8-1:10 и более оценивается как положительный результат. Результаты пластинчатой РА также подтверждают реакцию ингибиции гемагглютинации.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). При помощи РТГА определяют зараженность родительского стада кур, наличие антител в сыворотке крови суточных цыплят, желтке яиц после удаления зародка. РТГА более специфична, но менее чувствительна, чем РА на стекле. Кроме того, РТГА более специфична, но менее чувствительна, чем РА на стекле при диагностике инфекции, вызываемой *M. gallisepticum*.

видовой антигенной гетерогенности антигены из разных штаммов могут не выявлять антитела к другим штаммам. Реакцию ставят, используя антиген в количестве четырех гемагглютинирующих единиц, титр 1:40-1:80 и более оценивают как положительный результат.

Иммуноферментный метод. Используют твердофазный ИФА для диагностики инфекций, вызываемых *M. gallisepticum*, *M. sinoviae*, *M. melioidis*, хотя, видимо из-за характеристик антигенов, регистрируются случаи ложных положительных реакций.

Лабораторная диагностика риккетсиозов

Риккетсии представляют собой палочковидные или кокковидные грамотрицательные бактерии. Риккетсии, патогенные для сельскохозяйственных и домашних животных, на искусственных питательных средах не растут. Объединены в порядок *Rickettsiales* с подразделением на три семейства: *Rickettsiaceae* — обитают в ядерных клетках организма хозяина, *Bartonellaceae* обитают в ядерных клетках и эритроцитах; *Anaplasmataceae* — обитают в эритроцитах. В настоящее время семейство *Bartonellaceae* переведено из порядка *Rickettsiales* в порядок *Rhizobiales*. В ветеринарной практике из семейства *Rickettsiaceae* значимы представители рода *Rickettsia* — паразитируют в клетках эндотелия сосудов, рода *Coxiella* — обитают в вакуолях клеток ретикулоэндотелиальной системы, рода *Helicobia* — паразитируют в циркулирующих лейкоцитах, рода *Cowdria* — паразитируют в клетках эндотелия сосудов, рода *Neorickettsia* — паразитируют в ретикулярных клетках лимфоидной ткани. Из семейства *Anaplasmataceae* играют роль в патологии животных виды рода *Anaplasma*, паразитирующие в эритроцитах, рода *Haemabartonella* — локализируются на и в эритроцитах, рода *Eperythrozoon* — локализируются на эритроцитах.

Лабораторная диагностика Ку-лихорадки

Ку-лихорадка (Q-febris) — природно-очаговая риккетсиозная болезнь многих видов животных и человека. У сельскохозяйственных животных заболевание протекает относительно доброкачественно, но они могут служить источником возбудителя для человека, у которого Ку-лихорадка

проявляется как острая системная инфекция, обычно сочетанная с интерстициальной пневмонией. У животных (крупный и мелкий рогатый скот, мулы, лошади, свиньи, собаки, куры) болезнь характеризуется высокой лихорадкой, может сопровождаться конъюнктивитом, ринитом, бронхопневмонией, артритом, маститом, абортацией.

Передача возбудителя от животного к животному может осуществляться инфицированными клещами (свыше 50 видов) или алиментарно.

Возбудителем болезни является *Coxiella burnetii*, род *Coxiella*, отряд *Rickettsiae*. **Лабораторная диагностика** основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

Прижизненно берут кровь. Для заражения куриных эмбрионов берут пробы гепаринизированной крови, выделения из матки и плаценты в случае аборта, пробы молока, клещей с животного, но — измененные участки легких, фрагменты селезенки, паренхимы печени, головного мозга, регионарные пораженным органам лимфатические узлы.

Микроскопическое исследование исходного материала, методы диагностики. Из исследуемого материала готовят мазки, окрасивают по Романовскому, Гименечу и др. (см. «Хламидиозы»). В большинстве случаев внутри клеток при окраске по Романовскому — пурпурно-красные кокковидные клетки размером 0,2-0,4 мкм или розовые палочки, похожие на *C.psittaci*.

Используют сэндвич — вариант твердофазного ИФА для обнаружения антигена возбудителя в исследуемом материале. Данные ИФА в 100% случаев совпадают с результатами биопробы на белых курочках. Близкой чувствительностью при обнаружении возбудителя обладает метод флуоресцирующих антител (прямой вариант). Детекцию ДНК возбудителя в материале эффективно проводят при помощи ПЦР.

Выделение и идентификация *C.burnetii*

Культивирование в куриных эмбрионах. Для заражения куриных эмбрионов подходит нитрированная кровь. В случае возможной контаминации материала посторонней микрофлорой тканевый гомогенат в биологическом растворе (1:10) обрабатывают пенициллином (1000 ЕД/мл) и стрептомицином (500 ЕД/мл) в течение 60 минут, делают контрольные высевы на МПА, МПБ. Суспензию в объеме 0,2-0,25 мл или нитрированную кровь вводят в желточный мешок (см. «Хламидиозы»). Источником

Павшие куриные эмбрионы, начиная с 4-5 суток яйца ежедневно овоцитируют. Павшие эмбрионы вскрывают по мере гибели, после 8 суток допускается вскрытие живых эмбрионов. При отрицательных результатах проводят до 4-6 «слепых» пассажей. Риккетсии обнаруживают в оболочке желточного мешка в окрашенных препаратах или при помощи метода непрямых антигенов. После адаптации штамма к куриным эмбрионам из ткани эмбриона можно экстрагировать антиген и идентифицировать его в серологических реакциях с иммунными сыворотками против риккетсии *S. burneti*.

Выращивание в культуре клеток. Культивирование *S. burneti* может быть проведено в культуре фибробластов куриного эмбриона, эпителия желточного мешка, почечного эпителия и т.д. Риккетсии хорошо размножаются в клетках ФСЦ, Нер-2, КП, ПК, ТК, СК, трипсинизированных клетках куриных эмбрионов. С пятого дня зараженные культуры клеток исследуют путем микроскопии окрашенных мазков, в РИФ и ПЦР.

Заражение лабораторных животных. Суспензию из исходного материала (1:5) обрабатывают антибиотиками и вводят интраперитонеально взрослым свинкам массой 250-300 г в дозе 3-5 мл или молодым кроликам. Младших свинок ежедневно термометрируют, проводят до 3-5 «слепых» пассажей. У погибших или убитых в период лихорадки животных берут мазки с брюшины, готовят мазки, микроскопируют, исследуют в РИФ. По результатам заражения судят по наличию риккетсий в препаратах. Длительное наблюдение за животными (35-40 дней) позволяет поставить диагноз на основании исследования сывороток крови в РСК.

Серологическая диагностика

Антитела выявляются в серологических реакциях через 2-3 недели после заражения. Для этого используют РСК, ELIS A, РА. В соответствии с «Методическими указаниями по серологической диагностике лихорадки Ку у животных» (1996) в РФ используют реакцию длительного связывания комплемента, ИФА, РСК.

Реакция связывания комплемента. В РСК применяют антиген из 1 формы *S. burneti*. Исследуемые сыворотки крови разводят 1:10, инактивируют в водяной бане при 56-58° С в течение 30 мин. Контрольную порцию сыворотку не инактивируют. Средой разведения служит 0,85%-ный раствор натрия хлорида (рН 7,0-7,4). Берут 2%-ную взвесь эритроцитов барана, гемолизин в удвоенном титре. Комплемент разводят 1:10 и титруют в разведениях 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:50, 1:60, в присутствии антигена в рабочем разведении при общем объеме компонентов 0,5

мл. В опыт берут комплемент в удвоенном титре. Испытуемую и контрольную негативную сыворотку исследуют в разведении 1:10 (с и без него), контрольную позитивную — в разведениях с 1:10 до предельного титра. Остальные контроли проводят как обычно при РДСК. Первая фаза РДСК длится 18-20 часов при 4-6° С и 20 минут при повышенной температуре, вторая фаза — 30 минут в водяной бане при 37-38° С. Результаты реакции учитывают через 18-20 часов выдерживания проб при 4-6° С при условии задержки гемолиза в контроле с позитивной сывороткой до ее предельного титра и при полном гемолизе с позитивной сывороткой.

Результат реакции оценивают как положительный при задержке гемолиза с испытуемой сывороткой (1:10) на 3-4 креста, сомнительный — при задержке гемолиза на 1-2 креста. При сомнительных результатах сыворотку крови от таких животных исследуют повторно через 15-21 день. При повторном получении сомнительного или отрицательного результатов животное признают здоровым.

Непрямой вариант ИФА. Используют при сенсibilизации животного антигеном для РДСК из I фазы возбудителя лихорадки Ку. ИФА по чувствительности превосходит РДСК.

Реакция микроагглютинации. При помощи данной реакции выявляют антитела в молоке (индивидуальные пробы, сборное молоко), сыворотке крови. Молоко до исследования хранят при 4-8°С или консервируют 0,1% формалина. В качестве антигена применяют очищенную суспензию *S. burneti* в I фазе, окрашенную гематоксилином. Реакцию проводят в капиллярах. Капилляр заполняют молоком, затем антигеном («Реакция микропреципитации»), капилляры закрепляют в пластинку, инкубируют при 37° С в течение 5 часов или 24 часа при комнатной температуре. В молоке, содержащем агглютинины к возбудителю, сыворотка приобретает сине-черный цвет — положительный результат.

Лабораторная диагностика инфекционного гидроперитонита животных

Трансмиссивная, остро протекающая инфекционная болезнь преимущественно крупного рогатого скота, овец и коз, характеризуется лихорадкой, анорексией, лейкопенией и лихорадкой, нервными явлениями и скоплением жидкости

ности тела и сердечной сорочке. Распространена в Центральной, Восточной и Южной Африке. Передается через иксодовых клещей рода *Amblyoma*, в организме которых сохраняется до 3 лет. Возбудитель — *Cowdria ruminantum*, род *Cowdria* (вид перенесен в род *Ehrlichia*, семейство *Rickettsiaceae*). **Лабораторная диагностика** основывается на результатах бактериоскопического исследования мазков из материала и члениковых биопробы.

Бактериологическое исследование

Прижизненно для постановки биопробы берут стерильно и дефибрируют кровь через 2-4 дня после начала лихорадки. Возбудитель отличается низкой устойчивостью, выживает при комнатной температуре не более пяти часов, при -70°C — до двух лет. Одним из вариантов сохранения возбудителя до постановки биопробы является введение интраперитонеально материала мышам, в организме которых возбудитель сохраняется достаточно долго (30 суток) без признаков заболевания мышей. После смерти объектом исследования являются крупные сосуды (аорта, артерия вены), в эндотелии которых наиболее часто обнаруживается возбудитель, а также серое вещество головного мозга, почки, в капиллярах которых также присутствуют риккетсии. Возбудитель может быть обнаружен у клещей.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из нескольких мест интимы яремной вены, аорты делают соскобы, готовят мазки. Также готовят гистосрезы из почек, коры мозга (аммоновых рожек). Рекомендуется готовить мазки — отпечатки из кусочков ткани мозга путем раздавливания между предметными стеклами. У клещей исследуют содержимое кишечника. Препараты фиксируют метанолом, окрашивают по Романовскому-Гимза. Возбудитель локализуется в вакуолях цитоплазмы клеток эндотелия, имеет коккоидную (0,3 мкм), палочковидную (0,3 x 0,5 мкм) или диплококковую форму, цвет клеток от синего до пурпурного. Для выявления возбудителя используют РИФ и ПЦР.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Возбудитель удается культивировать в перевиваемой линии клеток эндотелия сосудов человека, где его выявляют микроскопически, в РИФ и ПЦР.

Биопроба. Проводят на овцах, иммунных к вирусной лихорадке овец, так как вирус может помешать интерпретации результатов. Заражение осуществляют внутривенно. Инкубационный период составляет около 11 дней. Животных убивают через 2-4 дня после появления лихорадки и ис-

следуют на наличие возбудителя. При доставке в лабораторию инокулированных в полевых условиях, их убивают через 4-21 дней, зенку растирают в бульоне и вводят внутривенно овцам. Биопробу проводят на мышах с учетом результата по сероконверсии.

Серологическая диагностика

Серологическая диагностика из-за малой специфичности (ЭЛНЦ) малоэффективна.

Лабораторная диагностика эрлихиозов

Возбудители эрлихиозов относятся к семейству *Rickettsiaceae*, роду *Ehrlichiae*. Эрлихии не патогенны для человека, вызывают заболевания животных, некоторые из них приспособились к обитанию в организме членистоногих, для других представителей векторы не известны. На бесклеточных питательных средах и куриных эмбрионах эрлихии культивировать не удается, лабораторные животные устойчивы. Наиболее значимы в патологии животных следующие виды эрлихий: *Ehrlichia phagocytophila* (вид перенесен в род *Anaplasma*) — возбудитель лихорадочное заболевание крупного рогатого скота (клевчатая лихорадка), овец и диких животных, вектор *Ixodes ricinus*, заболевание может сопровождаться абортами, снижением удоев, животные худеют; *Ehrlichia equi* — возбудитель лошадиного эрлихиоза, распространен в основном в США, вектор не известен, болезнь проявляется лихорадкой, отеками конечностей; *Ehrlichia canis* — возбудитель тропического эрлихиоза собак (тропическая панцитопения собак), вектор *Rhipicephalus sanguineus*. **Лабораторная диагностика** в основном базируется на результатах микроскопического исследования материала, применяются иммунологические методы диагностики и изоляцию возбудителя, а также серодиагностику.

Бактериологическое исследование

При подозрении на инфекцию *E. phagocytophila* для исследования берут кровь через 3-4 дня после начала лихорадки, делают мазки из центрифугированную кровь хранят при 4°C, в этом случае возбудитель остается жизнеспособным до семи суток, при -70° С — несколько месяцев. Для исследования на эрлихиоз лошадей берут пробы крови на 3-5-е сутки после лихорадочного состояния. С целью диагностики эрлихиоза собак

крови, на 2-3-й сутки после повышения температуры или биоптаты из легких, печени, селезенки.

Микроскопическое исследование материала

Мазки из крови, биоптатов фиксируют метанолом, окрашивают по Романовскому-Гимза, при наличии антисывороток используют метод флуоресцирующих антител.

E. phagocytophila обнаруживают в гранулоцитах, реже — в моноцитах. В период риккетсемии поражены до 6-50% гранулоцитов. Для отрицательного ответа необходимо исследовать не менее 100 клеток. Морфология возбудителя складывается из превращения элементарного тельца овальной или кокковидной формы красного цвета диаметром около 0,4-0,5 мкм в тельце размером 1-2 мкм, с последующей трансформацией в морулу (образование похоже на тутовую ягоду) диаметром 2-4 мкм. Цикл развития завершается распадом морулы на элементарные тельца.

Есть данные о применении флуоресцирующих антител для обнаружения возбудителей в головном мозге.

При исследовании на инфекцию *E. canis* возбудитель можно обнаружить в окрашенных мазках крови на 2-3-й сутки после появления температуры, лучше в мазках из лейкоцитарного слоя. Возможно обнаружение возбудителя в биоптатном материале из печени, селезенки, легких. Морфология возбудителя такая же, как и у *E. phagocytophila*, локализуется в моноцитах или лимфоцитах.

E. equi наиболее успешно удается обнаружить в мазках из свежей крови, поражено бывает от 0,5 до 73% гранулоцитов (в среднем 35%). Элементарные тельца имеют диаметр около 0,2 мкм, цвет от голубого до серо-голубого, морула достигает диаметр 5 мкм. С успехом апробирована для выявления эрлихий полимерная цепная реакция.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Для изоляции возбудителей используют перевиваемые или первичные культуры клеток костного мозга и нейтрофилов крови. Идентификацию возбудителя проводят микроскопически, в РИФ, ПЦР.

Биопроба. Инфекция, вызываемая *E. phagocytophila* воспроизводится введением дефибринированной крови, взятой в период лихорадки, крупному рогатому скоту, овцам. Инкубационный период составляет 4-8 дней. Чумной собачьей воспроизводится заражением животных кровью, возможным культивированием возбудителя в культуре моноцитов собак. При зара-

жении кровью молодых лошадей клинические признаки инфекции воспроизводятся не всегда.

Серологическая диагностика

Испытаны непрямой метод флуоресцирующих антител, ЭЛИЗА для обнаружения антител в крови при инфекциях, вызываемых *E. equi* и другими эрлихиями. Выпускается диагностический набор ЭЛИЗА (фирма Helica Biosystems).

Лабораторная диагностика неориккетсиоза собак

Возбудитель относится к трибе *Rickettsiae*, роду *Neorickettsia*, представленному одним видом *Nihelminthoeca*. В настоящее время род *orickettsia* дополнен видами *N. risticii* и *N. sennetsu*. В природе риккетсий обитает в организме трематоды *Nanophyetus salmositidis* и в свою очередь, в организме лососевых рыб. Все стадии развития трематоды (яйца, редии, церкарии, метацеркарии) инфекционны для собак. Возбудитель в искусственных питательных средах, куриных эмбрионах не культивируется. Паразитирует в ретикулэндотелиальной и лимфоидной системы, включая макрофаги. Собаки, лисы заражаются при поедании рыбы, развивается лихорадка. Болезнь регистрируется в южных районах США. **Лабораторная диагностика** основывается на результатах микроскопического исследования материала, выявлении возбудителя методом непрямой иммунофлуоресценции.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования являются прижизненно взятые биопсии лимфатических узлов на стадии лихорадки. Кровь содержит возбудителя, но методом микроскопии его обнаружить трудно. Риккетсий выживают при -70°C выживают до 6 месяцев.

Микроскопическое исследование материала

Мазки фиксируют метанолом, окрашивают по Романовскому-Гимза Маккиавелло. Возбудитель в окрашенных препаратах имеет кокковидную форму или полиморфен (короткие палочки, кольцевидные структуры, иногда сложные колонии), локализуется в цитоплазме ретикулярных клеток лимфоидных тканей; по Романовскому-Гимза окрашивается в синий

Эпид. Маккиавелло — голубой и розовый цвета. В циркулирующих лимфоцитах возбудитель не выявляется, хотя кровь инфекционна.

Испроба. На собаках путем заражения кровью или тканью селезенки можно проводить серийные пассажи возбудителя. Инкубационный период 6-12 дней.

Серологическая диагностика

Используют РСК с антигеном из мезентериальных лимфатических узлов. Возможны перекрестные реакции с антителами против *E. canis*, *E. faucei* и *E. sennetsu*.

Лабораторная диагностика анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота

Анаплазмоз проявляется лихорадкой непостоянного типа, снижением удоя у лактирующих животных, анемией, истощением. Род *Anaplasma* содержит четыре вида: *A. marginale* — возбудитель анаплазмоза крупного рогатого скота, восприимчивы другие виды животных; *A. centrale* — возбудитель легкой формы анаплазмоза крупного рогатого скота; *A. ovis* — возбудитель анаплазмоза овец и коз, может вызывать анаплазмоз в легкой форме у крупного рогатого скота. Род дополнен видами *A. phagocytophilum* и *A. platium*, ранее отнесенным к эрлихиям. *A. cuaditum* — обуславливает заболевание крупного рогатого скота. Ни один из перечисленных видов культивировать на питательных средах не удалось. **Лабораторная диагностика** основана на результатах микроскопического исследования, идентификации возбудителя методом флуоресцирующих антител, данных серологических исследований.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является кровь больных и подозрительных по заболеванию животных.

Микроскопическое исследование материала

Мазки фиксируют метанолом (3-5 минут) или этанолом (20-25 минут), окрашивают по методу Романовского-Гимза (краска Гимзы 1-2 капли на 1 мл нейтральной или слабощелочной воды). Анаплазмы в основном располагаются по периферии эритроцита, имеют округлую точковидную форму (0,2-1,2 мкм), темно-красный цвет. При внедрении возбудителя в

эритроцит цитоплазматическая мембрана выпячивается внутрь, образуется вакуоль, в которой клетка возбудителя делится и формируется включение размером 0,3-0,4 мкм. Образование включений совпадает с поздней стадией болезни и периодом реконвалесценции (Приложение № 1 к инструкции по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота (1970)). Критерии дифференциации анаплазм от эсперитрозоонов, трипанозом, бабезий и тейлерий представлены в таблице 97. Для выявления анаплазм может быть использован метод прямого флуоресцирующего акридиновым оранжевым, а при наличии антисывороток — метод непрямых флуоресцирующих антител. При сомнительных результатах микроскопического исследования прибегают к серологическим методам диагностики.

Серологическая диагностика

Наличие анаплазмозного антигена позволяет для целей серологической диагностики анаплазмоза применять непрямой метод флуоресцирующих антител, РСК. В соответствии с утвержденной «Методикой постановки РСК для диагностики анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота» (1971) сыворотки крови, разведенные 1:5, включая контрольные позитивную и негативную, инактивируют при 58-60°C в течение 30 минут. Сыворотки крови при исследовании разводят от 1:5 до 1:1280. Эритроциты используют в виде 2%-ной взвеси, гемолизин в тройном титре. Антигены из *A. marginale* готовит ВНИИЭВ. Комплемент берут в оптимальном количестве. РСК ставят в объеме 0,5 мл. Первую фазу РСК проводят при 37°C в течение 60 минут, вторую фазу — 20 минут. Задержку гемолитического креста и более считают положительным результатом РСК. Антититр антител считается диагностическим, титрование сывороток позволяет сделать заключение о стадии носительства (титр до 1:40) или выздоровления (более 1:40, вплоть до 1:1280).

Лабораторная диагностика эсперитрозооза

Из представителей рода *Eperythrozoon* в патологии животных наибольшее значение имеют следующие виды: *E. ovis* — вызывает у животных в возрасте 1-3-месячного возраста заболевание с выраженными клиническими симптомами, анемию, потерю веса; *E. suis* — возбудитель свинного эсперитрозооза, обычно протекающего субклинически, однако возможна эмбриональная смертность и аборт. Ни один вид эсперитрозоона

В бесклеточных питательных средах культивировать не удастся. **Лабораторная диагностика** основана на результатах микроскопического и серологического исследований. В РФ регистрируется эперитрозооноз овец.

Бактериологическое исследование

От убитого или павшего животного (овцы) в лабораторию направляют кусочки селезенки, печени, лимфатических узлов, мазки крови.

(Методические указания по лабораторным исследованиям на эперитрозооноз овец», 1985).

Микроскопическое исследование материала

Из органов делают мазки-отпечатки, фиксируют метанолом (3-5 минут) или этанолом (20-25 минут) и окрашивают по Романовскому 30-45 минут (3 капли азур-эозина на 2 мл дистиллированной воды с pH 7,0-7,2) или проводят прямое флуорохромирование акридиновым оранжевым. Эперитрозооны морфологически представляют кокковидные или кольцевидные образования размером 0,4-1,5 мкм, редко палочки розоватого или розово-фиолетового цвета. На поверхности эритроцитов возможно скопление кольцевидных форм. Согласно «Методическим указаниям по лабораторным исследованиям на эперитрозооноз овец» (1985) для дифференциации эперитрозоонов от анаплазм, бабезий, пироплазм и тейлерий рекомендуется руководствоваться критериями, изложенными в таблице 99.

Таблица 99 - Дифференциальная таблица возбудителей

Возбудитель	Форма клетки	Локализация
Эперитрозоон	Округлая, овальная, палочковидная, гантелевидная, кольцевидная	На поверхности эритроцитов, тромбоцитов, по их периферии, между ними
Анаплазма	Палочковидная, округлая	По периферии, в центре эритроцита
Пироплазма	Округлая, грушевидная (парная, одиночная), парная расположена под острым углом или параллельно	В центре эритроцита
Бабезия	Округлая, грушевидная (парная, одиночная); парная расположена под прямым углом	Чаще по периферии, в центре эритроцита
Тейлерия	Круглая, овальная, палочковидная, запятовидная, анаплазмозидная, крестообразная	В эритроците

Серологическая диагностика

Для диагностики эperyтpозооноза свиной испытаны и рекомендован непрямой метод флуоресцирующих антител и PCK.

Лабораторная диагностика гемабартонеллеза кошек

Возбудитель относится к семейству *Anaplasmataceae*, роду *Hemobartonella*, виду *H. felis*. Заболевание известно как инфекционная анемия кошек. Возбудитель локализуется в эритроцитах. На бесклеточных питательных средах не культивируется, не патогенен для других видов млекопитающих. **Лабораторная диагностика** основана на результатах микроскопического исследования материала.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является кровь и ткани больных животных.

Микроскопическое исследование материала

Мазки фиксируют метанолом, окрашивают по Романовскому-Гимза или флуоресцирующими антителами. Возбудитель имеет кокковидную (0,1-0,8 мкм) или палочковидную (0,2-1,5 мкм) форму, локализуется в углублениях поверхности или вакуолях эритроцитов, редко — в цитоплазме. Кольцевидные структуры встречаются редко. При окраске по Романовскому-Гимза цвет клеток темно-пурпурный.

Биопроба. При внутривенном, интраперитонеальном или интракраниальном заражении материалом кошек воспроизводится клинически выраженное заболевание.

Лабораторная диагностика хламидиозов

Хламидии представляют собой кокковидные, грамотрицательные бактерии, которые являются облигатными внутриклеточными паразитами, энергезависимыми от клетки хозяина, поэтому на искусственных питательных средах не растут. Размножаются внутри связанных с мембраной вакуолей в цитоплазме клеток млекопитающих и птиц. Относятся к семейству *Chlamydiaceae*, роду *Chlamydia*, который ранее подразделялся на два вида хламидии.

В настоящее время подтверждена фенотипическая гетерогенность хламидии и на основании результатов методов геносистематической классификации проведена реклассификация известных видов хламидии, определены новые

патогенное положение так называемых «хламидиоподобных» бактерий. В соответствии с этими критериями порядок *Chlamydiales* подразделен на четыре семейства и пять родов. Семейство *Chlamydiaceae* включает роды *Chlamydia* (виды: *C.trachomatis*, *C.suis*, *C.muridatum*); *Chlamydophila* (виды: *C.pneumoniae*, *Speorum*, *Cpsittaci*, *C.abortus*, *C.caviae*, *C.felis*). Семейство *Parachlamydiaceae* представлено родом *Parachlamydia* с одним видом *P.acanthamoebae*. Семейство *Simkaniaceae* включает род *Simkania* с видом *S.negevensis*. Семейство *Waddliaceae* представлено родом *Waddlia* с видом *W.chondrophila*. В пределах рода *Chlamydia* вид *C. suis* рассматривается как возбудитель конъюнктивита, эггериита и пневмонии у животных; *C. trachomatis* является исключительно паразитом человека; *C. muridatum* определен как патоген грызунов. В роде *Chlamydophila* вид *C. speorum* рассматривается как возбудитель бесплодия у коал, отдельные штаммы выделяют от жвачных млекопитающих и свиней. Вид *C. pneumoniae* является возбудителем респираторных болезней человека (биовар TWAR), лошадей (биовар Equine) и коал (биовар Koala). *Chlamydophila psittaci* (прежнее название — *Chlamydia psittaci*) согласно новой классификации включает штаммы восьми сероваров, для которых основными хозяевами являются птицы, и они могут передаваться человеку. Вид *C. abortus* в основном вызывает аборт у жвачных животных, но также обнаруживается у свиней, кроликов, мышей. *C. felis* обуславливает риниты и конъюнктивиты у кошек. *C. caviae* рассматривается как вид, эндемичный для гвинейской свиньи. Представители семейства *Parachlamydiaceae* поражают простейших и не представляют интереса для ветеринарных микробиологов. У единственного вида семейства *Simkaniaceae* естественный хозяин не установлен, он выделен только из культуры клеток. В семействе *Waddliaceae* вид *W. chondrophila* выделен из абортировавшего плода коровы.

Таблица 100 - Патогенные свойства хламидий

Вид хламидий	Характер вызываемой патологии. Виды поражаемых животных
--------------	---

C. psittaci	Аборты лошадей, коз, свиней, коров, овец, вульвовагиниты крупного рогатого скота. Энтериты, артриты телят. Энтериты, артриты телят. Энцефаломиелит крупного рогатого скота (спорадический). Пневмония свиней, коз, овец, крупного рогатого скота, кошей. Офтальмия крупного, мелкого рогатого скота, свиней. Пситтакоз (орнитоз) птиц с явлениями пневмонии. Аэросаккулит, перикардит, энцефалит, Конъюнктивит, энтерит. Пневмонии, аборты, конъюнктивиты человека.
C. trachomatis	Поражения у человека органов зрения (трахома, конъюнктивиты и др.) - паратрахома), репродуктивных органов (уретриты, сальпингиты, вагиниты, эпидидимиты и др.).

Методы диагностики, позволяющие четко дифференцировать хламидий у животных, пока в полном объеме недоступны для большинства лабораториям. Наиболее перспективным методом видовой идентификации хламидий представляется в этом плане полимеразная цепная реакция.

Лабораторная диагностика хламидиозов основана на обнаружении возбудителя в ПЦР, микроскопическом обнаружении клеток возбудителя в окрашенных мазках, идентификации в препаратах из исследуемого материала при помощи серологических реакций (МФА, ELISA), идентификации возбудителя путем заражения куриных эмбрионов и лабораторных животных с последующей идентификацией хламидий в органах и тканях при помощи вышеуказанных методов, а также на результатах исследований сывороток крови в серологических реакциях. Работы по диагностике антропозоонозных хламидиозов проводят только в лабораториях, которые имеют специальное разрешение режимной комиссии.

Бактериологическое исследование

В случае абортов берут кусочки плаценты, абортированные органы или паренхиматозные органы, а также сычуг, образцы влагалищной слизи не позднее 1-2 дней после аборта. Образцы слизи отбирают ватно-марлевыми тампонами, которые потом помещают в пробирку с физиологическим раствором, содержащим 500 мкг/мл стрептомицина. При наличии конъюнктивитов соскобы с конъюнктивы берут затупленным скальпелем с предварительной ее обработкой 0,5% раствором йода. Готовят мазки, фиксируют для окраски по Романовскому-Гимза или Мори и иммунопероксидазным методом. От павших или вынужденно убитых животных отбирают кусочки паренхиматозных органов, лимфатические узлы, образцы слизи носовой полости, трахеи, тонкого отдела кишечника, головного мозга и мозговых оболочек. При наличии у больного

ных артритов направляют также синовиальную жидкость. У животных-производителей принудительно получают пробы эякулята. Материал для исследования берут в первые два часа после гибели или аборта животного. Флаконы с материалом помещают в термос со льдом и доставляют в лабораторию не позднее 24 часов после взятия. Оптимальным является помещение и доставка материала в термосе со льдом в специальной транспортной среде Spenser&Jonson (1983): сахараза — 74,6 г; KH_2PO_4 — 0,512 г; K_2HPO_4 — 1,237 г; L-глутаминовая кислота — 0,721 г; феноловый краситель — 0,015 г; ванкомицин — 100 мг; нистатин — 50 мг; стрептомицин — 100 мг; гентамицин — 50 мг; дистиллированная вода — 1000 мл. При помощи КОН устанавливают pH 7,0 и стерилизуют фильтрацией. Среду разливают по 4 мл во флаконы и хранят при $-20^{\circ}C$. В этой среде хламидий остаются жизнеспособными при комнатной температуре до 30 дней, при $4^{\circ}C$ — до 34 дней. Для таких же целей можно использовать среду 199 с 5% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота или сахарозо-фосфатный буферный раствор с фетальной сывороткой (5-10%), с добавлением стрептомицина (100-200 мкг/мл), нистатина (25 мкг/мл), гентамицина (100 мкг/мл). Возможна иная комбинация антибиотиков: гентамицин — 20 мкг/мл, нистатин — 25 мкг/мл, ванкомицин — 100 мкг/мл. Реакцию сред устанавливают 7,0-7,1. Сахарозо-фосфатный буфер готовят по следующей прописи: 1-й раствор содержит 68,46 г сахаразы в 100 мл дистиллированной воды, 2-й раствор — 2,088 г безводной соли K_2HPO_4 в 60 мл дистиллированной воды, 3-й раствор — 1,088 г безводной соли KH_2PO_4 в 40 мл дистиллированной воды. Все три раствора объединяют, доводят объем дистиллированной водой до 1000 мл, соляной кислотой доводят pH до 7,0-7,1, стерилизуют при $115^{\circ}C$ в течение 15 минут, хранят при $4^{\circ}C$.

Для серологических исследований берут с интервалом в две недели парные пробы крови от клинически больных или подозрительных по заболеванию животных.

Микроскопическое исследование исходного материала

Возбудитель обнаруживают в мазках, окрашенных по Стампу, Гимза, Маккиавелло и др., а при наличии соответствующих компонентов в реакциях иммунофлуоресценции или при помощи иммунопероксидазного теста.

Предваря интерпретацию микроскопической картины при изучении окрашенных препаратов, более подробно останавливаемся на стадиях морфогенеза хламидий. В процессе жизнедеятельности хламидии подвержены следующим морфологическим изменениям («морфогенез»).

Вначале клетка хламидий в виде элементарных тельц фагоцитируется клеткой-хозяином. Элементарные тельца — электронноплотные, легко видимые образования с компактным нуклеоидом, трехслойной клеточной стенкой, диаметром около 0,2-0,25 мкм. В течение нескольких часов после фагоцитоза элементарные тельца увеличиваются в размерах и превращаются в ретикулярные формы (инициальные или ретикулярные тельца), которые размножаются путем бинарного деления. Ретикулярные тельца имеют сферическую форму, сетчатую структуру, тонкую клеточную стенку и фибриллярный нуклеоид, их размер достигает 0,8-1,3 мкм в диаметре. Промежуточную морфологическую стадию между элементарными и ретикулярными тельцами называют промежуточными тельцами. Хламидии размножаются внутри цитоплазматических везикул и образуют микроколонии, окруженные мембраной, состоящей из мембраны клетки-хозяина, внедрившейся в цитоплазму на стадии фагоцитоза. В составе колоний имеются все три стадии развития хламидий. В одной клетке-хозяине может быть несколько микроколоний, число которых соответствует количеству фагоцитированных хламидий. Элементарные тельца являются инфекционными, а ретикулярные — вегетативными, неинфекционными. После разрыва стенки везикулы и клетки-хозяина освобождающиеся элементарные тельца инфицируют другие клетки и цикл повторяется. В принципе морфогенез хламидий соответствует диморфизму и размножения обычной бактериальной клетки на поверхности твердой питательной среды.

Окраска по Маккиавелло. Мазки фиксируют фламбированием, покрывают полоской фильтровальной бумаги; окрашивают раствором А 10 минут; промывают дистиллированной водой; обрабатывают раствором В 20-30 сек промывают водопроводной водой; окрашивают раствором С 30 секунд; промывают водой.

Раствор А: 250 мг основного фуксина в 100 мл бидистиллированной воды (хранится 10 дней при 4° С). Раствор В: 10 г лимонной кислоты в 100 мл бидистиллированной воды. Раствор С: 1 г метиленовой сини в 100 мл бидистиллированной воды.

Микроскопическая картина: хламидии — красного цвета, ядра клеток — темно-синие, клетки — светло-синие.

Окраска по методу Романовского раствором Гимза. Мазки фиксируют этанолом, метанолом или спирт-эфиром. Краску добавляют в дистиллированную подщелоченную воду (рН 7,4) из расчета 1 капля краски на 1 мл воды. Окрашивание ведут при комнатной температуре в течение

16-18 часов (П.Ф. Здродовский). Для выявления микроструктуры риккетсий автор предлагает фиксировать препараты пикроформолом по Буэну (повышенный водный раствор пикриновой кислоты — 75 мл, формалина — 25 мл, ледяной уксусной кислоты — 5 мл) в течение 30 минут, промыть 2-3 часа дистиллированной водой с трехкратной заменой, далее проводить окрашивание в течение 18-20 часов.

Рекомендуется маточный раствор красителя разбавлять фосфатно-буферным раствором (рН 7,2). Фиксированные мазки окрашивают в специальных кюветках в вертикальном положении при комнатной температуре 20-24 часа, промывают дистиллированной водой, обрабатывают 10 секунд подкисленным этанолом (3-5 капель уксусной кислоты на 15-20 мл спирта), вновь промывают и микрокопируют.

Р.Х. Хамадаев (1984) рекомендует на фиксированный мазок налить 3-5 капель концентрированного красителя, через 10 минут добавить 3-5 капель дистиллированной воды (рН 6,8-7,0). Окрашивание проводят 16-18 часов. Далее краску смывают, препарат промывают водопроводной водой, обрабатывают этанолом 1 минуту, промывают дистиллированной водой, вновь дифференцируют этанолом 30 секунд, промывают дистиллированной водой.

Микроскопическая картина: хламидии локализуются в цитоплазме в виде единичных клеток или скоплений, имеют красно-фиолетовый цвет, более крупные структуры — сине-фиолетовые.

Окраска по видоизмененному способу Нохта. Мазки фиксируют спирт-эфиром, окрашивают кипящей смесью азур II и эозина с двух-трехкратной сменой красителя через каждые 2-3 минуты в течение 10 минут. Риккетсии в окрашенном препарате имеют розовато-красный цвет. При окраске по этому способу азур II и эозин используют в виде водных водных растворов 1:1000. Обычно на 1 мл дистиллированной воды берут 3 капли азур III и 2 капли эозина.

Окраска по Кастанеда. Препарат не фиксируют. Окрашивают 3-4 минуты свежеприготовленной смесью азур с формалином и фосфатным буфером, препараты промывают водой, в течение нескольких секунд окрашивают раствором сафранина, промывают водой и микрокопируют. Микроскопическая картина: риккетсии — сине-фиолетовые, фон — розовый. Недостаток метода — плохая дифференциация внутриклеточных риккетсии. Красители и реактивы: 1% водный раствор азур II с добавлением 0,5% формалина; 1% водный раствор сафранина; фосфатный буфер (рН 7,4-7,6); формалин (обычный). Перед окраской к 20 мл фос-

фатного буфера добавляют 1 мл формалина и 20 капель 1% раствора фуксина II. Элементарные тельца (инфекционная форма хламидий) имеют округлую форму и размеры 0,2-0,4 мкм, крупные неинфекционные формы достигают 0,5-1,0 мкм.

Согласно действующему наставлению по диагностике хламидий мазки или мазки-отпечатки окрашивают по Романовскому-Гимте следующим образом. Препараты фиксируют 96% этанолом, метанолом или охлажденным безводным ацетоном в течение 5 минут. Затем препараты окрашивают в течение 1,5 часов краской Романовского-Гимта, разведенной 1:10 фосфатным буфером с pH 7,2-7,6, промывают дистиллированной водой, подсушивают, микроскопируют.

Микроскопическая картина: цитоплазматические включения представляют собой компактные или рыхлые зернистые массы, состоящие из клеток возбудителя на разных стадиях морфогенеза. Они часто располагаются вблизи ядра клетки-хозяина, смещая его к стенке клетки. Форма включений может быть правильной и неправильной. Мелкие ранние включения содержат крупные тельца и имеют сине-фиолетовый цвет, крупные включения состоят из мелких зернистых структур, имеющих розовый цвет. В одной клетке могут одновременно присутствовать включения разной степени зрелости.

По мнению ряда авторов, окраска по Романовскому-Гимте мало подходит для выявления хламидий в желточных мешках из-за трудности дифференциации возбудителя и детрита.

В окрашенных препаратах возбудитель похож на клетки бруцелл по формам и размерам. Дифференциацию *S. psittaci* и бруцелл можно провести на основании результатов МФ А, иммунопероксидазной реакции или бактериологических и серологических исследований.

Окраска по Стампу. Мазки фиксируют фламбированием и окрашивают следующим образом: карболовый фуксин Циля, разведенный дистиллированной водой 1:5 (pH 7,4) — 15 минут; промывание дистиллированной водой; раствор серной кислоты — (0,05%) — 1 минуту; промывание дистиллированной водой; водный раствор малахитового зеленого (1%) — 30 секунд; промывание дистиллированной водой.

Микроскопическая картина: хламидий — красного цвета, ядра — тонок — темно-синие; фон — зеленоватый.

Окраска по модифицированному методу Гименеж. Мазки из стенок желточных мешков зараженных куриных эмбрионов фиксируют на пламени, окрашивают 5 минут 0,25% водным раствором метиленового фуксина, промывают водой, окрашивают 0,8% водным раствором метиленового

готового зеленого 30 секунд, промывают водой, обесцвечивают 2 минуты 0,3% раствором лимонной кислоты, промывают, докрашивают малахитовым зеленым 30 секунд. Затем обесцвечивают 1% раствором хлорангидрида 1 минуту, промывают водой и микроскопируют.

Микроскопическая картина: элементарные тельца и тельца включения имеют красный цвет, фон — зеленый.

Окраска акридиновым оранжевым (прямое флуорохромирование).

Мазки фиксируют жидкостью Карнуа 5 минут, двукратно отмывают фосфатно-цитратным буфером (рН 3,8) по 2-4 минуты, наносят рабочий раствор акридинового оранжевого на 10-20 минут, трижды промывают фосфатно-цитратным буфером по 2 минуты, препарат заключают в этот буфер, покровное стекло прикрепляют парафином. Препарат исследуют в люминесцентном микроскопе со светофильтрами СЗС, БС и ФС.

Микроскопическая картина: элементарные тельца ярко-зеленые, промежуточные формы — от соломенно-темного до оранжевого цвета.

Жидкость Карнуа: шесть частей 96% этанола, три части хлороформа, одна часть ледяной уксусной кислоты.

Фосфатно-цитратный буфер (рН 3,8): лимонная кислота — 10 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 15 г, дистиллированная вода — 1000 мл.

Маточный раствор акридинового оранжевого: акридиновый оранжевый — 0,1 г, фосфатно-цитратный буфер — 100 мл.

Рабочий раствор красителя готовят в концентрации 1:10 тыс. — 1:30 тыс. с использованием в качестве разбавителя фосфатно-цитратного буфера.

Имунофлуоресцентное выявление хламидий. Прямой метод иммунофлуоресценции. Мазки фиксируют холодным ацетоном 5-10 минут (на холоде), промывают ФСБР, обрабатывают 30-40 минут при 37° С смесью флуоресцирующей (ФИТЦ) хламидийной сыворотки и бычьего альбумина, меченного родамином, взятого в удвоенном титре. Далее препараты промывают ФСБР (рН 7,2), наносят каплю забуференного глицерина, накрывают покровным стеклом и микроскопируют. Микроскопическая картина: хламидии — изумрудно-зеленые, фон — оранжевый.

Коммерческий диагностический набор для выявления хламидии прямым методом, выпускаемый в настоящее время, включает: лиофилизированные моноклональные антитела, меченные ФИТЦ и содержащие краситель. Эванса; растворитель для лиофилизированных иммуноглобулинов; жидкость для «заключения» препарата. При использовании этого диагностического набора диагноз на хламидиоз считается положительным, если в препарате обнаруживают ярко-зеленые внесеточные элементарные

тельца хламидии округлой формы с ровными краями. Иногда обнаруживаются ретикулярные тельца, размер которых в 2-3 раза больше. Парные клеточные включения выявляются не более чем в 10% случаев. В отсутствие отрицательного контроля готовят мазки из аналогичного материала от заведомо здоровых животных.

Непрямой метод реакции иммунофлуоресценции. Мазки фиксируют, как описано выше, после подсушивания на воздухе на 30-40 секунд выливают рабочий раствор синьки Эванса (1:10 000), смывают водопроводной водой (слабая струя). Наносят на препарат хламидийную немеченую сыворотку в рабочем титре (титр не менее 1:32-1:64), выдерживают 30 минут при 37° С. Промывают ФСБР три раза по 5-10 минут. Далее на препарат наносят меченую ФИТЦ антивидовую сыворотку в рабочем титре, выдерживают препарат 30 минут во влажной камере при 37° С, тщательно промывают ФСБР и далее исследуют, как описано выше, с использованием тофильтрами ФС1-2, БС-8-2, СЗС7-2 и запирающим ЖС18. Микроскопическая картина: хламидии — изумрудно-зеленые, фон — красный разных оттенков. Вместо синьки Эванса можно брать бычий альбумин, меченый родамином, который в удвоенном титре смешивают с сывороткой первой ступени 1:1. Контроли обычные для МФА.

Коммерческий диагностический набор для непрямой МФА содержит не меченные ФИТЦ моноклональные противохламидиозные антитела и соответствующую меченную ФИТЦ антивидовую сыворотку.

Выявление хламидии методом полимеразной цепной реакции

Коммерческий диагностический набор включает компоненты для выделения ДНК *S. psittaci* из исследуемого материала; набор для проведения ПЦР (смесь праймеров «chlA», смесь нуклеотидов, 5-кратный реакционный буфер, деионизированная вода, фермент Taq-полимераза, воск для ПЦР, масло минеральное); набор для электрофоретического анализа продуктов ПЦР. Для исследования используют паренхиматозные органы павших или вынужденно убитых животных, перевязанный матурами с двух сторон сычуг абортированных плодов; замороженную сперму или пробы эякулята, мочу от производителей, подозреваемых в заболевании, соскобы слизистых оболочек конъюнктивы и уретерального тракта. Материалы доставляют согласно инструкции по диагностике хламидиозов в лабораторию в день взятия или на следующий день, сохраняя при 4° С. Допускается хранение материала при -20° С в течение 30 дней. Пробы мочи доставляют в тот же день. ПЦР ставят по общепринятой методике.

Имеются сообщения об успешном подборе праймеров, позволяющих проводить детекцию хламидии на видовом уровне.

Выделение и идентификация хламидии

Для изоляции хламидии могут быть использованы следующие биологические системы: мыши, морские свинки, куриные эмбрионы и культуры клеток. В диагностических лабораториях обычно используют три основные системы.

С целью деконтаминации исследуемый материал растирают в стерильном физиологическом растворе (1:5), содержащем тиомерсал и канмицин 1:20 000, стрептомицин — 0,5 мкг/мл, центрифугируют суспензию при 4-5 тыс. об/мин 30 минут, отсасывают верхнюю половину надосадочной жидкости и выдерживают ее 16-18 часов при 4-6° С или 2-3 часа при комнатной температуре. Либо поступают следующим образом: готовят 10%-ную суспензию на физиологическом растворе (рН 7,2-7,4), центрифугируют при 2000 об/мин 15 минут, в надосадочную жидкость добавляют стрептомицин (150 мкг/мл), пенициллин (100 ЕД/мл), выдерживают смесь 2-4 часа при 4-6° С. Материал из тканей кишечного тракта готовят в виде 10-15%-ной суспензии, кроме пенициллина и стрептомицина добавляют гентамицин (20 мкг/мл), нистатин (25 мкг/мл).

С целью контроля наличия бактерий других групп материал высевают на МПБ и МПА, среду Кита-Тароцци.

Заражение куриных эмбрионов. Яйца берут от кур, в рационе которых нет антибиотиков. Для заражения используют 6-7-дневные куриные эмбрионы. Скорлупу в зоне пуги дезинфицируют (70% этанол, 2% йод), прокалывают зондом. С помощью шприца 0,2-0,3 мл суспензии вводят в желточный мешок на глубину около 3 см. Отверстие заливают парафином. Заражают не менее 4-6 эмбрионов. Контроль за жизнеспособностью эмбрионов осуществляют методом овоскопии. Гибель эмбрионов в первые трое суток инкубирования считают неспецифической. В первом пасмо специфическая гибель обычно наступает на 8-11-е, а в последующих — на 6-8-е сутки инкубирования эмбрионов. Погибшие эмбрионы исследуют: после вскрытия скорлупы и оболочки воздушной камеры, захватывают стерильным пинцетом желточный мешок в области пупочного канатика, помещают в стерильную чашку Петри; оболочку отмывают от желтка стерильным физиологическим раствором, кусочком оболочки желточного мешка делают тонкие мазки на предметных стеклах, которые окрашивают одним из методов для обнаружения хламидий. Хламидии размножаются только в ткани желточного мешка.

При отсутствии специфической гибели на 12-е сутки зараженные эмбрионы вскрывают, из желточных мешков готовят 10% суспензии, центрифугируют и центрифугатом заражают новую партию куриных эмбрионов. При получении отрицательных результатов (отсутствии специфической гибели) проводят до трех последовательных слепых пассажей.

В случае необходимости адаптированные штаммы хламидий можно культивировать на хориоаллантаоисной оболочке (ХАО) и в аллантаоисной жидкости. С целью пассирования в аллантаоисной жидкости материал в дозе 0,3-0,4 мл вводят в аллантаоисную полость 8-9-дневных куриных эмбрионов. Для заражения на хориоаллантаоисную оболочку используют 10-12-дневные куриные эмбрионы. В положительных случаях на 14-15 сутки на ХАО формируются узелки, состоящие из элементарных тел хламидий.

Заражение в полость аллантаоиса. Над воздушной камерой скальпелем прокалывают продезинфицированную скорлупу. Шприцом, на 2-3 мм ниже границы воздушной камеры, вводят 0,3-0,4 мл исследуемого материала. Отверстие в скорлупе заливают парафином.

Заражение на хориоаллантаоисную оболочку. Скорлупу дезинфицируют и обрезают ножницами вокруг над воздушным пространством. Пинцетом осторожно снимают небольшой кусочек подскорлуповой оболочки. На видимый участок хориоаллантаоисной оболочки наносят материал, отверстие в скорлупе закрывают стеклянным колпачком и его края заливают парафином.

Наличие хламидий устанавливают исследованием мазков из оболочки желточных мешков эмбрионов, павших на 4-12-й день после заражения в любом из трех последовательных пассажей методом МФА, ПЦР и также окраской одним из вышеперечисленных методов.

Заражение лабораторных животных. Действующей инструкцией по диагностике хламидиозов предусматривается внутрибрюшинное и интраорбитальное заражение белых мышей и морских свинок.

Белые мыши. Используют животных массой 16-20 г. Мыши чувствительны к внутрибрюшинному, интраназальному, торакальному и внутримозговому способам заражения животных. При отсутствии гибели животных на 10-е сутки после заражения убивают, из паренхиматозных органов готовят центрифугат 10% суспензии и проводят заражение отдельной группы животных. В целом проводят три и более «слепых» пассажей.

Внутрибрюшинно материал вводят в дозе 0,1-0,3 мл. В зависимости от степени вирулентности штамма хламидий животные заболевают и

погибают на 5-10-е сутки. На вскрытии в положительных случаях в брюшной полости находят скопление серозно-фибринозного экссудата, небольшое увеличение селезенки и печени. Из этих органов делают мазки-отпечатки и подвергают исследованию с целью обнаружения и идентификации хламидий.

Интраназально материал вводят в дозе около 0,05 мл в каждую ноздрю мышам (масса —12-16 г), находящимся под легким эфирным наркозом. Проводят до 3-6 «слепых» пассажей. Для заражения используют легочную ткань. Адаптированные штаммы вызывают гибель мышей на 4-6-е сутки. У погибших животных находят очаговую или лобарную пневмонию. Мазки-отпечатки для легочного исследования готовят из пораженных участков легких. В положительных случаях находят локализованные внутри- и внеклеточно элементарные тельца хламидий.

Внутриголовное заражение. Используют молодых мышей массой 5-6 г. Удаляют (выщипывают) шерсть на голове, дезинфицируют кожу 3% раствором йода, трепаном делают небольшой прокол черепа в теменной области. Материал вводят при помощи шприца. Проводят до 5 «слепых» пассажей, адаптация хламидий наступает с 3-4 пассажей. В этом случае мыши погибают на 3-5-е сутки.

Интраторакальное заражение. Материал вводят мышам в объеме 0,3 мл через межреберные ткани с правой стороны.

Морские свинки. Используют животных массой 250-300 г. До заражения пункцией сердца берут кровь для серологического исследования. Морские свинки наиболее чувствительны к внутрибрюшинному и интра-тора-кальному заражению. Материал вводят в объеме 0,5 мл. Симптомы болезни проявляются через 1-3 недели, наблюдается повышение температуры тела до 40-41° С. Погибает 80-100% зараженных животных, на вскрытии находят наложения фибрина на печени и селезенке. При отсутствии гибели целесообразно повторно взять пробы крови и провести исследования в РСК парных сывороток. Нарастание титра антител является достаточным основанием для постановки диагноза на хламидиоз, т.к. могут встречаться штаммы, не вызывающие гибели животных. При заражении куриных эмбрионов и любого вида лабораторных животных обнаружение и идентификацию хламидий в препаратах из органов и тканей биологических моделей проводят микроскопическим исследованием окрашенных тем или иным способом мазков-отпечатков, а также методом флуоресцирующих антител, иммуноферментным и при помощи ПЦР.

Выделение хламидий на культуре клеток. Готовят раствор циклогексимида на изолирующей среде концентрацией 2 мкг/мл. Изолирующей средой называют среду с антибиотиками для заражения клеток исследуе-

мым материалом: среда «Игла без глутамина» — 400 мл, 3%-ный раствор глутамина — 5 мл, фетальная сыворотка теленка — 8% (от общего объема), гентамицин — 40 мкг/мл, 10%-ный раствор глюкозы — 5 мл.

В качестве ростовой среды применяют среду «Игла без глутамина» — 400 мл, 3%-ный раствор глутамина — 5 мл, фетальная сыворотка теленка — 4% (от общего объема), гентамицин — 40 мкг/мл.

В стерильные плоскодонные пробирки с покровными стеклами вносят по 2 мл клеточной суспензии, инкубируют 24 часа при 37° С.

В пенициллиновые флаконы с исследуемым материалом в транспортной среде (2 мл) добавляют 2 мл свежеприготовленной изолирующей среды (при интенсивном встряхивании).

Из пробирок с монослоем клеток осторожно удаляют ростовую среду и заменяют ее изолирующей средой с исследуемым материалом (по 1 мл в две плоскодонные пробирки). Центрифугируют 60 минут при 1000 об/мин в центрифуге с горизонтальным ротором. Инкубируют 2 часа при 37° С. Удаляют изолирующую среду, вносят по 2 мл свежей изолирующей среды с циклогексимидом. Инкубируют материал 48-72 часа при 37° С.

Удаляют среду из пробирок, не нарушая монослоя, добавляют 1 мл метанола (по стенке пробирки), фиксируют 10 минут, осторожно встряхивают пробирки для ресуспендирования белкового осадка. Промывают фосфатным буфером (рН 6,8). В каждую пробирку вносят по 1 мл краски Романовского-Гимза на фосфатном буфере (1:9), через 30-60 минут краску удаляют, обрабатывают препарат 30% метанолом на фосфатном буфере. Покровные стекла высушивают, размещают в канадском бальзаме (монослоем вниз) на предметном стекле.

Микроскопию препарата проводят в темнопольном микроскопе (х400-х600), включения хламидий дают желто-зеленую флуоресценцию. В сомнительных случаях исследуют препарат в обычном световом микроскопе с объективом х90.

Микроскопическая картина: элементарные тельца имеют розовый цвет, ретикулярные — синий. Данный метод исследований является трудоемким, но чувствительным.

Серологическая диагностика

Для ретроспективной диагностики хламидиозов животных исследуют РСК, РДСК, ИФА. Абортировавших животных исследуют на нарастание титра антител (положительный результат — увеличение титра).

ри антител в 4 раза и более). Животных, вакцинированных против хламидийного аборта, не исследуют в течение 12 месяцев.

РСК ставят в объеме 1 мл (по 0,2 мл каждого компонента) или в микроварианте по общепринятой схеме. Комплемент, разведенный 1:20, титруют с дозы 0,02 до 0,2 мл с интервалом 0,02 мл. Гемолизин используют в удвоенном титре, эритроциты в виде 2,5%-ной, а для РДСК — 3%-ной взвеси. Группоспецифический хламидийный антиген берут в рабочем титре, указанном на коробке. Сыворотки крови исследуют в разведениях 1:5 и 1:10. Предварительно испытуемые и контрольные сыворотки разводят 1:5, инактивируют при 56-60° С, в зависимости от вида животного, в течение 30 минут. Первую фазу РСК проводят в водяной бане при 37-38° С в течение 30 минут, вторую фазу — 20 минут.

Контроли главного опыта РСК: позитивная сыворотка в разведении 1:5 без антигена и с контрольным антигеном; в разведениях от 1:5 до предельного титра — со специфическим антигеном; негативная сыворотка в разведениях 1:5 и 1:10 со специфическим антигеном в разведении 1:5 с контрольным антигеном и без антигена; контроль антигенов на ангиокомплементажность: специфический и контрольный антиген в двойной дозе + комплемент + гемсистема; контроль антигенов на гемотоксичность: специфический и контрольный антиген в двойной дозе + гемсистема, комплемент не добавляют.

При постановке РДСК первую фазу проводят при 2-6° С в течение 16-18 часов, вторую фазу — 20 минут при 37-38° С.

Комплемент используют в рабочем разведении 1:25 или 1:30.

Варьирующим компонентом является гемолитическая система, ее титруют на позитивной, негативной и одной из исследуемых сывороток. Для этого при проведении второй фазы РДСК гемсистему берут в дозах от 0,1 мл до 1 мл, с интервалом 0,1 мл. Сыворотки для титрования гемсистемы разводят и добавляют остальные компоненты одновременно с исследуемыми сыворотками.

При оценке результатов РСК и РДСК за положительный результат принимают задержку гемолiza на 2-4 креста в разведении сыворотки 1:10; сомнительный — задержка на 1 крест в сыворотке, разведенной 1:10, и на 1-4 креста в сыворотке, разведенной 1:5.

Для диагностики хламидиоза свиней из-за присутствия неполных (блокирующих) антител вместо классической РСК и РДСК рекомендуется применять реакцию непрямого связывания комплемента (РНСК, РПСК). В реакцию вводят дополнительный компонент (позитивная сыворотка, содержащая полные антитела) и поэтому общий объем компонентов реакции составляет не 1 мл, а 1,2 мл.

Иммуноферментный метод применяют с использованием коммерческого диагностического набора, включающего специфический хламидиозный антиген, специфическую хламидиозную сыворотку, отрицательную сыворотку, пероксидазный антивидовой конъюгат и необходимые химические реагенты. Реакцию проводят по общепринятой схеме. Изучают парные сыворотки крови в разведениях 1:200-1:6000. Результат реакции учитывают через 30-40 минут после внесения стоп-раствора. При визуальном учете в положительном случае наблюдают окрашивание в коричневое окрашивание, как и в позитивном контроле. В отрицательных пробах цвет реакционной смеси не меняется или имеет слабую желтую окраску, как в отрицательном контроле. При спектрофотометрическом учете используют специальные фотометры с вертикальным лучом при длине волны 490 нм. Результаты выражают в единицах оптической плотности (ОП490). Положительными считаются пробы, ОП490 которых в два и более раза превосходит уровень оптической плотности отрицательного контроля. Сомнительные пробы — пробы, у которых ОП490 составляет 0,150-0,1999 оптических единиц. Уровень оптической плотности ниже 0,150 единиц свидетельствует об отрицательной реакции. Основанием, согласно наставлению по диагностике хламидиозов, для постановки предварительного диагноза считается увеличение титра антител в парных сыворотках в 2-4 раза. Сыворотки, давшие сомнительный результат, исследуют повторно. Животных, с сыворотками крови которых получены положительные и сомнительные результаты, исследуют повторно прямыми методами диагностики для постановки окончательного диагноза.

Лабораторная диагностика бешенства

Бешенство (Б) — остро протекающая болезнь теплокровных животных, характеризующаяся поражением ЦНС. Восприимчивы домашние и дикие животные всех видов, а также человек.

Болезнь регистрируется в различных регионах земного шара. Не отмечено случаев распространения болезни в Австралии, Великобритании, Японии. Заболевание почти всегда заканчивается смертью. Имеются фактически документированные случаи выздоровления от бешенства человека и собак после экспериментальной инфекции.

Вирус бешенства (ВБ) относится к семейству *Rhabdoviridae*, род *Lyssavirus*. В настоящее время установлено, что ВБ имеет 4 серотипа, обусловлено, видимо, различием в составе мембранных белков. Под микр-

анты ВБ в иммунобиологическом отношении родственны, но различаются по вирулентности. ВБ обладает ГА и ГАД свойствами. Между инфекционной и ГА активностью существует линейная зависимость. Животные, иммунизированные против бешенства, продуцируют ВНА, КСА, антиГА и литические (разрушающие клетки, зараженные вирусом в присутствии комплемента) АТ.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений (они имеют меньшее значение) и, главным образом, результатов лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика заключается в исследовании головного мозга животных с целью выявления вирусного АГ в ИФ, РДП, обнаружении телец Бабеша - Негри и биопробе на белых мышах.

В Российской Федерации в настоящее время организовано производство наборов для диагностики Б в ИФ и РДП в ВНИТИБП и КазНИВИ.

Выделение вируса. В лабораторию для исследования направляют свежие трупы мелких животных, от крупных животных - голову или головной мозг. В некоторых случаях допускается консервирование головного мозга в 50%-ном глицерине. Труп или голова должны быть тщательно упакованы в полиэтиленовый мешок, мозг - в банку с притертой стеклянной или резиновой пробкой, залитой парафином. Материал упаковывается во влагонепроницаемую тару. Для вирусологических исследований пригоден только не консервированный мозг. Необходимо помнить, что вскрытие трупа, извлечение мозга и другие операции с патологическим материалом следует проводить в условиях стерильности и строгого соблюдения мер личной профилактики: прочно фиксируют голову животного, защищают руки 2-мя парами перчаток (хирургические и анатомические), для защиты глаз надевают очки, а на нос и рот-б-слойную марлевую повязку.

Лабораторные исследования материала на бешенство проводят вне всякой очереди; результаты немедленно сообщают врачу хозяйства и главному врачу района (города).

Индикация и идентификация вируса. Порядок проведения исследований: из каждого отдела головного мозга левой и правой сторон (аммонова рога, мозжечка, коры полушарий и продолговатого) готовят по 4 мазка-отпечатки для ИФ и обнаружения телец Бабеша - Негри; с мозговой тканью ставят РДП; при отрицательных результатах ставят биопробу.

Обнаружение специфических телец-включений. Мазки-отпечатки окрашивают по Селлерсу, Муромцеву или другими методами. После окрашивания препараты просматривают в световом микроскопе с иммерсионной системой. Положительным результатом считают наличие специ-

фических телец Бабеша - Негри (при окраске по Селлерсу - четкие округленные овальные или продолговатые гранулярные образования розово-красного цвета в протоплазме, при окраске по Муромцеву - светлые фиолетовые с темно-синими включениями тельца Бабеша - Негри, если они расположены вне нервных клеток.

Наиболее характерная особенность телец Бабеша - Негри - их внутренняя структура, позволяющая абсолютно точно дифференцировать их. Внутри видны маленькие зернышки - базофильные зернистости тельца голубого, даже черного цвета величиной 0,2-0,5 мкм.

Диагностическая ценность обнаружения телец-включений для доказательства заражения ВБ общепризнана. Однако и у здоровых животных, в особенности у кошек и белых мышей, имеются образования, присутствие которых может вызвать диагностические затруднения. В отдельных случаях в мозге кошки можно с уверенностью дифференцировать подобные включения от телец Бабеша - Негри, и здесь рекомендуется пользоваться методами идентификации, в особенности ИФ. Равным образом и у собак, погибших в результате отравления змеиным ядом или поражении электрическим током, можно найти тельца-включения, напоминающие тельца Бабеша - Негри. Тельца Бабеша - Негри выявляют лишь в 63-83% случаев бешенства, поэтому отсутствие их не является отрицательным ответом, и материал исследуется в других тестах (ИФ, РДП, биопроба).

ИФ. Один из основных тестов при диагностике Б. При высококачественном выполнении получают в 99-100% совпадения с методом биопробы. Обычно в диагностической практике используют прямой метод ИФ, который проводят с применением антирабического флуоресцирующего Ig. Фиксацию препаратов в охлажденном (8-10°C) ацетоне проводят не менее 4-х ч. В качестве отрицательного контроля используют мазки-отпечатки головного мозга здоровых белых мышей. Учитывают результаты визуально в люминесцентном микроскопе на основе оценки интенсивности свечения комплекса АГ-АТ. АГ ВБ выявляется в виде ярких желто-зеленых или зеленых гранул различной формы и величины в клетках (чаще вне клеток). Диагноз считают установленным, если в нескольких полях зрения обнаруживают достаточное количество (не менее 10) типичных гранул с ярким зеленым свечением или множество меньших точек. В контроле подобного свечения не должно быть.

Для доказательства специфичности свечения комплекса АГ-АТ используют метод подавления ИФ, который заключается в способности рабического АГ, связанного с нефлуоресцирующими АТ, вторично вступать в соединение с флуоресцирующими специфическими АТ. Для этого на фиксированные препараты, приготовленные из исследуемого

повного мозга, наносят 5%-ный антирабический нефлюоресцирующий Ig, выдерживают 30 мин при 37°C во влажной камере, промывают физраствором, а затем окрашивают флюоресцирующим антирабическим Ig общепринятым прямым методом. В обработанных таким образом препаратах флюоресценции не должно быть.

Метод ИФ дает возможность обнаруживать ВБ в клетках роговицы глаз и предварительно поставить диагноз прижизненно: во время болезни животных, а также за 1-2 дня и более до клинического её проявления. Метод может быть использован для исследования подозреваемых в заболевании Б животных, а также клинически здоровых собак и кошек, укусавших людей и животных. Для этого готовят отпечатки с роговицы, соблюдая все правила личной безопасности, раскрывают глазную щель животного большим и указательным пальцами и на слегка выпяченное глазное яблоко надавливают поверхностью предметного стекла, отступив 0,5 см от конца. Нужно следить, чтобы животное не моргало третьим веком, так как со стекла удаляются эпителиальные клетки и получается некачественный мазок. С каждого глаза делают не менее 2 препаратов, содержащих по 2 отпечатка. Для контроля аналогичным образом готовят отпечатки роговицы от здоровых животных. Их можно приготовить в хозяйстве. Отпечатки высушивают на воздухе, фиксируют в ацетоне в течение 4 ч при 4°C, упаковывают и отправляют в лабораторию. Окрашивают препараты, как при ИФ, по общепринятой методике.

В препаратах, полученных от больных животных или находящихся в конце инкубационного периода болезни, в цитоплазме многих эпителиальных клеток наблюдаются разной формы ярко светящиеся гранулы разного размера - от пылевидных точек до 2 мкм и более. С целью получения достоверных результатов в каждом препарате просматривают по 50-100 клеток, а всего от животного - не менее 200-400 клеток. Результаты микроскопии считают положительными, если в отпечатках роговицы животного обнаруживают 11% и более клеток с характерными очажками свечения. Необходимо иметь в виду, что в препаратах от здоровых животных (контроль), вследствие аутофлюоресценции, могут встречаться единичные клетки с подобными по форме и свечению очажками.

Важно отметить, что ИФ дает возможность ускорить ответ при окончательной постановке диагноза путем биопробы, поскольку диагноз при Б может быть установлен только на 4-8-й день после заражения мышей исследуемым материалом, а инкубационный период заболевания мышей может достигать и 20 дн. ИФ может выявлять ВБ в тканях подчелюстной слюнной железы. Из подчелюстных слюнных желез готовят препараты-мазки, беря материал не менее чем из 6 разных участков железы, так как

распределение в ней вируса неравномерно. Часто, чтобы получить отпечаток, приходится делать сильный нажим, поскольку из-за обилия мышц на стекле остается мало материала.

Показана возможность идентификации ВВ в коже методом ИФ. С этой целью берут пробы кожи головы, а также фолликулы сенсорных и тактильных волос морды или латеральных сенсорных сосочков (на щеках у баки). Пробы хранят при -20 или -70°C . Из них делают криосрезы, которые обрабатывают флюоресцирующим глобулином. Результаты ИФ анализа, полученные при идентификации ВВ в коже, в высокой степени коррелируют с данными, полученными при исследовании мозга того же животного. Показана близкая корреляция между обнаружением АГ вируса в пробах мозга и тканях губы методом ИФ.

РДП. Применяют для обнаружения АГ ВВ в неконсервированном головном мозге животных, павших от уличного бешенства, или мышц, используемых в биопробе. РДП ставят микрометодом на предметных стеклах, используя 1-1,5%-ный агаровый гель по общепринятой методике. Наибольший процент положительных результатов выявляют при нанесении следующего трафарета: А - аммонов рог (правая сторона); В - кора головного мозга (правая сторона); С - мозжечок (правая сторона); Д - продолговатый мозг (правая сторона); + (плюс) - положительный контроль; - (минус) - отрицательный контроль; 1, 2, 3, 4 - лунки с разбавлением специфического иммуноглобулина 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 соответственно.

Из каждого отдела головного мозга с помощью пинцета готовят гомогенную пастообразную массу, которую и помещают в соответствующие лунки. От мышей исследуют весь головной мозг. Из отделов головного мозга левой стороны готовят АГ аналогичным образом (на каждую экспертизу в общей сложности требуется 4 предметных стекла с агаровым гелем). Реакцию учитывают через 6, 24, 48 ч. При наличии 1 или 2-х отрицательных преципитации между лунками, содержащими АГ и иммуноглобулин, реакцию считают положительной.

РДП проста по выполнению и специфична, но процент выявления вирусного АГ в исследуемом материале составляет 45-70. При исследовании головного мозга мышей, полученного при положительной биопробе, РДП выявляет до 100% случаев. Отсутствие в исследуемом материале теллец Бабеша - Негри, специфической флюоресценции и отрицательный РДП не дают основания исключить наличие вируса. В этом случае окончательный диагноз ставят по результатам биопробы на белых мышьях и последующей идентификацией вируса.

Биопроба. Принято считать, что биопроба является более эффективным методом, чем обнаружение теллец Бабеша - Негри, ИФ и др. Однако

она в отдельных случаях оказывалась отрицательной, несмотря на подтверждение диагноза Б путем обнаружения телец-включения и ИФ. Процент отрицательных результатов по биопробе колебался от 1,3 до 12.

Сведения о различной эффективности биопробы могут быть объяснены рядом факторов: выбора экспериментального животного, количества их в опыте, способа заражения, способа и срока хранения материала до поступления в лабораторию. Может играть роль и явление интерференции инфекционных частиц неактивными частицами, если для инокуляции используют недостаточно разведенный материал.

В мозге и слюнных железах лисиц и сунсов, павших от бешенства, обнаружено вещество, ингибирующее инфекционность вируса, что не позволяет провести диагностику болезни у этих животных методом внутримозгового заражения мышей. Наличие ингибирующего вещества в исследуемом материале не препятствует выявлению вирусного АГ методом ИФ; для сунсов и лисиц это самый чувствительный метод диагностики.

Из животных всех видов (кролики, морские свинки, взрослые белые мыши и хомячки), использованных для биопробы, многие отдают предпочтение мышам-сосунам, поскольку они более чувствительны к разным штаммам ВБ и менее опасны в работе. Сирийские хомячки по чувствительности не уступают мышам, но они менее доступны.

РСК. Выявление специфического АГ в РСК при диагностике бешенства применяется реже, чем другие методы. Из присланного для исследования мозга готовят АГ. Для этого мозговую ткань (особенно богаты АГ, связывающим комплемент, кусочки таламуса и ствольного отдела мозга) растирают в вероналовом буфере в соотношении 1:10 и оставляют при комнатной температуре на 1 ч, после чего суспензию инактивируют при 56°C в течение 5 ч. Такая обработка убивает вирус и снимает антикомплемментарность мозговой ткани, не повреждая специфический АГ. Суспензию центрифугируют 15 мин при 3500 мин⁻¹ из надосадочной жидкости, которая представляет собой материал для исследования на наличие АГ, готовят 2-кратно возрастающие разведения от 1:2 до 1:64 и используют для исследования в РСК.

ИФА. В ИФА специфическое окрашивание АГ в клетках мозга павших от бешенства животных выявляют как в свежезятых, хранившихся в глицерине, а также в пробах, хранившихся без глицерина при 20°C 8-18 ч. Данный тест пригоден для рутинной диагностики бешенства у животных, для выявления АГ ВБ в тканевых парафиновых срезах при фиксации препаратов 10%-ным р-ром формалина с рН 5,3 и последующей обработки препаратов, заключенных в парафин, пепсином.

В отличие от РН на мышах и в культуре клеток ИФА позволяет выявить АТ у животных в течение нескольких часов, ИФА - наиболее перспективный лабораторный метод обнаружения АТ и индикации самого вируса. Экспресс-методом диагностики бешенства является техника захвата и метод ИФ для выявления АГ ВВ. Доказано, что метод выявления АГ ВВ в парафинизированных срезах пероксидазо-антипероксидазным методом значительно превосходит метод ИФА. В 1987 г. создан набор для быстрой энзимиммунодиагностики бешенства (RREID), применяемый для эпидемиологических и лабораторных исследований.

РН. Используется редко. Рекомендуются модификация с применением ВВ и постоянной дозы γ -глобулина. ИН 2 указывает на АГ специфичности выделенного вируса.

Вариантная идентификация с помощью монАТ. С помощью монАТ к гликопротеинам ВВ селектированы АГ варианты, среди которых выделены фенотипически термолabile (авирулентные) варианты. При использовании 2-х групп монАТ показано, что штаммы дикования отличаются от шт. Fixe (Пастера), CVS, Flury HEP, ERA и "утиных" штаммов по АГ детерминантам. Изучение с помощью монАТ 7-ми штаммов, выделенных от больных Б людей, позволило выявить определенные отличия их от вакцинного штамма в отношении АГ детерминант.

Общепризнано, что АТ отличия между дикими штаммами удается обнаружить, используя монАТ против нуклеокапсидного АТ N, которые реагируют с цитоплазматическими включениями зараженных вирусом клеток; против гликопротеина (G АГ), которые реагируют с мембранами инфицированных клеток, лизируют эти клетки в присутствии комплексов и нейтрализуют вирус. В связи с возможной АГ вариабельностью конкретного гликопротеина ВВ из различных географических зон и качеством протективного АГ использовали рибонуклеопротеин, характеризующийся консервативностью АГ структуры. Таким образом, не только G белок, но и РНП ВВ обладают протективной активностью.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Эти методы для бешенства нетипичны, поскольку используются только с целью проверки поствакцинального иммунитета. Для обнаружения и титрования поствакцинальных АТ используют РН, которую ставят общепринятым методом. В качестве АГ используют фиксированный ВВ. РН на клетках ВВ была более чувствительной, чем непрямая ИФ при выявлении АТ в слюнных ротовых жидкостях вакцинированных лис. Кроме того, предложены РТГА и ПИФА.

РТГА. Пока еще не нашла широкого применения в диагностической практике из-за наличия в сыворотках крови неспецифических иммуноглобулинов, к которым ВВ высокочувствителен, а главное, ГА АГ, не подвержен

шлись достаточной очистке, обладали низкой чувствительностью. Для приготовления ГА АГ ВБ предложено использовать шт. Москва, выращенный в культуре клеток ВНК-21, после его обработки сапонином с последующей очисткой и концентрированием. ГА отделяют от других компонентов вириона ультрацентрифугированием. Полученный препарат имел степень очистки 99,92%, обладал высокой ГА активностью (1:128), хорошо сохраняющейся в течение 1 мес при рН 5-9.

Перед постановкой РТГА следует проводить умеренную 2-кратную трипсинизацию гусиных эритроцитов для их сенсibilизации. При использовании 0,25%-ной взвеси трипси-низированных эритроцитов (лучше 10^7 клеток в 1 мл) чувствительность РТГА повышается в 4 раза. Для разбавления АГ и сывороток применяют боратно-солевой р-р (рН 9) с добавлением 0,4% бычьего сывороточного альбумина. Взвесь эритроцитов готовят в солевом р-ре с кислым рН, чтобы после соединения со смесью вируса и сывороток, рН которой 9, окончательный рН установился бы в пределах 6,2. После внесения в лунки суспензии эритроцитов панель встряхивают, заклеивают прозрачной пленкой и ставят на лед. Результаты РТГА учитывают через 40-50 мин, а с эритроцитами 2-дн цыплят или маки-резус - через 1-1,5 ч.

Разработан радиоиммунологический анализ, основанный на способности АТ связываться с меченым 125 I-АГ ВБ. Меченый IgG, выделенный из антирабической гипериммунной сыворотки, можно применять для обнаружения АГ ВБ твердофазным РИА. Лучшие результаты получены при использовании фосфатно-солевого р-ра (рН 6,0) с ионной силой 0,01 М и меченого IgG с активностью 200-250 тыс. имп./мин.

Твердофазный конкурентный РИА применим для выявления антирабических АТ в сыворотке и гибридомных супернатантах.

Дифференциальная диагностика. Необходимо исключить болезнь Ауески, при которой больные животные неагрессивны, не бывает извращения аппетита. У собак исключают нервную форму чумы. Подозрение на бешенство может возникнуть при инфекционном энцефаломелите лошадей. Комплекс лабораторных исследований позволяет поставить точный диагноз на бешенство. Предложен новый метод дифференциации различных штаммов ВБ, основанный на рестриктазном расщеплении продуктов амплификации в ПЦР сегмента гена N.

Лабораторная диагностика инфекционного ринотрахеита
Крупного рогатого скота

Инфекционный ринотрахеит (ИРТ, пузырьковая сыпь, инфекционный вульвовагинит, инфекционный некротический ринотрахеит, инфекционный ринит, «красный нос», контагиозная бронхопневмония, инфекционный катар верхних дыхательных путей) — остропотекающая контагиозная болезнь КРС, характеризующаяся преимущественно катаральными некротическими поражениями дыхательного тракта, лихорадкой, обильным угнетением и конъюнктивитом, а также развитием пустулезного вульвовагинита при попадании вируса в половые органы животного и абортами. Болезнь распространена повсеместно.

Вирус инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*, роду *Varicellavirus*.

В антигенном отношении вирус ИРТ КРС не однороден, существуют варианты. Между вирусами ИРТ КРС и БА существует АГ родство. В организме животных вирус вызывает образование ВНА, КСА. Вирус обладает ГА свойствами в отношении мышинных эритроцитов.

Лабораторная диагностика включает: 1) выделение вируса из патологического материала в культуре клеток и его идентификации в РИФ или РИФ; 2) обнаружение антигена вируса ИРТ в патологическом материале РИФ; 3) выявление антител в сыворотке крови больных и переболевших животных (ретроспективная диагностика) в РИ или РИГА. Для лабораторной диагностики ИРТ используют набор диагностикумов инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и набор эритроцитарного диагностикума для серодиагностики ИРТ крупного рогатого скота в РИГА.

Диагностику инфекционного ринотрахеита проводят параллельно с исследованием материала на парагриппозную (ПГ-3), аденовирусную (1 и 11), респираторно-синцитиальную инфекции и вирусную диарею. Схема проведения лабораторной диагностики ИРТ аналогична применяемой при диагностике аденовирусной инфекции.

Предварительный диагноз на инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота ставят на основании положительных результатов обнаружения антигена в патологическом материале РИФ с учетом эпизоотологических и клинических данных, а также патологических изменений.

Окончательный диагноз ставят на основании совпадения результатов РИФ с выделением и идентификацией вируса; совпадения результатов РИФ с обнаружением антител в 30% и более вторых проб сыворотки в титрах не ниже 1:2 в РИ и 1:16 в РИГА и обнаружением 4-кратного и более увеличения титра антител в парных пробах сывороток. Предварительный диагноз ставят в ветеринарных лабораториях в течение 2-3 дней, окончательный — в течение 15-30 дней.

Выделение вируса. *Взятие и подготовка материала.* В лабораторию направляют патологический материал, взятый в течение первых 2-3 дней болезни при выраженной клинической картине болезни или с диагностической целью непосредственно при убое от животных с острой стадией заболевания.

От больных животных берут 15-20 проб: смывы со слизистой оболочки носовой полости, глаз, влагалища, препуция, пробы спермы. Для смывов используют стерильные ватно-марлевые тампоны, смывы с препуциальной полости и сперму берут в соответствии с Методическими указаниями по отбору проб, транспортированию и подготовке к вирусологическому исследованию спермы и смыва с препуциальной полости быков; пробы крови, не менее 5 мл, получают в первые 3 дня болезни и через 3 нед от тех же животных в стерильные пробирки. Тампоны с материалом помещают в стерильные пеницил линовые флаконы или пробирки с 2-3 мл стерильного физиологического раствора или раствора Хенкса, содержащего от 500 до 1000 ЕД/мл антибиотиков (канамицин, мономицин, неомицин, пенициллин, стрептомицин и др.).

После свертывания крови стерильно сливают 2-3 мл сыворотки и доставляют последнюю в лабораторию.

От животных, убитых с диагностической целью, берут с соблюдением правил асептики кусочки легких с бронхом (на границе пораженного и здорового участков), селезенки, средостенные, бронхиальные и брыжесчные лимфатические узлы, миндалины, пораженные участки слизистых оболочек носовой и ротовой полостей, трахеи, желудочно-кишечного тракта, а также пробу крови, от абортированных плодов — кусочки паренхиматозных органов. Кусочки материала массой до 20 г помещают в стерильную посуду.

Консервирование патологического материала, доставка в лабораторию и его подготовка к исследованию такие же, как при диагностике аденовирусной инфекции.

Пробы спермы до исследования допускается хранить при минус 20 °С не более 5 сут. Сперму исследуют в течение 24 ч после размораживания. Ее разводят 1:10 питательной средой для культуры клеток с добавлением соответствующих антибиотиков (по 500 ЕД на 1 мл), замораживают 2-3 раза при минус 30 °С, оттаивают при 37 °С, центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость используют для заражения культуры клеток. Заражение культур клеток. Методика его аналогична таковой при диагностике аденовирусной инфекции. Изолят считается выделенным в случае, если он вызывает стабильное однотипное цитопатогенное действие не менее чем в трех после-

довательных пассажах. В этом случае возможна его последующая идентификация в РН. Цитопатогенное действие вируса ИРТ в культуре клеток характеризуется образованием окон в монослое, округлением клеток, скоплением их в виде «гроздьев» с последующим отслоением их от поверхности стекла.

Заражение животных. Делают очень редко с целью идентификации вируса инфекционного ринотрахеита. Телятам 6-8-месячного возраста патологический материал вводят интраназально в вагину, под кожу и наносят на конъюнктиву. Если в исследуемом материале есть вирус, у зараженных животных развивается ринотрахеит с конъюнктивитом. От больных телят вирус выделяют главным образом из пораженной трахеи и гортани. У инфицированных животных развиваются симптомы, сходные с наблюдаемыми при естественном течении болезни. Первые клинические признаки болезни появляются через 20 ч после инфицирования и регистрируются 7-10 дней. Зараженные телята, как правило, выздоравливают и остаются вирусоносителями.

Выделить вирус из носовой полости, влагалища и с конъюнктивы удается с 5-го по 10-й день, а нейтрализующие антитела — с 5-8-го дня после заражения. Более высокий титр антител наблюдается после 35 дней, затем начинается медленное снижение.

Установлено, что максимальное количество вируса выделяется во время подъема температуры тела на 4-7-й день болезни и продолжается до 10-14 дней.

Индикация и идентификация вируса. Обнаружение специфических телец-включений. В ядрах клеток эпителия пораженных слизистых оболочек носовой полости, вульвы, вагины и конъюнктивы находят специфические тельца-включения. Через 18-20 ч после заражения их можно обнаружить и в клетках зараженной культуры ткани, окрашенной метаксиллин-эозином. Биопроба.

Серологическая идентификация

РИФ. Техника постановки ее такая же, как и при диагностике аденовирусной инфекции крупного рогатого скота. Обращают внимание на свечение антигена в цитоплазме и перинуклеарной зоне неповрежденных клеток. Ярко-зеленая флуоресценция в виде гранул или диффузного свечения цитоплазмы не менее чем в 10% клеток позволяет оценить препарат как положительный. Предварительный диагноз ставят при наличии не менее 30% положительных препаратов от общего количества исследованных проб. В мазках из влагалища и конъюнктивы специфическую флуоресценцию отмечали через 24 ч, из препуция - через 48, из носа и трахеи - через 72 ч после заражения. Присутствие специфического антигена

на удается подтвердить заражением культуры клеток почки телят, в которой обнаруживается специфическая перинуклеарная и диффузная цитоплазматическая флуоресценция, свойственная ринотрахеитной инфекции. Использование культуры клеток почки кролика позволяет освободиться от неспецифического свечения.

Совпадаемость результатов РИФ и патогистологических изменений составляет 87%, а иммунофлуоресценции и вирусологических исследований - 44%. При параллельном исследовании сывороток в РИ и РИГА результаты совпадали в 94% случаев.

В полевых условиях РИФ оказалась положительной в 18,5%, а метод вирусовыделения - в 15,9% случаев.

Таким образом, РИФ можно использовать для экспресс-диагноза диагностики ИРТ с последующим подтверждением диагноза вирусологическими методами.

РН. При наличии ЦПД в культурах клеток, зараженных изолятом, и положительной иммунофлуоресценции проводят окончательное титрование вируса в РН. Перед ее постановкой специфическую и отрицательную сыворотки разводят в соотношении 1:10 раствором Хенкса или питательной средой для культуры клеток, содержащих ангионотики, и прогревают в водяной бане 30 мин при 56 °С. РН ставят общепринятым методом в первичной культуре ПЭК или перевиваемой линии клеток МДВК.

Результаты РН учитывают по ЦПД вируса, для чего определяют титр типизируемого изолята в присутствии специфической и отрицательной (контрольной) сывороток. Титр рассчитывают по методу Рида и Менча и выражают в Ig ТЦД₅₀/мл.

Затем вычисляют индекс нейтрализации (И) по формуле $I = T_1 \cdot T_2$,

где T_1 — титр изолята в присутствии контрольной сыворотки; T_2 — титр изолята в присутствии специфической сыворотки.

Видовую принадлежность изолята устанавливают при разности в титрах вируса не менее 2 Ig . При индексе нейтрализации от 1 Ig до 2 Ig реакцию считают сомнительной, в этом случае ее повторяют. Индекс нейтрализации менее 1 Ig считают отрицательным. При положительных результатах РН изолят считают полностью идентифицированным.

Приготовление гипериммунной сыворотки для РН. Гипериммунную вируснейтрализующую сыворотку готовят по следующей схеме: подкожно вводят кроликам 1 мл культурального вируса с адьювантом Фрейнда, далее следует трехкратное внутривенное введение вируса в объеме 1 мл с интервалом через 7 дней. Через 10 дней после последней инокуляции вируса кроликов обескровливают, сыворотку замораживают и хранят при минус 30 °С.

РТГА. Ставят ее микрометодом при 4 °С с 0,5 — 1%-ной взвесью эритроцитов белых мышей, разбавитель — трис-буферный раствор с 0,7% бычьего сывороточного альбумина. В качестве антигена используют культуральную вируссодержащую жидкость, которую концентрируют ПЭГ-6000 или ультрацентрифугированием.

После обнаружения гемагглютинирующего агента, определения его гемагглютинирующего титра готовят 4 ГАЕ и проводят его идентификацию в РТГА с эталонной положительной сывороткой.

Иммуноферментная идентификация вируса. Иммунопероксидазный метод можно использовать для исследования прижизненно взятых носовых фарингиальных мазков-отпечатков в клетках, полученных из легочных смывов.

Кроме того, рекомендован непрямой антикомплемментарный иммунопероксидазный метод (НАИП) для лабораторной идентификации вируса ИРТ. Методика заключается в следующем: на покровных стеклах, в пробирках готовят чувствительную культуру клеток к вирусу ИРТ (ПДЧ, ПБ и др.) по общепринятой методике. Монослой заражают исследуемым вирусом. Через 48 ч стекла с инфицированными клетками извлекают, отмывают в фосфатно-буферном растворе с рН 7,2-7,4 и фиксируют в охлажденном ацетоне 5-10 мин.

На фиксированный монослой клеток наносят 1-2 капли смеси из специфической иммунной сыворотки и комплемента морской свинки в разведении 1:10. Перед работой противовирусные сыворотки сорбируют с терологичными исследуемыми вирусами, т. е. получают моносыворотки. При обработке контрольных препаратов на монослой наносят смесь комплемента и нормальной сыворотки.

Препараты инкубируют во влажной камере при 37 °С в течение 60 мин, затем промывают проточной водой 5-10 мин, слегка подсушивают и обрабатывают меченой пероксидазой антикомплемментарной сывороткой (1-2 капли), предварительно разведенной 1:20 фосфатным буфером, и снова помещают препарат на 40-60 мин во влажную камеру при 37 °С. Затем их промывают, подсушивают и для выявления образовавшегося комплекса (антигенан-титело-пероксидаза) на препарат наносят на 40-60 мин бензидиновый реагент (50 мг бензидина в 100 мл трис-НС1-буфера с рН 6,8 с добавлением после фильтрации 6-7 капель 3%-ной перекиси водорода на каждые 5 мл рабочего раствора). Препарат выдерживают во влажной камере, промывают в дистиллированной воде, высушивают, монтируют на предметном стекле и изучают в световом микроскопе под объективом с иммерсией.

При световой микроскопии непрямой антикомплементарный иммунопероксидазный метод обеспечивает четкое выявление вирусного антигена в цитоплазме инфицированных клеток в виде окрашенных в коричневый цвет образований, которые видны при увеличении в 140 раз.

Специфичность показателей, полученных этим методом, подтверждается постановкой специальных иммунологических контролей. При постановке перекрестной иммунопероксидазной реакции с гетерологичными антителами эта реакция имеет выраженный видоспецифический характер: антиген реагирует только с гомологичной сывороткой. Эндogenous пероксидаза в культуре клеток ПЭК и LF не выявляется.

Непрямой антикомплементарный иммунопероксидазный метод является перспективным при диагностике острых респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота.

При использовании иммунопероксидазного метода для индикации вируса ИРТ в культуре клеток ПЭК антиген выявляется через 18, 22 ч после заражения. Три прямых серологических метода быстрого обнаружения вирусных антигенов (РИФ, иммунопероксидазный и ELISA) одинаково применимы для обнаружения вируса во время лихорадки, но не на поздних стадиях болезни.

Вирусный антиген обнаруживают в носовых смывах методом ELISA с 3-го по 10-й день после заражения. В конъюнктивальных смывах его выявляют на 5-е сутки.

Идентификация вируса ИРТ посредством рестрикционного анализа вирусной ДНК. Описаны метод клонирования фрагментов генома вируса ИРТ, выделение и характеристика рекомбинантного ДНК-зонда, который позволяет определять вирус в клинических пробах. С помощью метода дот-блот-гибридизации выявлена ДНК вируса ИРТ в пробах спермы, полученной от серопозитивных животных, когда выделение вируса в культуре клеток давало отрицательный результат. Хороший результат также получен при использовании инфицированных культур клеток.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Антитела к вирусу ИРТ можно обнаружить в сыворотках крови больных и переболевших животных в РН, РНГА и др. Для постановки ретроспективного диагноза используют парные пробы сывороток, взятые с интервалом в 3 нед. Результат серодиагностики учитывают по возрастанию титра антител в парных пробах сыворотки, а также числа серопозитивных животных через указанный интервал. Перед исследованием сыворотки прогревают в водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин.

РН. Ставят методом разведения испытуемых сывороток с постоянной дозой вируса в культуре клеток ПЭК или ТБ. Вирус предварительно

титруют в культуре клеток. Для этого сухой вирус ИРТ из набора диагностического стерильно разводят в объеме, указанном на этикетке, и готовят из него десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-6} на питательной среде (конечный титр сухого вируса указан на этикетке).

Разведение готовят в общем объеме 5 мл, затем заражают по 4 пробирки с культурой клеток, предварительно отмытой от ростовой среды — каждым разведением вируса в объеме 1 мл. Зараженные и контрольные культуры клеток (4-6) инкубируют при 37°C , ежедневно учитывают ЦПД вируса заключительно — на 5-7-е сутки.

Титром вируса считают обратную величину его наибольшего разведения, вызывающего ЦПД в 50% культур клеток, который высчитывают по методу Рида и Менча или Кербера и выражают в ПЦД₅₀/мл. Титры 1:32, 1:64 обнаруживаются редко. В неблагополучных по данной болезни стадах ВНА выявляются у 12% клинически здорового скота. Ретроспективный диагноз на ИРТ ставят при 4-кратном и более приросте АТ в пробах сывороток реконвалесцентов. В настоящее время широко используют микрометод РН.

РНГА. Биологическая промышленность нашей страны выпускает эритроцитарный диагностический набор. РНГА ставят согласно методическим указаниям в микропанелях с U-образными лунками наборов микротитрования Такачи или Титертек по общепринятой методике. Результаты РНГА с используемыми сыворотками оценивают по титрам; положительные — 1:16 и выше, сомнительные — 1:8, отрицательные — 1:4, 1:2 и нулевые. Увеличение титров АТ в парных сыворотках в 2-4 раза свидетельствует о наличии инфекции. Применяя РНГА, можно обнаружить АТ в более ранний период инфекции, чем с помощью РН. Установлено соответствие результатов РНГА и РН в 95% случаев. С помощью данной реакции легче и быстрее, чем РН проводить типирование АТ к вирусу ИРТ. Титры АТ были в 7-10 раз выше выявляемых в РН.

РДП. Не нашла широкого применения в диагностической практике. Исследователи рекомендуют её использовать для серодиагностики ИРТ. По наличию ПА можно уловить недавно прошедшую инфекцию, а во время как ВНА длительно циркулируют в организме, и заболевание можно уловить по парным сывороткам. При выявлении ПА крови нужно брать на 8-й и последующие дни болезни.

РТГА. Может использоваться для выявления и количественной оценки АТ к вирусу ИРТ. Титр анти-ГА коррелирует с титром ВНА. Положительный результат РТГА уже в 1-ом разведении сыворотки (1:4) указывает на наличие АТ к вирусу ИРТ в данной пробе сыворотки.

4-кратный и более прирост титров анти-ГА в парных пробах сыворотки является показателем активной инфекции.

ELISA. Широко применяют в Нидерландах, США, Великобритании, Швеции, странах бывшего СССР. Он оказался пригодным для обнаружения АТ к вирусу ИРТ в молоке. Для этого достаточно получения проб смешанного молока от 5-10 коров. АТ определяют после предварительного концентрирования в них Ig. Совпадаемость данных серологических реакций в пробах сыворотки крови и молока составляла 92,8%. С помощью данного метода можно оперативно определять иммунологический статус поголовья лактирующих коров целого региона, а также проводить обследование экспортируемых и импортируемых животных. В ФРГ разработан и применяется метод ТРАХИТЕСТ для ИФА проб сборного молока поров с целью диагностики скрытого вирусоносительства.

Предложен непрямой метод IgM-ELISA для определения недавней инфекции ИРТ. Ранние АТ IgM выделены на 6-й дн после заражения, к 9-му дн происходил рост титра АТ Ig, а к 13-му дн - ВНА. У телят, привитых инактивированной вакциной, раннего иммунного ответа не происходило - АТ IgM не выявлялись, а IgM и ВНА появлялись позже, чем после заражения. Однако при этом следует иметь в виду, что наличие в сыворотке КРС ревматоидного фактора может привести к ложноположительным результатам диагностики в IgM-ELISA. В этом случае предварительная обработка проб сыворотки антибычьими IgM позволяет избежать ложноположительных результатов. Тест IgM-ELISA имеет большую ценность в диагностике ИРТ, особенно у молодых животных. В группе позитивных сывороточных проб корреляция между ELISA и РИГА составляла 98,3%, а ELISA с ИФ - 95,7%.

ELISA с использованием монАТ. Основан на конкуренции между АТ сыворотки крови КРС и нейтрализующими мышинными монАТ. Для его проведения лунки микротитрационных панелей обрабатывают очищенным вирусом ИРТ, и после высушивания их можно использовать немедленно или хранить при - 20°C. В обработанные вирусом лунки панелей последовательно вносят неразведенную испытуемую сыворотку, специфические к вирусу ИРТ монАТ, конъюгированные пероксидазой, субстрат пероксидазы. Результаты реакции учитывают в спектрофотометре при А405. В случае положительной реакции связывание монАТ ингибируется АТ сыворотки крови. Метод оказался намного чувствительнее и специфичнее РН.

Лабораторная диагностика ротавирусной инфекции крупного рогатого скота

Ротавирусная инфекция (РВИ) КРС (диарея неонатальных телят) — остропротекающая контагиозная болезнь новорожденных телят, характеризующаяся поражением ЖКТ. Болезнь широко распространена по всем географическим регионам земного шара. Практически ее регистрировали везде, где проводили исследования. Доказана широкая диссиминация ротавирусов (РВ) телят среди животных разных видов и наличие АТ у грызунов (морских свинок, крыс, хомяков, мышей).

На основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных ставят предварительный диагноз, окончательный устанавливают лишь лабораторными методами. Последние базируются на обнаружении вируса или вирусного АГ в фекалии больных телят, содержимом кишечника, клетках слизистой оболочки тонкого кишечника паннон и вынужденно убитых животных, а также на выявлении АТ к РВ в сыворотках крови больных и переболевших телят и в сыворотках крови и молозиве коров-матерей.

Экспресс-методы диагностики. Разработана тест-система ИФА на основе РВ свиней при выявлении специфического АГ РВ КРС, которая обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Ее целесообразно применять в лабораторных условиях для экспресс-диагностики. Поскольку полипептид VP5 содержит перекрестный групповой АГ, амплифицированный в консервативном домене, который является общим для всех РВ группы А. Показана возможность индикации рота- и коронавирусов методом флуоресцентных зондов и АТ к ним. Он основан на регистрации ранних этапов взаимодействия вирусов с рецепторами клеток.

Выделение вируса. В лабораторию для исследования направляют не менее 10 проб жидких фекалий, тонкий кишечник с содержимым (не позднее 2-3 ч с момента гибели или вынужденного убоя телят), 10-15 проб парных сывороток больных и переболевших животных, 6-10 проб сыворотки крови коров и 6-10 проб молозива. С наибольшим количеством вирус удастся обнаружить в пробах фекалий, взятых в первые дни болезни, поэтому для исследования пригодны фекалии, взятые от 2-4-летних телят с клиническими признаками диареи на 1-3-й день болезни. Сразу же после доставки в лабораторию пробы обрабатывают или хранят при 4°C не более суток, при -20-50°C до 1 мес. Сыворотки крови хранят при 4-10°C не более 1 нед, при -20°C до 1 мес; молозиво - при 4°C не более 1 сут, при -20°C - до 1 мес. Для вирусологических или электронных микроскопических исследований готовят 10%-ную суспензию фекалий в

р-ре Хенкса. Суспензию гомогенизируют и центрифугируют 1 ч при 3 тыс. об/мин, надосадочную жидкость переносят в стерильный флакон, добавляют пенициллин и стрептомицин (по 1000 ЕД/мл), выдерживают 10-12 ч (ночь) при 4°C и исследуют.

Выделение РВ в культуре клеток. Показана корреляция между заболеванием новорожденных телят диареей с присутствием РВ АГ в фекалиях. Следует иметь в виду, что обычными методами вирус не культивируется, а применение дополнительных воздействий - химических (трипсин) и физических (центрифугирование вируса на слое клеток) - дает положительные результаты при высоких концентрациях вируса в фекалиях, что проверяется электронной микроскопией. Для этого содержимое одной пробирки после замораживания и оттаивания и обработки полиэтиленгликолем ресуспендируют в 0,1 мл дистиллированной воды и исследуют в электронном микроскопе. В положительном случае обнаруживают типичные частицы РВ и их скопления. Специфический характер частиц подтверждают методом иммуноэлектронной микроскопии.

Индикация и идентификация вируса. ЭМ и ИЭМ. Метод электронной микроскопии (ЭМ) суспензии вируса из жидкой части фекалий наиболее широко применяется для диагностики инфекции при концентрации вируса в фекалиях не ниже 10^4 - 10^5 частиц/мл жидкости. Препараты готовят из осветленной низким центрифугированием жидкой части фекалий. Однако лучшие препараты получают при разведении фекалий дистиллированной водой 1:1-1:10 и последующем осветлении суспензии центрифугированием при 4-10 тыс. об/мин в течение 15 мин. Простой метод приготовления препаратов из фекалий, не уступающий по чувствительности ультрацентрифугированию, состоит в следующем. К 4 мл осветленной низким центрифугированием жидкой части фекалий добавляют 60% насыщенного р-ра $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ смешивают, оставляют на 1 ч при 4°C, а затем центрифугируют 10 мин при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в 4-х каплях дистиллированной воды и готовят препараты. Существуют различные способы и модификации приготовления препаратов из. Наиболее широко используется капельный способ. Более целесообразно применять ИЭМ. Для этого можно использовать сыворотку лабораторных животных (кроликов, морских свинок), иммунизированных РВ обезьян или сыворотку реконвалесцентов. Содержание и специфичность АГ в сыворотках реконвалесцентов могут быть проверены в серологических реакциях с использованием вируса SA 11. При обработке фекальной суспензии иммунной сывороткой одновременно с обнаружением типичных частиц РВ устанавливается их специфичность, на что указывает выявление агрегатов, в которых РВ ча-

стицы связаны специфическими иммунными глобулинами. Чаще используют три модификации иммуноэлектронной микроскопии.

При положительном результате РВ частицы выявляются в препарате в виде специфических скоплений (иммунных комплексов). Оценку специфичности реакции проводят путем подсчета числа и размеров подобных скоплений, а также по степени покрытия отдельных вирионов АГ сыворотки. Выраженность этого эффекта при определенном навеске можно оценивать по шкале условных единиц от 0 до 4-х плюсов.

ИФ. Для обнаружения вирусного АГ в замороженных срезах тканей кишечника, мазках фекалий и культуре клеток успешно применяют прямой и непрямой методы. При исследовании криосрезов кишечника и мазков из фекалий телят лучшие результаты получают в течение 4-6 часов после обнаружения признаков диареи. Эпителиальные клетки быстро десквамируются с поверхности ворсинок кишечника и удаляются с фекальными массами. Чаще всего суспензией фекалий заражают культуру клеток и идентифицируют вирусный АГ в реакции ИФ. Разработан прямой метод ИФ в клетках МДВК, инфицированных культуральным или фекальным вирусным материалом. В методических рекомендациях по индикации РВ КРС непрямым методом ИФ предусматривается использование диагностического набора, включающего антиген специфической - культуральную вируссодержащую суспензию клеток ПЭК или МА-104; АГ нормальный - неинфицированную суспензию клеток ПЭК или МА-104, специфическую сыворотку, полученную путем гипериммунизации телят, лабораторных животных; нормальную сыворотку от здорового КРС, не содержащую АГ к РВ; антивидовую сыворотку против глобулинов КРС, конъюгированную ФИТЦ (выпускает Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи). НИФ можно использовать для обнаружения и идентификации РВ АГ в инфицированных культурах клеток, фекалиях и кишечнике больных и павших телят для выявления и количественной оценки АТ к РВ.

РДП. Это - простой и доступный метод выявления РВ АГ в фекалиях больных телят, содержимом кишечника и суспензии слизистой оболочки кишечника павших или вынужденно убитых телят. Для этого 20% суспензию фекалий в фосфатно-буферном солевом р-ре прогреть в водяной бане при 37°C 30 мин, периодически перемешивая. Затем центрифугируют 15 мин при 8000 g. Надосадочную жидкость фильтруют через фильтр "Миллипор" и фильтрат концентрируют в 25 раз при помощи диализного концентратора. В результате всех этапов обработки 0,1 мл концентрата соответствует 1 г исходного материала фекалий. Источником специфических АТ служат сыворотки реконвалесцентов после ротавирус-

ного гастроэнтерита, предварительно проверенные в других серологических реакциях.

РДП проводят в геле агарозы на стеклянных пластинках 0,9% агарозы в буферном р-ре, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М трис(гидроксиметил)-аминометана и 0,001 М этилендиа-минтетраацетата. Компоненты реакции помещают в вырезанные в слое агарозы лунки диаметром 3 мм, отстоящие друг от друга на 3 мм. Пластинки с гелем выдерживают в течение ночи при комнатной температуре, после чего учитывают результаты. Между лунками с АГ и АТ в положительных случаях формируется одна четкая линия преципитации. В РДП испытывается АГ - жидкая часть фекалий или надосадочная жидкость после центрифугирования суспензии фекалий или кишечника, испытуемая сыворотка от переболевших телят, молозиво и молоко в натуральном виде (в виде сыворотки) после обработки сычужным ферментом.

Реакция иммунопреципитации с окрашиванием преципитатов флюоресцирующими АТ может применяться для обнаружения в фекалиях РВ человека и РВ диареи телят. Разработана ее ускоренная модификация. Диагностикум, включающий специфический и нормальный АГ, специфическую сыворотку, готовят по методике ВИЭВ, а в качестве нормальной сыворотки используют фетальную сыворотку или сыворотку безмолозивных телят. Реакцию оценивают по образованию характерных линий преципитата.

РСК. Для выявления АГ применяется реже других методов. Она менее чувствительна, чем электронная микроскопия и РИФ, чаще дает ложноположительные результаты из-за антикомплемментарности многих проб фекалий. Однако при обработке фекалий комплементом, фетальной сывороткой, фреоном, очисткой ПЭГ 6000 или ультрацентрифугированием РСК не уступает по чувствительности электронной микроскопии. Реакцию ставят микрометодом со специфической сывороткой или сывороткой недавно переболевших телят, свободной от АТ к другим вирусам.

ВИЭФ. При этой реакции образуется линия преципитации между АГ, движущимся к аноду, и АТ, движущимся к катоду. Качество и чистота агарозы являются основным фактором получения воспроизводимых результатов. Большинство исследователей считают, что этот тест не уступает электронной микроскопии или даже превосходит ее.

ВИЭФ предложен для обнаружения РВ в фекалиях и патологическом материале и для выявления АТ в сыворотках крови. Для исследования берут жидкую часть фекалий. Если для исследования жидкой части недостаточно, то пробы фекалий центрифугируют 10-15 мин при 4 тыс. об/мин при 4-10°C. Исследуют надосадочную жидкость. Кляночек мелко

измельчают, добавляют равный объем физиологического р-ра, затем гомогенизируют в ступке со стеклом, центрифугируют 10-15 мин при 2 тыс об/мин при 4-10°C. Надосадочную жидкость используют в реакции. ВИЭФ ставят в 0,85%-ом р-ре агарозы, приготовленной на 0,5 М перманганатном буфере (рН 8,6).

ELISA. По чувствительности выше, чем ЭИ, ИФ, РСК, ВИЭФ. Может быть использован в прямом и непрямом вариантах, а также в постановке на латексе. С помощью ELISA можно обнаружить РВ в фекалиях телят при разведении исследуемой пробы до 1:5000. Описан твердофазный ELISA для типирования и деления на подгруппы РВ человека и животных. Для этого используют IgG в концентрации 5 мкг/мл; разведение кроличьей антисыворотки к IgG КРС до 1:400. Продолжительность инкубации IgG - 4 ч, реакции АГ РВ с IgG - 3 ч, реакции антисыворотки к РВ с комплексом IgG - РВ АГ - 16 ч, для соединения с конъюгатом - 4 ч, для изменения цвета субстрата (фосфата Р-нитрофенила) - 10 мин. Перед исследованием фекалии телят разводят в 4 раза фосфатно-буферным р-ром, осветляют центрифугированием и обрабатывают смесью Твина-20 в растворе натрия. Показания ELISA в 100% случаев совпадают с результатами электронной микроскопии.

Разработана тест-система ИФА на основе РВ свиней для выявления специфического АГ РВ КРС, которая обладает высокой чувствительностью и специфичностью. В Российской Федерации разработан иммуноферментный диагностический набор, выпускаемый ВИЭВ. Набор включает специфический лиофилизированный РВ АГ - вирусодержащая суспензия, полученная на культуре клеток МА-104, концентрированная ПДГ 6000 и центрифугированная при 6000g, контрольный АГ, лиофилизированная специфическая антиротавирусная сыворотка, полученная путем гипериммунизации телят или кроликов вирусом, очищенным в градиенте плотности хлористого рудидия; сухие иммуноглобулины, выделенные из телячьей сыворотки; антиротавирусной сыворотки методом высаливания насыщенным р-ром $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ с последующей ионообменной хроматографией на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Существует ряд других методов для выявления РВ АГ в фекалиях больных диареей телят: реакция обратной пассивной гемагглютинации, метод иммуноагрегатной ГА, реакция агглютинации латекса и др. Так предложен простой стафилококковый метод для обнаружения РВ в фекалиях новорожденных телят с использованием кроличьей сыворотки к РВ телят. Метод основан на обнаружении РВ агглютинирующего стафилококка в 10%-ой суспензии образцов фекалий на предметных стеклах с золотистым стафилококком, нагруженным РВ АГ. Контролем служат фека-

филококки, обработанные неиммунной кроличьей сывороткой. Агглютинация видна под микроскопом через 2-3 мин после кругового покачивания стекла. Во избежание неспецифических реакций проводят предварительную обработку образцов фекалий нагреванием, фильтрацией и β -ацетилцистеином. Такая обработка не снижает специфичности метода. В сравнении с ELISA данный метод оказался чувствительнее; преимущества его — скорость, простота и низкая стоимость, что очень важно для скрининга большого числа образцов фекалий.

Метод агглютинации латекса с использованием коммерческого набора Rotalex для выявления РВ в фекалиях больных столь же специфичен, чувствителен, как и методы электронной микроскопии, ИФ и ELISA. Для дифференциации подгрупп и серотипов изолятов РВ описан метод гибридизации нуклеиновых кислот, электрофорез в ПААГ вирионной РНК вирусом. Метод точечной гибридизации высоко специфичен, позволяет выявлять 8 нг вирусной РНК и в 10-100 раз более чувствителен, чем ELISA.

Вариантная идентификация с помощью монАТ. Получены монАТ к шт. RIT4237 (серотип I) РВ КРС. Нейтрализация АГ выявила переменную специфичность к групповым и подгрупповым детерминантам. Использование монАТ против субгрупповых АГ в ELISA было установлено доминирование серотипа II РВ человека в пробах кала больных детей. Наличие таких АТ увеличивает чувствительность и специфичность тест-систем.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Серологическое исследование сывороток крови телят имеет весьма ограниченную ценность. В течение первых недель жизни не удается обнаружить прироста АТ, несмотря на прошедшую болезнь. Уровень гуморальных АТ у взрослых животных не позволяет прогнозировать возникновение эпизоотии в стаде.

РСК. Для диагностики РВИ показана возможность постановки РСК с парными сыворотками переболевших животных. В первые дни болезни КСА у большинства животных отсутствуют. К 7-10 дню уровень их возрастает, достигая максимума к 21 дню, затем происходит снижение, и к 30-35 дню титр КСА доходит до нуля. РСК ставят общепринятым методом в микро- и макрообъемах.

РТГА. Ставят по стандартной методике, используемой диагностическими вирусологическими лабораториями. Применяют стеклянные пробирки и обычные объемы реагентов или одноразовые пластиковые панели с лунками и микрообъемы реагентов. Для постановки реакции используют эритроциты человека группы O или эритроциты морской свинки. Исследуемые сыворотки обрабатывают каолтином и эритроцитарной

массой (последнее - при использовании эритроцитов человека). Все разведения готовят на физиологическом солевом р-ре с добавлением 0,04 г альбумина сыворотки КРС.

Непрямая ИФ, РН, радиоиммунологический метод ставятся наряду с принятым методикам.

Дифференциальная диагностика. РВИ у новорожденных телят следует дифференцировать от коронавирусной инфекции, колибактериоза. Необходимо исключать диспепсию новорожденных телят алиментарного происхождения. Для титрования вирусов группы А разработаны методы дот- и блот-гибридизации РНК с зондами к ДНК геномного сегмента А полученными с помощью амплификации в ПЦР гипердивергентных областей гена белка VP4 (нуклеотиды 211-686) к ДНК шт. ИК, IND, NCDV и Ст с использованием олигонуклеотидных праймеров. Зонды 3 типов специфичны (VP4) и не реагируют перекрестно с 2-нитевыми РНК гетерологичных Р-типов РВ.

Лабораторная диагностика вирусной диареи крупного рогатого скота

Вирусная диарея - болезнь слизистых оболочек (ВД-БС) - инфекционная контагиозная болезнь КРС, преимущественно молодых животных, характеризующаяся эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта, ринитом, увеличением лимфоузлов, высокой лихорадкой, общим угнетением, лейкопенией, постоянной или перемежающейся диареей, эрозивным и язвенным стоматитом с обильным слюноотделением, появлением слизисто-гнойных истечений из носовой полости. У коров возможны аборт. Впервые как самостоятельное заболевание ВД-БС была определена в штате Нью-Йорк (США) в 1946 г. при вспышке острой, часто со смертельным исходом болезни КРС, характеризовавшейся диареей и эрозийными поражениями ЖКТ. В настоящее время ВД-БС широко распространена на территориях многих стран и вместе с 2-мя другими пестивирусами (ВКЧС и вирус ПБО) инфицирует 173 вида домашних и диких жвачных животных и 11 видов свиней. Известны публикации об обнаружении АТ и АГ пестивируса у человека, но возможность его инфицирования только предполагается.

На основании различий в клинических проявлениях вирусную диарею и болезнь слизистых оболочек КРС первоначально рассматривали как разные болезни. Позднее на основании анализа патологических изменений, особенностей эпизоотологии и клинических проявлений эти 2 болезни стали обозначать под названием вирусная диарея - болезнь слизистых

оболочек КРС. Поскольку установлена идентичность возбудителей этих болезней, то их считают одной инфекцией с различными клиническими проявлениями, преимущественным развитием респираторного или диарейного синдрома, в связи с чем болезнь чаще стали называть вирусная диарея КРС.

Болезнь зарегистрирована во всех странах мира. В некоторых штатах США обнаруживается до 70-90% серопозитивных животных.

Диагноз ставят на основании клинических, эпизоотологических данных и лабораторных методов исследования. Однако эпизоотологические данные, симптомы болезни и характер патологических изменений дают основание лишь заподозрить болезнь. Поскольку ВД-БС напоминает многие другие болезни (чуму, инфекционный язвенный стоматит, грибковый стоматит, ПГ-3, катаральную лихорадку КРС, паратуберкулез и алиментарные отравления), лабораторные исследования в диагностике имеют решающее значение. При постановке диагноза на ВД-БС следует учитывать следующее: заболевают отдельные животные в возрасте 3-36 мес, типичные клинические изменения проявляются поражением слизистых оболочек или кровавистым поносом с эрозией или без эрозии слизистых мембран, все заболевшие животные погибают в течение нескольких дней, у больных животных нет специфической АТ в крови, хотя остальное поголовье имеет их в высоких титрах.

Лабораторная диагностика ВД-БС включает: 1) обнаружение в патологическом материале (мазках, отпечатках, срезах), полученном от больных животных АГ в РИФ; 2) выделение возбудителя из патологического материала в культуре клеток ТБ, ПЭК или ЛЭК него идентификация в РН или РИФ; 3) выявление АТ в сыворотке крови больных и переболевших животных (ретроспективная диагностика) в РСК и РН.

Лабораторную диагностику ВД-БС проводят с использованием набора диагностикумов, выпускаемых биологической промышленностью. Ее ведут параллельно с исследованием материала на ПГ-3, аденовирусную (адено 1 и 2), РС и ИРТ.

Предварительный диагноз на ВД-БС КРС ставят на основании положительных результатов обнаружения АГ в патологическом материале в ИФ и ПЦР с учетом эпизоотологических и клинических данных, а также патологоанатомических изменений. Окончательный диагноз ставят на основании: совпадения результатов ИФ с ПЦР, выделением и идентификацией вируса; совпадения результатов ИФ с обнаружением АТ в 30% и более вторых проб парных сывороток в титрах не ниже 1:4 в РСК и 1:16 в РН; обнаружения 4-кратного и более прироста АТ в парных пробах сыво-

роток. Предварительный диагноз ставят в ветеринарный лабораториях в течение 2-3 дн, окончательный - до 30 дн.

Выделение вируса. В лабораторию направляют патологический материал от больных животных, взятый в первые 2-3 дня при выраженных симптомах болезни или от животных, убитых с диагностической целью в острой стадии заболевания. От больных животных берут 15-20 проб следующего материала: смывы со слизистой оболочки носовой полости, получаемые путем введения стерильного ватно-марлевого или поролонового тампона в носовые ходы; пробы крови в первые 3 дн болезни и через 1 нед от тех же животных с соблюдением правил асептики в стерильные пробирки по 8-10 мл; соскобы с язвы ленных или эрозированных участков слизистых оболочек ротовой полости и носового зеркала, выстиженные жесткими ватно-марлевыми тампонами или скальпелем. Тампоны с материалом помещают в стерильные пенициллиновые флаконы или пробирки с 2-3 мл стерильной физиологической р-ра или р-ра Хенкса, содержащего 500-1000 ЕД/мл антибиотика (канамицина, мономицина, неомицина, пенициллина, стрептомицина и др.). Из крови после свертывания стерильно сливают 3-4 мл сыворотки и доставляют в лабораторию.

От животных, убитых с диагностической целью, берут с соблюдением правил асептики кусочки легких с бронхом (на границе пораженного и здорового участков), селезенки, средостенные, бронхиальные и брыжечные лимфоузлы, миндалины, пораженные участки слизистых оболочек носовой и ротовой полостей, трахеи, ЖКТ, а также пробу крови. Кусочки материала массой до 20 г помещают в стерильную, плотно закрытую посуду. Легче вирус выделить в начале болезни и в период обострения из крови, легких, различных участков тонкого кишечника (в особенности из клеток слизистой оболочки 12-перстной кишки лимфоузлов и селезенки). При хроническом течении болезни его удается регулярно выделять из разных отделов кишечника, но не из крови. Исследование смывов и фекалий в этих случаях также дает отрицательные результаты, хотя в отдельных случаях вирус выделяли из фекалий даже через 1 мес после болезни. В начале болезни в период подлиематемпературной болезни животных берут пробы крови в р-р цитрата натрия или гепарина и помещают их в термос со льдом. Из крови экспериментально зараженных животных выделяли вирус с 1-14-го дн после заражения. Выделяли его также из тканей абортированных или мертворожденных плодов, плаценты и околоплодной жидкости.

Заражение культур клеток. Вирус выделяют в первичных субкультурах клеток эмбриона КРС (ПЭК, ЛЭК, СЭК) или ТБ. Изолят считается выделенным в случае, если он вызывает стабильное однотипное ИТД в

менее чем в 2-х последовательных пассажах. В этом случае возможна его идентификация в РН. В первичных культурах клеток почки эмбриона коров первые ЦПИ обнаруживают через 2-5 дн после инокуляции. Они выражаются в появлении мелкозернистой инфильтрации в клетках фибробластоидного типа. По мере развития инфекции клетки постепенно отторгаются от поверхности стекла, но некоторые долго сохраняются, образуя островки клеток эпителиоидного типа. В конце концов на стекле остается только сеть зернистого материала.

При использовании вторичных культур клеток цитопатические изменения появляются почти одновременно во всех клетках монослоя, причем они становятся удлиненными, угловатыми и кажутся переплетенными. В окрашенных препаратах клеточного монослоя при наличии цитопатических изменений обнаруживают вакуолизацию протоплазмы и изменение ядер, выражающиеся в сокращении мембраны, пикнозе и карioreксии. В некоторых случаях вакуолизация бывает так выражена, что ее наблюдают при микроскопии неокрашенных препаратов. Развитие ЦПИ не соответствует возрастанию титра вируса. К 72-96 ч после инокуляции, когда титры вируса достигают максимума ($10^{5,5}$ - $10^{6,5}$ ТЦД₅₀), отмечают лишь начало ЦПД. При отсутствии ЦПД в 3-х последовательных пассажах клеток 4-й пассаж проводят с попыткой выявления вируса в монослойной культуре на покровных стеклышках в ИФ. При отрицательной реакции дальнейшее исследование прекращают. Однако отрицательный результат в этом случае не дает права на постановку диагноза. Для идентификации таких штаммов японские исследователи предлагают использовать феномен экзальтации вируса БН в присутствии возбудителя ВД-БС. Сущность метода сводится к появлению ЦПИ при совместном выращивании этих агентов в культурах клеток тестикулярной ткани КРС. Методика исследования заключается в следующем. Диспергированные трипсином клетки тестикулярной ткани КРС суспендируют до концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл в 0,5%-ном р-ре ГЛАХ с сывороткой КРС, проверенной на отсутствие ВНА к возбудителю ВД-БС. Суспензию распределяют по 0,5 мл в пробирки. В каждую из них инокулируют по 0,5 мл вирусного материала (разведенного ВД) и инкубируют при 37°C в наклонном стационарном положении. В качестве контроля в каждый опыт включают не инокулированные культуры. После 4 дн инкубирования жидкость удаляют, а культуры заражают вирусом БН (10^6 БОЕ в 0,5 мл среды). После дополнительного 3-дн инкубирования при 37°C культуры исследуют на наличие ЦПД. В культурах, первоначально инфицированных нецитопатогенным штаммом ВД, после заражения вирусом БН появляется четко выраженные ЦПИ. В контрольных культурах один вирус БН обычно не вызывает

ЦПИ. Незараженные культуры, в которые не вводили ни одни из вирусных агентов, должны оставаться нормальными.

Для пассирования не цитопатогенных штаммов культуры, инокулированные вирусом диареи каждого пассажа, инкубируют 3 дн при 37°C, после чего собирают культуральную жидкость, которую используют для дальнейших пассажей, а культуры инфицируют вирусом БН и дополнительно инкубируют для индикации ВД при помощи феномена экзантемы.

Заражение телят. Биопробу на телятах ставят в тех случаях, когда попытки выделить специфический вирус оказались безуспешными или возникает сомнение в его наличии в связи с тем, что в зараженных культурах клеток нет ЦПИ. Используют телят 2-6-мес возраста, проверенных на отсутствие ВНА к ВД, или телят 4-6-дн возраста, полученных из благополучного хозяйства. В качестве материала для заражения используют культуральную жидкость 3-5 пассажей, 5-10 мл которой вводят внутривенно. Если в исследуемом материале есть вирус диареи, у телят на 4-7-й день после заражения отмечают повышение температуры, лейкопению, появление слизистых истечений из носовой полости и диарею; у некоторых животных могут отмечаться тенезмы. В случае положительного результата у зараженных животных вирус сравнительно легко удается выделить из крови. В наибольшей концентрации (10^3 - 10^5 ИД₅₀/мл) вирус обнаруживают через 4 дн после заражения, хотя присутствие его в крови подтверждается на протяжении 15 дн.

Серологическая идентификация.

ИФ. Аналогична таковой при диагностике аденовирусной инфекции. Этим методом АГ ВД обнаруживают в клетках слизистой оболочки прямой кишки, селезенки, легких и лимфоузлов экспериментально зараженных животных. Изучено распределение АГ ВД-БС в тканях животных острым и хроническом течении болезни. В лимфоидных тканях АГ располагается в клетках системы фагоцитирующих мононуклеаров. Местом первоначального обнаружения АГ в слизистой кишечника, кератицированном эпителии верхних отделов пищеварительной системы и крови и прогрессированием патологических признаков имеется скрытый период.

ИФ биопсийного материала слизистых оболочек ротовой и носовой полостей пригодна для ранней прижизненной диагностики вируса диареи. ИФ для обнаружения АГ вируса в клетках из носоглоточных слизистых — надежный и быстрый способ выявления животных, персистентно инфицированных вирусом. При исследовании препаратов обращают внимание на свечение АГ в цитоплазме не разрушенных клеток. Яркая желтая флуоресценция в виде гранул или диффузного свечения цитоплазмы не

менее чем в 10% клеток позволяет оценить препарат как положительный. Предварительный диагноз ставят при наличии не менее 30% положительных препаратов от общего количества исследованных проб. Удобным оказался непрямой метод ИФ с использованием конъюгированных Раб-фрагментов АТ из гипериммунной свиной сыворотки против ВД-БС КРС. Специфическая флюоресценция вирусного АГ в культуре бычьих макрофагов обнаруживалась в цитоплазме клеток. Для идентификации не цитопатогенных изолятов метод ИФ практически единственный. При наличии ЦПД в культурах клеток, зараженных изолятом, и положительной флюоресценции проводят окончательное типирование вируса в РН.

РН. Это основной метод идентификации вируса. Новые изоляты возбудителя ВБ-БС, не обладающие цитопатогенной активностью, могут быть идентифицированы при помощи гипериммунной сыворотки к вирусу диареи по подавлению феномена экзалтации вируса НБ, который используют для индикации подобных штаммов.

РДП. Обеспечивает быструю и точную постановку диагноза, однако пока чувствительность метода невелика, и его следует использовать в комплексе с другими методами лабораторной диагностики и идентификации возбудителя. Приготовление испытуемого АГ и методика постановки РДП описаны ранее. Антисыворотку для РДП готовят на КРС. Для иммунизации животных используют нитрированную кровь, взятую асептически от экспериментально зараженных животных в период подъема температуры. Кровь вводят внутривенно (некоторым животным делают несколько таких инъекций). Кровь берут через 60-90 дн после инокуляции.

Выявление вируса ПЦР. Данный метод рекомендован для быстрой диагностики ВД-БС. После цикла обратной транскрипции образцы ткани инфицированной культуры клеток подвергают амплификации с использованием праймеров, обеспечивающих репликацию определенного сегмента гена белка gp48 ВД. Для обнаружения амплифицированных последовательностей используют электрофорез в ПААГ и гибридизацию с биотинилированным, ДНК-зондом на последовательности генома вируса лейкоза. При идентификации молочных стад, инфицированных вирусом ВД-БС КРС, также предложен метод ПЦР для работы с пробами молока. Вирусную ДНК выделяют из соматических клеток цельного молока методом экстракции изотиоцианатом гуанидина и фенолом-хлороформом. При острой инфекции РНК вируса обнаруживалась через 6-10 дн после заражения, а при хронической - с использованием обоих праймеров (5'-нетранслируемая область (5'-НТ) и область р80) до разведения молока 1:640. ПЦР оказалась в 14,6 раза чувствительнее других методов выде-

ния вируса. Для выяснения РНК ВД методом ПЦР необходимо не менее 580 соматических клеток, тогда как для выделения вируса - не менее 8500 клеток. Чувствительность и специфичность ПЦР подтверждена гибридизацией по Соузерену. Чувствительность метода превышает чувствительность выделения вируса в культуре клеток в 10^2 - 10^4 раз. Показана возможность обнаружения персистентной инфекции ВД-БС КРС методом ДНК-гибридизации и ПЦР.

Биотинилированные зонды комплементарной ДНК уже широко используются для обнаружения пестивирусов (КЧС, ВД-БС КРС и ПБС). В Бельгии разработан метод обнаружения специфических АТ к ВД с помощью ИФА, проводимого с рекомбинантным АГ и монАТ. ИФА с монАТ удобен для выявления вирусемии у животных; с его помощью в лейкоцитах обнаруживали 2 родственных неструктурных белка (p80K и p120-130K). Вирусный АГ был обнаружен в В- и Т-лимфоцитах, моноцитах. Помимо общепринятого метода ИФА предложена иммуноферментная реакция захвата АГ ВД КРС в лимфоцитах периферической крови КРС. В реакции для захвата АГ используют монАТ к консервативному АГ домену неструктурного белка (p125/p80) ВД.

Кроме ИФА разработан и предложен метод взаимодействия специфической антисыворотки с вирусным АГ ВД в лимфоцитах инфицированных животных с помощью проточной цитометрии. Метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью. Для повышения чувствительности реакции лимфоциты фиксируют, их клеточные мембраны кальцинируют, и вирусный АГ выявляют при использовании биотинилированных Ig из антисыворотки свиней с последующей инкубацией с ФИТЦем, конъюгированным авидином.

ИФА. ИФА позволяет легко идентифицировать культуры клеток, инфицированные В Д. Идентификация с помощью монАТ в практическом диагностическом применении не разработана. Однако получено 5 монАТ (XI A9, AE3E2, AM2G5, BT48, BT6G9) против вируса ВД-БС КРС с высокой активностью, которые позволили разделить изоляты ВД на 4 группы. Получена и изучена панель монАТ против Singer-изолята, с помощью которой были обнаружены полипептиды мол.м. 56-58 кД и доказано, что гл-копротеин, локализуется на поверхности вирионов и является носителем нейтрализующих эпитопов. Анализ с панелью монАТ показал АГ гетерогенность среди изолятов этого вируса.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Серодиагностика заболевания затруднительна, так как при хроническом течении инфекции АТ обнаруживаются непостоянно и бывают в невысоких титрах. Диагноз на прошедшую инфекцию, а также латентное вирусоносительство

ство обычно ставят при помощи РН в культуре клеток, определяя титры АТ в сыворотках реконвалесцентов. Для этого лучше исследовать парные сыворотки, взятые с интервалом 3-4 нед. При диагностике скрытого течения инфекции чаще используют сыворотки крови убойного скота, поступающего с клиникой не диагностированной инфекции кишечного и респираторного трактов. Обычно в таких случаях процент положительных сывороток (титры от 1:16 до 1:128) варьирует в широких пределах и может достигать 30-50 (иногда до 80). У клинически здоровых животных процент положительных проб может колебаться от 6-8 до 20-30. Динамика появления и угасания титров ВНА недостаточно изучена. Перед исследованием сыворотки прогревают в водяной бане при температуре 57-58°C 30 мин.

В США разработан быстрый количественный метод титрования ВД КРС. Он состоит в микротитровании с использованием цитопатогенных и не цитопатогенных изолятов вируса и перевиваемой линии клеток бычьей почки - МДВК. Для этого серийные разведения вирус-содержащей жидкости и суспензию клеток в концентрации $1-10^5$ в среде с 2% сыворотки крови лошади заливают в лунки пластин Terasaki и проводят микротитрование в НИФ, которую учитывают на дне лунок пластин, используя водно-иммерсионный объектив микроскопа. Вирус также титруют и по бляшкообразованию. Специфическую флуоресценцию в клетках наблюдали уже через 12 ч после заражения, окончательные результаты считали через 72 ч инкубирования. Результаты титрования вируса по бляшкам и в микротитровании совпадали. Микротитрование вируса по ИФ имеет ряд преимуществ над стандартным методом титрования по бляшкам: требует меньше времени и материалов и особенно незаменимо при титровании не цитопатогенных изолятов ВД.

РН. Её ставят методом разведения испытуемых сывороток с постоянной дозой стабильного вируса в культуре клеток ПЭК или ТБ. Положительными считают сыворотки титром АТ 1:16 и выше, в парных сыворотках - повышение титра АТ во второй пробе в два и более. При экспериментальном заражении у всех телят через 15-61 день обнаруживали ВНА в титре 1:64 - 1:1024. Реакция, суть которой заключается в подавлении образования бляшек АТ исследуемой сыворотки, оказалась пригодной для серологических исследований при ВД-БС. После получения гомогенного слоя клеток культуру промывают 1 раз фосфатным буферным р-ром и заражают 15 мл суспензии вируса в таком разведении, чтобы в 1 мл ее содержалось около 20 БОЕ. После адсорбции вируса при 37°C в течение 30 мин сушку отсасывают и наносят на культуру 15 мл агара. После застывания агара на его поверхность раскладывают кружки фильтровальной

бумаги, насыщенной неразведенной исследуемой сывороткой. После 4 дней инкубации при 37°C учитывают результаты. Доказательством того, что исследуемая сыворотка содержит АТ, служит отсутствие поврежденного слоя клеток вокруг насыщенного ею кружка фильтровальной бумаги, что обнаруживается в виде венка клеток.

РСК. Ставят микрометодом с использованием микротитратора Тавачи или Титертека. При их отсутствии возможна постановка РСК в пробирках в общем объеме 0,5 мл.

РДП. Не нашла широкого применения в ветеринарной диагностической практике при обнаружении АТ в сыворотках животных. ПА позволяют в сравнительно поздние сроки (3-4 нед) после инфицирования и могут сохраняться 4 мес (титры АТ до 1:16).

ELISA. В 500 раз чувствительнее РН, менее трудоемок и быстрее выполняется. В качестве АГ использовали вирус, концентрированный ПЭГ и очищенный градиентным равновесием ультрацентрифугированием. Оптимальная концентрация АГ составляла 1 мкг на лунку.

Дифференциальная диагностика. При постановке диагноза на ВД-БС необходимо исключить ИРТ, аденовирусную инфекцию, ПГ-3, плазменную катаральную лихорадку, ящур, паратуберкулезный ринит и др. Ввиду того, что ВД-БС может проявляться в различных формах (от острой до латентной), часто ассоциируется с такими инфекциями, как ПГ-3, аденоинфекция, хламидиозы др., для окончательного диагноза необходимы лабораторные исследования. Лишь в качестве подозрения на ВД-БС следует учитывать быстрое распространение в стаде болезни, сопровождающейся лихорадкой, диареей, эрозиями в ротовой полости и ранней лейкопенией.

Лабораторная диагностика парагриппа -3 крупного рогатого скота

Парагрипп-3 (ПГ-3) КРС (транспортная лихорадка КРС, параназальный энца-3) - острая контагиозная вирусная болезнь, главным образом телят, характеризующаяся поражением органов дыхания.

В настоящее время ПГ-3 зарегистрирован во всех странах мира с развитым животноводством.

Лабораторная диагностика включает: а) обнаружение АГ в патологическом материале (мазках, отпечатках, срезах), полученном от больных животных в РИФ; б) выделение возбудителя из патологического материала в культуре клеток почки эмбриона коровы (ПЭК) или легких эмбриона коровы (ЛЭК) и его идентификацию в РТГА, РИФ и др.; в) выявление АТ в сыворотке крови больных и переболевших животных (ретроспективная диагностика) в РТГА. Лабораторную диагностику ПГ-3 при-

водят с использованием набора диагностикумов, выпускаемого биологической промышленностью. Ее обычно ведут параллельно с исследованием материала на аденовирусную и РС-инфекции, ИРТ и ВД-БС КРС. Схема проведения исследований на ПГ-3 аналогична схеме диагностики аденовирусной инфекции КРС. Предварительный диагно: на ПГ-3 ставят в течение 2-3 дн на основании положительных результатов обнаружения АГ в патологическом материале в РИФ с учетом эпизоотологических и клинических данных, а также патологоанатомических изменений, а окончательный - в течение 10-30 дн на основании совпадения результатов РИФ с выделением и идентификацией вируса. В настоящее время для быстрой индикации вируса ПГ-3 может быть использована ПЦР; г) обнаружение 4-кратного и более прироста АТ в парных пробах сывороток.

Выделение вируса. Ввиду малой устойчивости парагриппозного вируса испытуемый материал рекомендуется помещать в контейнеры с обычным льдом, немедленно доставлять в лабораторию и сразу же использовать для заражения культуры клеток. Если сделать это невозможно, нужно заморозить материал в смеси сухого льда и спирта и хранить при -20-60°C до исследования.

ВПГ-3 выделяют в первичных субкультурах клеток ПЭК, ЛЭК, ПТ, ТБ и др., которые готовят по общепринятой методике. Для парагриппозных вирусов характерным является диффузный характер РГАд, которая проявляется раньше, чем ЦПД вируса.

Первые ЦПИ зараженной культуры можно наблюдать иногда спустя 48 ч после инокуляции. Они состоят в появлении округлившихся клеток, сильнее преломляющих свет, в дальнейшем образуется синцитий и дегенерация клеток. При отрицательном результате в первом пассаже проводят второй пассаж на том же виде культуры клеток. Параллельно с пробирочными культурами ее выращивают и на покровных стеклах для ИФ. Всего рекомендуется не менее 4-х "слепых" пассажей. Изолят считают выделенным, если он вызывает стабильное одноитиное ЦПД и положительную ГАд. В этом случае возможна его идентификация в РТГАд, РИ, РТГА и других реакциях. Метод выделения вируса на эмбрионах менее чувствителен, чем заражение культур клеток и применяется сравнительно редко.

Заражение естественно-восприимчивых животных. Применяют редко вследствие дороговизны и большой трудности в подборе телят, восприимчивых к ПГ-3, не имеющих специфических АТ. Заражать восприимчивых животных вирусом ПГ-3 лучше нанесением на слизистую оболочку носовой полости и трахеи. От экспериментально зараженных телят вирус удастся выделить из экссудата носовой полости во время

подъема температуры или же из крови на 4-6-й день после интраназального и на 2-й день после внутривенного заражения. С носовым истечением вирус обычно выделяется со 2-го по 10-й день.

Индикация и вируса. В клетках HeLa и KB вирус размножается менее активно, чем в клетках почки теленка. В культуре этих клеток, а также клеток почки обезьяны, помимо синцития, вирус вызывает образование цитоплазматических, а иногда внутриядерных включений. Их находят и в эпителиальных клетках бронхов и бронхиол.

Для ускоренной индикации вирусов ИРТ, ПГ-3 стафилококки обрабатывают иммунной сывороткой. Готовят мазок, на который наносят исследуемый вируссодержащий материал, обрабатывают его иммунной противовирусной сывороткой и вирусспецифическим иммуноглобулином, меченым ФИТЦем. По специфическому свечению на поверхности стафилококка осуществляют индикацию вируса. При использовании ускоренного метода индикации время индикации сокращается до 3-4 ч.

Серологическая идентификация

РИФ. В основном АГ локализуется в цитоплазме клеток, однако в ранние сроки инфицирования одновременно наблюдается свечение ядер рышек. Парагриппозный АГ выявляют в первые дни болезни и до 10-14 дня. При осложненных формах болезни АГ выявляют более длительное время. В некоторых случаях его удается выявить даже во время инкубационного периода, за 1-2 дня до появления клинических симптомов. Специфичность ИФ составляет 94% при сопоставлении с результатами серологического исследования. Существует однозначное мнение о большей чувствительности ИФ по сравнению с РГАд при индикации парагриппозных вирусов, что делает ее перспективной для быстрой диагностики.

РТГАд. Является быстрым методом идентификации выделенного вируса. Для этого используют иммунные сыворотки кроликов или морских свинок. РТГАд ставят общепринятым методом с эритроцитами морской свинки. Исследуемый вирус считают идентифицированным, если иммунная сыворотка к ПГ-3 блокирует гемадсорбцию.

РНГАд. Используют 100 ГАд единиц вируса. По реакции гемадсорбции вирус ПГ-3 можно титровать в культуре ткани, используя для заражения культуры последовательные 10-кратные разведения. После 3-5 дней инкубации ставят РГАд с содержимым всех пробирок и регистрируют наличие гемадсорбции. За одну ГАд единицу принимают конечное разведение вируса, вызвавшего гемадсорбцию. Положительная РГАд в контрольных пробирках, отсутствие реакции в пробирках со смесью вируса и

сыворотки свидетельствует об идентичности выделенного вируса данному типу сыворотки.

РТГА. Применяется для типирования выделенного вируса при наличии в жидкой фракции зараженных культур клеток гематоглобулина в титре, достаточном для выбора 4 ГАЕ. Следует иметь в виду, что вирус парагриппа, выращенный в культуре клеток почки КРС, агглютинирует эритроциты гусей, индюков и морских свинок, в отличие от эритроцитов кур и уток. Агглютинация развивается в следующие сроки: эритроциты гусей за - 1-3 мин, индюка - за 2-5, морской свинки - за 60-90 мин. Наиболее высокие и стабильные титры выявляются с эритроцитами индюка и при значениях рН: эритроциты гусей при 5,7; индюка 5,7-7,2; морской свинки 6,8-7,2. Имунные сыворотки, используемые в РТГА, должны быть освобождены от термолабильных и термостабильных ингибиторов, для этого сыворотки прогревают при 56°C 30 мин и обрабатывают каолином или фильтратом холерного вибриона. РТГА ставят общепринятым методом.

Иммуноферментная идентификация. Сотрудниками ВНИТИБП разработана методика идентификации вируса ПГ-3 в ELISA.

Иммунодиффузия (ИД) может быть с успехом использована для диагностики ПГ-3 инфекции. В ИД выявлено 2 линии преципитации, что соответствует 2-м АГ ПГ-3.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. При серологической диагностике ПГ-3 КРС исследуют парные сыворотки телят или взрослых животных для выявления прироста АТ. Интервал между взятием проб 2-3 нед. РГА, РН, РЗГАд и РСК дают в целом идентичные результаты при исследовании АТ в период развития болезни и реконвалесценции. Однако РТГА самая чувствительная и самая простая. Кроме исследования парных сывороток крови, при серодиагностике ПГ-3 рекомендуется метод выявления секреторных АТ в РТГА. Для этого берут парные пробы носовых секретов от 8-10 животных, проявивших клинические признаки болезни (повышение температуры, истечения из носовой полости и др.), и повторяют исследования через 6-8 дн.

Перед постановкой РТГА пробы размораживают, центрифугируют 10 мин при 2 000 мин⁻¹, затем обрабатывают следующим образом: к 0,2 мл надосадочной жидкости добавляют 0,2 мл 20%-ной суспензии эритроцитов морской свинки, встряхивают, выдерживают 30 мин при 4°C, 10 мин центрифугируют при 1500 мин⁻¹; надосадочную жидкость в объеме 0,3 мл смешивают с 25%-ной суспензией каолина на физиологическом р-ре, встряхивают 25 мин, центрифугируют 15 мин при 2000 мин⁻¹. После этого надосадочную жидкость используют в РТГА.

Положительный результат исследования на ПГ-3 считают в случае выявления АТ во 2-й пробе носовых секретов в титре 1:16 и выше (при отсутствии титров АТ в 1-й пробе) или установления 4-кратного и более увеличения титра АТ во 2-й пробе носовых секретов по сравнению с 1-й.

При положительной РНГАд в контролях вируса (пробирки с культурой клеток, куда был внесен вирус в рабочем разведении с равным объемом питательной среды), учитывают её отсутствие в пробирках, куда была залита смесь того или иного разведения сыворотки и вируса. Диагностическим является не менее чем 4-кратный прирост нейтрализующей гемадсорбцию АТ в реконвалесцентной сыворотке по сравнению с сывороткой, взятой в начале болезни. РСК не нашла широкого применения в ветеринарной диагностической практике.

Максимальный срок обнаружения АТ в сыворотках крови телят после инфицирования вирусом ПГ-3 точно не установлен. Ряд исследователей полагают, что АТ сохраняются в течение 4-6 мес. Уровень образования ВНА и анти-ГА достигал пика 1:320 и выше к 14-21 дню после заражения. ELISA широко используется за рубежом для индикации и титрования АТ. Он в 4 - 64 раза чувствительнее, чем РТГА.

Дифференциальная диагностика. При постановке диагноза на ПГ-3 необходимо исключить ИРТ, ВД-БС, адено- и РС-инфекции, имеющие очень сходные эпизоотологические, клинические и патологоанатомические данные. Поэтому материал, поступивший с подозрением на ПГ-3, в лаборатории исследуют параллельно на все вышеуказанные инфекции.

Лабораторная диагностика лейкоза

Лейкоз КРС - хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, основной признак которой - злокачественное разрастание клеток кроветворных органов с нарушением их созревания, в результате чего происходит диффузная инфильтрация органов этими клетками или появлению опухолей.

Лейкозы животных диагностируют почти во всех странах мира. Наиболее широко они распространены в США, ряде стран центральной Европы, Дании, Швеции и странах ближнего Востока.

В нашей стране возникновение лейкоза связано с завозом племенного скота в 1940, 1945 - 1947 гг. из Германии в хозяйства Западной Сибири, Московской, Ленинградской, Калининградской областей, а также Украины, Латвии и Литвы. В дальнейшем лейкоз распространился в Таджикистан, Псковскую, Новгородскую области.

В естественных условиях ВЛКРС распространен среди КРС, овец, зебу и буйволов.

Вирус лейкоза КРС (ВЛКРС) относится к семейству Retroviridae, роду ретровирусов лейкоза КРС и Т-клеточного лейкоза человека. ВЛКРС обладает выраженной антигенной активностью и индуцирует синтез ВНА и КСА. ГА свойства. ВЛКРС агглютинирует только эритроциты мышей

Диагноз на лейкоз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований, которые включают гематологические и гистологические, а также серологические исследования.

Основные характеристики некоторых ретровирусов

Обозначение	Вирус	Источник	Общая характеристика	Свойства	Примечание
ALV	Лейкоза птиц	Курица	C, X, D, E	+	ДНК курицы
ALV	Лейкоза птиц	Курица	C, N или X, D, E	+	"
AMV	Миелоидоза птиц	Курица	C, X, D, E	+	ДНК курицы
BLV	Лейкоза КРС	Корова	C, X, R, E	+	Вирусный
FeLV	Лейкоза кошек	Кошка	C, N или X, R, E	+	"
FeSV	Саркомы кошек	Кошка	C, X, D, E	+	ДНК кошки
HTLV	Лейкоз человека шт I	Человек	C, X, R, E	+	Вирусный
HTLV	Лейкоз чел шт II	Человек	C, X, R, E	+	"
RAV-O	Асс с RSV шт O	Курица	C, X, R, E	+	"
RSV	Саркомы Рауса	Курица	C, X, R, E	+	ДНК курицы

Все формы лейкоза характеризуются увеличением в различной степени лимфоузлов. При лимфолейкозе они увеличены равномерно, не сращены с окружающими тканями, капсула снимается легко, на разрезе узлы серо-белого цвета, сочные и саловидные. Лимфоузлы при лимфогранулематозе, лимфосаркоме и гистиоцитарной саркоме бугристые, капсула сращена с паренхимой, на разрезе часто обнаруживают кровоизлияния и некрозы; в органах брюшной, тазовой полостей, на серозных оболочках отмечают опухолевые разрастания узлов в виде конгломератов серо-белого, желто-серого цвета. Селезенка при лимфоидном и миелоидном лейкозах увеличена. При первых 2-х формах она буро-красного цвета с четко выраженной красной и белой пульпой за счет гиперплазии фолликулов. В более поздней стадии болезни граница между белой и красной пульпой стерта. При миелоидном лейкозе селезенка красно-малинового цвета, фолликулы плохо заметны, а в отдельных участках отсутствуют, ткань рыхлой консистенции с кровоизлияниями. При лимфоретикулосаркоме селезенка не увеличена. При всех формах лейкоза отмечают очаговые или диффузные разрастания серо-белого или серо-розового цвета в

печени, почках, толще сердечной мышцы, органах пищеварения, скелетных мышцах, диафрагме и других органах.

Взятие и подготовка материала. Для гематологического исследования кровь берут из венозной вены в пробирки с антикоагулянтом (10 %-ном р-ром динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, трилон Б) из расчета 0,02 мл р-ра на 1 мл крови. Не разрешается брать кровь от животных за 15 дней до отела и 15 дней после него. Для серологического исследования кровь берут от животных в возрасте 6 мес и старше. В лабораторию в термосе со льдом направляют 5-6 мл сыворотки. Для гистологического исследования кусочки пораженных органов (селезенки, лимфоузлов, грудной кости, печени, почек, легких, сердца и правого ушка сердечной мышцы, стенки сычуга, матки и скелетных мышц) посылают в свежем виде в термосе со льдом или в 10%-ном р-ре формалина.

Индикация и идентификация вируса

Для определения вируса в различных материалах используют методы, позволяющие выявлять инфекционный вирус или вирусные АГ. Являясь типичным ретровирусом, ВЛКРС находится у инфицированных животных в форме провирусной ДНК, которую можно выявить в лимфоцитах крови с помощью ПЦР или методами гибридизации нуклеиновых кислот. При культивировании инфицированных клеток вирус можно выявить с помощью электронного микроскопа или по образованию специфичности в соответствующих индикаторных культурах.

Электронно-микроскопический метод. Позволяет выявлять вирусные частицы в культурах лейкоцитов крови животных, инфицированных ВЛКРС, и в монослойных культурах клеток, сокультивированных с инфицированными лимфоцитами. По некоторым данным, лейкоцитарные культуры (лейкоциты крови больных коров) через 48-72 ч представляются разнообразными клетками, среди которых находили лимфоциты и лимфоцитоподобные клетки, продуцирующие вирусные частицы типа С. Зрелые вирусные частицы находили, в основном, в межклеточных пространствах и на внешней мембране лимфоидных клеток. Методом ЭМ у больных лейкозных животных обнаруживают в лимфоцитах ядерные "карманы" в виде неправильного кольца и петли. Как правило, они обладают связью с оболочкой ядра и содержат цитоплазматическое вещество клетки. Иногда центральная часть их заполнена электронноплотными гранулами диаметром 400-500 нм, расположенными группами и напоминающими гранулы гликогена. Ядерные "карманы" отсутствуют в дифференцированных гранулоцитах, моно-

цитах и плазматических клетках; в одном лимфоците их обнаруживают 1-5 и более.

Тест синцитиеобразования. ТСО применяется для выявления инфекционного вируса в различных материалах и основан на способности ВЛКРС образовывать синцитии в некоторых нетрансформированных монослойных культурах клеток и в трансформированных перевиваемых культурах клеток СС81. Метод предложен для титрования ВЛКРС с использованием кошачьей линии клеток S⁺L. Показано, что заражение клеток вирусом лейкемии КРС приводит к образованию крупных многоядерных синцитиев, которые выявляются при окрашивании монослоя. Метод можно использовать для титрования вируса, так как имеется прямо пропорциональная зависимость между уменьшением количества синцитиев и разведением вирусной суспензии. Метод является воспроизводимым, специфическим и чувствительным. Рекомендуют микромодификацию метода количественной титрации инфекционного ВЛКРС, основанную на определении количества синцитиев в культуре эмбриональных клеток теленка, культивированной с лимфоцитами, зараженными вирусами лейкемии КРС, или в присутствии вируса. Отмечена линейная зависимость между числом инокулированных в культуре клеток зараженных вирусом лейкоцитов и количеством индуцированных синцитиев. При сравнении чувствительности макро- и микрометода титрации число синцитиев в микрокультуре статистически не отличалось от числа синцитиев, индуцированных в макрокультуре. Метод сокультивирования используется для выявления инфекционного ВЛКРС. Суть его состоит в сокультивировании лимфоцитов крови и чувствительных клеток моно-слойной культуры с последующим выявлением АГ ВЛКРС с помощью ТСО, РИД или ИФА.

РДП (РИД). Это относительно чувствительный тест для выявления гликопротеина ВЛКРС. Позволяет выявлять гликопротеин вируса в концентрации 0,4 мкг/мл.

Биопроба. Инфицированных животных можно выявлять путем постановки биопробы на овцах. С этой целью овцам обычно внутривенно вводят цельную кровь испытуемого животного. При наличии в пробе крови вируса у овцы развивается инфекция, сопровождающаяся образованием вирусспецифических АТ. АТ у зараженных овец выявляют в РДП с гликопротеинным АГ через 3-6 нед.

Реакция бласттрансформации. Хронический лимфодный лейкоз КРС характеризуется слабой реакцией бласттрансформации (РБТЛ). Поэтому у животных, подозрительных по заболеванию лейкозом по показателям лейкоцитов крови, проводят РБТЛ в культуре лимфоцитов крови. Показатель РБТЛ выражает процент трансформировавшихся лимфоцитов

(переходные клетки, бласты, митозы) и определяется после подсчета не менее 1000 клеток культуры. У клинически здоровых и с нормальной гемограммой коров, по данным большинства исследователей, он составляет в среднем 60% (40-90%); у больных лимфолейкозом РБТЛ значительно снижена уже в субклинической стадии. При повышенном содержании в крови общего количества лейкоцитов исследуют животных в РБТЛ. Диагноз на лимфолейкоз считают подтвержденным при показателе РБТЛ не выше 35%. Если он выше, то постановку реакции повторяют с интервалом 3 мес у тех животных, у которых нарастают гематологические изменения.

Гистологические исследования. Срезы готовят после парафиновой проводки и окрашивают гематоксилинэозином. При лимфоидном лейкозе наблюдают в селезенке и лимфоузлах стирание рисунка за счет диффузной инфильтрации клеток лимфоидного ряда, среди которых, в основном выявляют зрелые лимфоциты, в меньшем количестве обнаруживают пролимфоциты, лимфобласты. В костном мозге строма сохранена, выявляется значительное истончение и рассасывание балок, скопления лимфоцитов могут располагаться в виде очагов или диффузно, заполняя костно-мозговые пространства (лимфоидная метаплазия); в почках, печени, сердце, сычуге и других органах обычно выявляют скопления лимфоцитов в просветах капилляров и инфильтрации лимфоидными клетками интерстициальной ткани.

При недифференцированном и слабо дифференцированном лейкозе (гемоцитобластоз) в костном мозге, селезенке, лимфоузлах и других органах наблюдают очаговые и диффузные пролифераты, клеточный состав которых представлен недифференцированными или слабо дифференцированными клетками типа гемоцитобластов (родоначальная клетка). При миелоидном лейкозе (встречается редко) обнаруживают в селезенке незрелые элементы гранулоцитарного ряда, мегакариоциты, клетки типа гемоцитобластов, фрагментацию и распад аргирофильных волокон, в костном мозге - скопления зрелых и незрелых клеток гранулоцитарного ряда; в лимфоузлах, печени, почках, легких и других органах - очаговые диффузные разрастания миелоидных элементов; при лимфосаркоме (слабо дифференцированная лимфобластическая, лимфоцитарная, гистиоцитарная) в лимфоузлах, органах пищеварения, воспроизведения, сердечной, скелетных мышцах, других органах и тканях отмечают разрастание опухолей из недифференцированных или слабо дифференцированных клеток лимфоидного типа. Селезенка и костный мозг не изменены.

При лимфогранулематозе выявляют гиперплазию лимфоидных элементов или полиморфноклеточную пролиферацию, склеротические измене-

ния и некрозы в лимфоузлах, селезенке, печени и других органах; среди полиморфных клеток выявляют многоядерные гигантские клетки типа Березовского - Штернберга, плазматические клетки, эозинофилы и нейтрофилы различной зрелости, а также фибробласты. Для установления причин несоответствия прижизненных и посмертных диагнозов на лейкоз патологический процесс при этой болезни разделен на 5 стадий: скрытая (инкубационная), предлейкозное состояние, начальная, развернутая и конечная. Диагноз по картине крови при гистологическом исследовании не подтверждался лишь на ранних стадиях развития процесса, что не отрицало возможности нарушения лимфопоэза, при котором отмечалась усиленная пролиферация лимфоцитов и наводнение ими периферической крови. Отсутствие малигнизированных, лейкемических лимфоцитов на ранних стадиях болезни подтверждалось не только цитоморфологически, но и физико-химическими методами исследований. Изучение тонких морфологических особенностей клеточных элементов крови и кровяных органов позволило разделить все клетки на 4 группы, из которых патогномичное значение имеют клетки 3-й группы - молодые и малодифференцированные клетки гемопоэза; и клетки 4-ой группы - атипичные, малигнизированные клетки, отражающие опухолевый процесс.

Комплексные методы исследования позволили дифференцировать различные формы гемобластов у КРС. К гемобластозам с системным поражением органов кроветворения отнесены лейкозы: лимфоидный, недифференцированный (гемоцитобластоз), гистиоцитарный (системный ретикулез) и миелоидный. К опухолевым гемобластозам (гематосаркомы) авторы относят: лимфосаркому, гистиоцитарную саркому или лимфогранулематоз.

Гематологический метод. Основан на обнаружении в периферической крови повышенного количества лейкоцитов, в основном лимфоидного ряда, и слабодифференцированных клеток (родоначальных, пролимфоцитов, лимфобластов). Количество лейкоцитов подсчитывают с помощью электронного счетчика частиц или в камере Горяева и выводят лейкоцитарную формулу. Животных, подозрительных по заболеванию лейкозом, подтверждают дополнительным гематологическим исследованием с интервалом 2-3 мес до получения 2-х одинаковых результатов, по которым их признают здоровыми или больными лейкозом.

Следует иметь в виду, что некоторые острые и хронические болезни КРС (перикардиты, улиты, гепатохолангиты, цирроз печени, туберкулез, бруцеллез и др.) могут сопровождаться лейкоцитозом. При этом в отличие от лейкоза увеличение количества лейкоцитов происходит, в основном, за счет нейтрофилов, эозинофилов или моноцитов. Эти изменения

крови имеют временный характер, их дифференцируют от лейкозов вторными гематологическими исследованиями.

Число лейкоцитов и лимфоцитов в 1 мм³ крови здорового, подозрительного по заболеванию и больного лейкозом КРС

Возраст животных (лет)	Число лейкоцитов у здоровых	Абсолютное число лимфоцитов у подозрительных	Абсолютное число лимфоцитов у больных
От 2 до 4	До 11000	От 8000 до 10000	Свыше 10000
От 4 до 6	До 10000	От 6500 до 9000	Свыше 9000
Старше 6	До 9000	От 5500 до 8000	Свыше 8000

Разработана методика выделения мононуклеарных клеток из периферической крови инфицированного КРС и их культивирования для репродукции инфекционного вируса лейкоза. Метод позволяет получать максимальный сбор инфицированных вирусом лейкоза лимфоцитов. Из 10 мл цельной крови получают примерно 107 мононуклеарных клеток. Чтобы максимизировать продукцию вирионов и вирусных АГ, к культуре лимфоцитов добавляют Кон-А в конечной концентрации 5 мг/мл.

Конкурентный радиоиммуноанализ (РИА). Наиболее чувствительный метод выявления АГ в культурах лимфоцитов крови инфицированных животных. Метод заключается в том, что экстракт, приготовленный из 48-ч культуры лимфоцитов крови, исследуется на присутствие АГ р24 путем определения его способности предотвращать связывание меченого изотопом р24 со специфическими АТ. Для диагностики инфекции ВЛКРС у телят младше 6-мес возраста, которым выпаивали молозиво инфицированных матерей, а также у взрослых животных, иммунизированных убитым вирусом или вирусными АГ, необходимо использовать методы, основанные на прямом выявлении инфекционного вируса или вирусных АГ в культурах лимфоцитов крови исследуемых животных.

ПЦР. Дает возможность обнаруживать провирусную ДНК через 1 нед после заражения животных. Для амплификации в ПЦР использованы пары праймеров, соответствующих определенным участкам генов gp 24, env-gp5 или pol вируса лейкоза. Метод позволяет идентифицировать одну копию генома вируса лейкоза на 100000 клеток крови. Сконцентрированные также праймеры для амплификации специфических для вируса лейкоза КРС последовательностей генов pol и рХ. С помощью этого набора праймеров удавалось амплифицировать и выявлять 10 копий ДНК вируса в присутствии в образце 1 мкг хромосомной ДНК. Доказана возможность использования нерадиоактивных зондов для выявления вируса лейкоза КРС в лимфоцитах периферической крови и клетках лимфосаркомы. Фрагменты провирусной ДНК метят биотипом. Разработан метод ПЦР с

последующей нерадиоактивной блот-гибридизацией для тестирования вируса лейкоза КРС в исследуемом материале.

Серологическая идентификация

ИФ. Используют прямой и непрямой варианты при исследовании мазков крови и измененных органов, краткосрочных и перевиваемых культур крови и тканей. Непрямой вариант испытывали на концентрате с 80% живых лейкоцитов. В качестве АТ применяли сыворотку больной лейкозом коровы и меченую ФИТЦ кроличью сыворотку против глобулинов быка. При микроскопии препаратов отмечена флюоресценция на поверхности лимфоцитов в виде яркого светящегося кольца или кольца из пунктиров. В препаратах из лейкоцитов здоровых животных подобного свечения не наблюдается или оно слабо выражено в некоторых клетках. Для объективной оценки препаратов рассчитывается индекс флюоресценции (ИФ) по формуле $ИФ = (A - B) : A$, где А - процент несветящихся клеток в контроле; В - процент несветящихся клеток в опыте. Положительной считается реакция, если ИФ свыше 0,2; сомнительной - 0,11-0,2; отрицательной - ниже 0,1.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. У животных, зараженных ВЛ КРС, вырабатываются АТ к вирусным АГ, которые выявляются с помощью серологических реакций. Характерной особенностью инфекции ВЛКРС у КРС является, как правило, пожизненная персистенция вируса и вирусспецифических АТ у больного животного. Поэтому серологические методы обнаружения специфических сывороточных АТ являются наиболее практичными, экономичными и широко используемыми в диагностике онковирусной инфекции у КРС. Серологическими методами ВЛКРС можно выявлять у животных старше 6 мес, так как у телят, выпаиваемых молозивом и молоком инфицированных ВЛКРС матерей, появляются пассивно приобретенные материнские АТ, которые могут персистировать до 6-мес возраста. У зараженных животных в крови циркулируют АТ к нескольким структурным белкам вируса. Однако диагностическое значение имеют АТ против gp51 и р24 ВБЛ. Количественные соотношения АТ анти-р24 и анти-gp51 могут коррелировать со стадией инфекционного процесса, но при этом, АТ к gp51 появляются раньше и содержатся в более высоком титре, чем антитела к р24 и, следовательно, серологические реакции, направленные на выявление анти-gp51 - АТ по со своей чувствительности будут превосходить аналоги, в которых используется в качестве АГ р24.

В научно-исследовательских лабораториях для обнаружения специфических АТ используются РН, подавления раннего и позднего поликардиоцитоза, нейтрализации псевдотипов и радиоиммуноанализ (РИА). Одна-

ко, для эпизоотологического обследования, контроля и борьбы с ВБЛ-инфекцией широко применяют РИД и ИФА, для постановки которых выпускаются соответствующие коммерческие диагностические наборы. Все вышеперечисленные методы предназначены для выявления АГ в индивидуальных пробах сыворотки. Для обнаружения АГ в низких титрах, например, в индивидуальных пробах молока или в сывороточных пробах или в образцах, полученных из молочного танка, требуется высокая чувствительность РИА или ИФА. Разработан ряд серологических реакций для диагностики инфекции, таких как РИФ, РСК, РДП в геле, реакция агглютинации латекса (РАЛ), ELISA, РНГА и реакция нейтрализации седиментационного типа (РНПТ).

РДП. Благодаря простоте, специфичности и достаточно высокой эффективности эта реакция получила наибольшее применение с гликопротеиновым АГ ВЛКРС. Из вируса, осажденного методом ультрацентрифугирования культуральной жидкости краткосрочных культур лейкоцитов лейкозных животных, очищенного в градиенте плотности сахарозы и обработанного эфиром, получают АГ, который используют в РДП. С помощью этого АГ в сыворотках крови инфицированных ВЛКРС животных выявляют ПА к внутреннему полипептиду вируса р24. РДП с гликопротеиновым АГ - более чувствительный метод выявления инфицированных ВЛКРС животных, чем РДП с полипептидным АГ. РДП (РИД) в геле агара, направленная на выявление *aimi-gpSl* АГ, используется в качестве основного диагностического теста, регламентирующего международную и внутреннюю торговлю племенными животными, спермой и эмбрионами. При первичном обследовании сывороток крови одной РИД считается достаточно для объявления стада свободным от ВБЛ-инфекции. РИД применяется в системе противолейкозных мероприятий в неблагополучных хозяйствах.

Специфические ПА к ВЛКРС появляются через 2 мес после инфицирования и сохраняются пожизненно. Для постановки РДП используют диагностический набор, в состав которого обязательно должны входить специфический АГ ВЛКРС, специфическая положительная сыворотка крови КРС. Реакцию ставят макро- и микрометодами. Для изготовления АГ используют клеточную линию FLK-BLV. Из культуральной жидкости вирусный АГ выделяют методом преципитации сульфатом аммония или полиэтиленгликолем. Но наиболее технологичным методом выделения вирусного АГ считают ультрафильтрацию на полупроницаемых мембранах. На результат реакции иммунодиффузии влияют многие факторы: количество АГ и контрольных сывороток, количественные соотношения АГ и АТ, качество ага-ра, рН и ионная сила буфера, температура, диаметр

нок и расстояние между ними. Для постановки РИД выпускают диагностические наборы: Государственная Курская биофабрика (Россия); PIT-MAN-MOORE INC., Вашингтон (США), BEHRINGWERKE AG., Марбург (ФРГ), MERIEUX6 Лион (Франция), BIO-VETA NITRAL (Словакия) и др.

Перечисленные диагностикумы представляют собой наборы, состоящие из 2-8 препаратов. Обязательными компонентами каждого набора являются препараты тест-системы: вирусный АГ и антисыворотка, которые в результате специфического взаимодействия АГ (gp51 ВБЛ) и АТ в процессе диффузии формируют в геле агара нерастворимый комплекс в виде опалесцирующей полосы. Дополнительно наборы могут комплектоваться сухой солевой смесью агара, стерильным разбавителем для вирусного АГ и контрольными сыворотками, которые поставляются в жидком или лиофилизированном виде. В последнем случае наборы комплектуют соответствующими разбавителями контрольных сывороток. Наборы рассчитаны на 90-500 исследований и содержат 3-5 мл вирусного АГ.

РИД проходит в 0,8-1,0% геле агара, который готовят на трис-НСI или боратном буферах в диапазоне рН 7,2-8,6, содержащим 8-8,5% NaCl. Методика постановки реакции одинаковая для всех диагностикумов и предусматривает заполнение лунок АГ, антисывороткой и испытуемыми сыворотками по схеме 1:2:4 или 1:3:3. Принято 2 стандарта на диаметр лунок и расстояние между ними: 1 вариант в странах ЕЭС, тогда как в США, Канаде и странах СНГ приняты параметры, соответствующие второму варианту.

Таблица 104 - Параметры лунок, рекомендуемые для постановки РИД

Показатели	1 вар	2 вар
Диаметр центральной лунки для антигена мм	4	7
Диаметр периферических лунок для сыворотки мм	6	7
Расстояние между центральной и периферической лунками мм	3	3

Минимальные необходимые требования, которым должен удовлетворять диагностический набор, заключаются в следующем: АГ должен содержать оболочечный гликопротеин ВБЛ, стандартизованный по референтной сыворотке Е-1; референтная сыворотка Е-4, разведенная отрицательной сывороткой в соотношении 1:10, должна быть выявлена как положительная без повторной постановки реакции или предварительной концентрации. Референтные сыворотки Е-1 и Е-4 изготовлены в Национальной ветеринарной лаборатории Дании (Р.О. Vox 373, DK-1503 Sorengagen) и предназначены для стандартизации всех диагностических наборов для постановки РИД и ИФА.

Реакцию учитывают через 48 ч и при следующих показаниях контролей: наличие четкой контрольной полосы преципитации между АГ и специфической положительной сывороткой и отсутствие таковой с отрицательной контрольной сывороткой. Животных, сыворотки крови которых положительно прореагировали в РДП, считают зараженными ВЛКРС.

Описаны модификация метода иммунодиффузии - усиленная таном непрямая двойная иммунодиффузия в геле (НИД-Р) и её применение для выявления АТ и АГ ВЛКРС. Современная диагностика энзоотического лейкоза КРС основана большей частью на тестах иммунодиффузии и ELISA. При использовании РИД необходимо придерживаться рекомендаций производителя очень дорогого АГ. В целях снижения затрат при сохранении надежности результатов югославские исследователи уменьшили размер отверстий в розетке и слой агара в чашке Петри, сохранив прежнюю чувствительность теста.

Предложен метод очистки вируса лейкоза КРС в градиенте плотности перколла. Метод рекомендован для получения очищенного вируса и специфического АГ. Молдавскими исследователями показано значительное преимущество РИД при исследовании молозива: титр АТ был в 8-32 раз выше, чем в пробах сыворотки крови; исследовать необходимо меньшие порции молозива. Аналогичные данные получены сотрудниками ВИЭП. Титр АТ к gp51 и p24 ВЛ КРС сразу после отела был наивысшим - 1:2187, 1:59049 в ИФА и 1:16-1:512 в РДП. Через 1 сут титр АТ составлял 25% от исходного.

РАЛ. В качестве теста для прижизненной диагностики лейкоза КРС можно использовать иммунохимическую реакцию агглютинации с латексом в соответствии с временными методическими рекомендациями. Животные, сыворотки крови которых дали положительную реакцию агглютинации с латексом, подлежат тщательному обследованию на лейкоз другими методами. Данная реакция перспективна для прижизненной диагностики лейкозов. Испытание этой реакции показало в 67% случаев совпадение результатов с гематологическими и около 90% с гистологическими методами диагностики гемобластозов КРС.

ИФ. Менее широко применяют для обнаружения АТ в сыворотке крови инфицированных животных. При этом используют в качестве клеточек-мишеней перевиваемые культуры, иронически инфицированные ВЛКРС.

РНГА. Является чувствительным методом обнаружения АТ в сыворотке крови и молоке. Рекомендуют использовать при экспертизе и санитарной оценке молока. Наибольший Процент совпадений гематологиче-

ских показателей с результатами серологических исследований был отмечен в РНГА.

ELISA. Широко применяют в США, Бельгии с использованием монАТ для широкомасштабного выявления энзоотического лейкоза в стадах КРС. Чувствительность его выше, чем РДП. Метод ELISA при диагностике лейкоза КРС может существенно повысить чувствительность серодиагностики по сравнению с РДП. Он удобен для систематического контроля молока коров благополучных хозяйств.

ELISA с монАТ ставят с пулом сывороток крови, объединенных от животных одного стада. Предложено выявлять инфицированность ВЛКРС по наличию АТ в молозиве коров ELISA. Все образцы молока, взятые от больных коров, позитивных по АТ к вирусу в сыворотках, оказались положительными. Во ВНИИВиМ получены 6 гибридом, секретирующих монАТ к ВЛКРС. На основе мон АТ к gp51 предложен "сэндвич" вариант ИФА для выявления вирусного АГ. Установлено, что структура и доступность антигенных детерминант варьирует в разных системах титрования. Внесение радиоактивной метки может изменять конфигурацию АГ сайтов, что сказывается на результатах исследования сывороток. Анти ВЛ КРС АТ конкурировали со специфическим пероксидазным конъюгатом на основе монАТ за связывание с gp51.

Первым этапом в постановке "классического" варианта ИФА для выявления АТ против ВЛКРС является непосредственное покрытие лунок микропанелей вирусным АГ. При этом получают большой процент ложноположительных результатов из-за неспецифического взаимодействия невирусных компонентов АГ с испытуемыми сыворотками. Более того, использование очищенных вирусных белков в качестве АГ экономически неоправданно и не позволяет получать стандартный препарат, что сказывается на воспроизводимости результатов ИФА. Поэтому в настоящее время почти все наборы для постановки ИФА изготавливаются с использованием захвата АГ АТ, сорбированными на стенки лунок микропанелей. Существующие варианты ИФА включают 5 принципиальных этапов постановки реакции.

Этап 1. Реагенты для захвата АГ: а) монАТ против gp51; б) монАТ против р24; в) Поликлональные АТ (gp51+p24) КРС. Этап 2. Антиген: а) надосадочная жидкость после культивирования клеток FLK-BLV; б) культуральная жидкость, содержащая продукты генов env или gag ВЛКРС, экспрессируемые ркомбинантными векторами. Этап 3. Испытуемые сыворотки. Этап 4. Реагенты для обнаружения иммунного комплекса.

Непрямые варианты ИФА: монАТ против бычьего IgG; полиАТ против бычьего IgG.

Конкурентный или блокирующий варианты ИФА: а) монАТ против gp51 (направленные против других эпитопов нежели использованные на этапе 1а); б) Бычьи поликлональные АТ (такие, как на этапе 1в)

Этап 5. Цветная индикация. Реагенты для индикации иммунного комплекса (этап 4) можно метить биотином или ферментами, чаще используют пероксидазу хрена. При постановке ИФА каждая микропланшет должна содержать лунки, заполненные положительной и отрицательной контрольными сыворотками.

ИФА позволяет выявлять АТ в титрах в 10-100 раз меньших, чем обнаруживает РИД. Все коммерческие наборы ИФА должны быть стандартизированы по референтной сыворотке Е-4. Причем, процедура стандартизации предусматривает 3 возможных варианта использования наборов ИФА для исследования: 1) индивидуальных проб сыворотки; 2) индивидуальных проб молока; 3) пулов сыворотки и молока.

Поскольку в молоке АТ к ВЛКРС в 25 раз больше, чем в сыворотке крови, модифицированный ELISA должен обладать высокой чувствительностью. При диагностике лейкоза КРС качество используемых диагностикумов имеет первостепенное значение. Наиболее пригодным для ИФА в качестве АГ являются препараты вируса, полученные 2-кратным высокоскоростным центрифугированием и синтетический пептид В Швеции разработан ELISA для исследования молока и сывороток крови. В Бельгии рекомендован конкурентный ELISA с использованием монАТ и меченного пероксидазой конъюгата анти-gpS 1. МонАТ Д9 и F11 против лимфоцитов больных лейкозом животных связываются с АГ лимфоцитов крови больного КРС, «не распознают» АГ, ассоциированные с лейкозом. ELISA с использованием монАТ, превосходит непрямой тест ELISA.

Параллельно с ИФА АТ определяли РИД и электрофореза в полиакриламидном геле. Чувствительность ИФА, испытанного в 5 лабораториях Германии, составляла в среднем 97,6%, что в 4 раза выше РИД. Специфичность ИФА равнялась в среднем 98,1 % . При использовании АГ из культуральных жидкостей клеток почки эмбриона ягнят, персистентно инфицированных ВЛКРС в положительных сыворотках с помощью иммуноблоттинга, обнаруживали АТ к p24, p15, p12, p10, gp30, и gp51. В иммуноблоттинге оказались активными монАТ к p24 и gp51. Данный метод оказался более чувствительным, чем иммунодиффузия в агаровом геле и ИФА. В ИФА возможно использование синтетических пептидов

фрагментов структурного гликопротеина gp51, синтезированных во ВНИИЗЖ.

Аллергическая реакция. Разработан аллерген для диагностики лейкоза у животных. Для проведения аллергических реакций наиболее подходящее место хвостовая складка у овец и КРС и дорсальная поверхность уха у свиней.

Дифференциальный диагноз. Лейкоз необходимо отличать от актиномикоза, туберкулеза, паратуберкулеза и бруцеллеза. При актиномикозе поражаются, главным образом, лимфоузлы головы и грудной области (подчелюстные, заглочные, околушные и др.). Они плотной консистенции, с инкапсулированными абсцессами. В центре актиномикозного узла (гранулемы) гистологически обнаруживают друзы гриба. При туберкулезе чаще поражения в виде узелков, имеющих специфическое гистологическое строение, находятся в легких, кишечнике. Для паратуберкулеза характерно наличие изменений в кишечнике и брыжеечных лимфоузлах. В кишечнике развиваются продуктивное воспаление и очаговые инфильтраты из эпителиоидных клеток, в результате чего стенка утолщается в 5 и более раз. В лимфоузлах отмечают обширные скопления из эпителиоидных элементов с наличием среди них гистиоцитов и клеток типа Лангерганса. Специфическим методом окраски выявляют бактерии паратуберкулеза, локализующиеся в эпителиоидных и гигантских клетках. Бруцеллез диагностируют с помощью РСК, РА и аллергической пробы.

Лабораторная диагностика ящура

Ящур - остро протекающая высококонтагиозная болезнь парнокопытных, проявляющаяся лихорадкой, везикулярным поражением слизистых оболочек рта, кожи венчика и вымени; у молодых животных - поражением миокарда и скелетных мышц.

Возбудитель: РНК - содержащий вирус, относящийся к роду Aphthovirus, сем. Picornaviridae, имеющий 7 серологических типов (О, А, С; SAT-1, SAT-2, SAT-3, Азия-1). Вирион вируса имеет форму икосаэдра, размером диаметра 25 нм, содежит 31% РНК и 69% белка. В организме естественно восприимчивых животных вирус индуцирует образование типоспецифических ВНА, КСА и ПА. Резистентность переболевших животных к повторному заражению связана с титром ВНА. Вирус ящура устойчив во внешней среде, особенно в высушенном состоянии, при сухом воздухе, отсутствии света, при пониженной температуре. Так, при влажности 30-40% и температуре 18⁰С высушенный вирус сохраняется в течение 2 лет.

Лабораторная диагностика ящура основана на эпизоотологических данных, клинических признаках болезни, патологических изменениях в лабораторных исследованиях. Подозрение на ящур вызывает любое заболевание восприимчивых животных, характеризующееся появлением везикулярной сыпи в ротовой полости, на конечностях и вымени, повышенной саливацией, чмоканьем, затрудненным приемом и пережевыванием корма, а при осмотре ротовой полости - обнаружением афт и эрозий. Кроме того, обращают внимание на продолжительную яромоту, афты на венчике и в области межкопытной щели, иногда спадение рогового башмака, афты на сосках и болезненность последних при доении и сосании и сильно выраженным защитным рефлексом.

Эпизоотологический диагноз - высокая контагиозность, избирательное поражение только парнокопытных. Методы лабораторной диагностики ящура варьируют в зависимости от того, необходимы ли раннее обнаружение и типовая (вариантная) идентификация вируса (ранняя диагностика) или обнаружение и идентификация специфических противоящурных АТ у животных-реконвалесцентов (ретроспективная диагностика).

Лабораторная диагностика основана на выделении вируса, идентификации, идентификации и типировании вируса ящура.

Выделение вируса. Эффективность выделения вируса из патологического материала повышается при использовании методов очистки и концентрирования вирусосодержащих суспензий. Благодаря удобству выполнения, экономичности, а главное, возможности быстрого получения результатов, позволяющих одновременно определить типовую и вариантную принадлежность эпизоотического вируса, чаще всего применяют РСК или РДСК. Однако, когда доставленное количество вирусного материала недостаточно для исследования или РСК дает отрицательный результат или неспецифическую задержку гемолиза, то ставят биопробу на КРС (не менее 2 голов) в возрасте 18 мес, вводя 0,1 мл суспензии полученного материала в несколько точек слизистой оболочки языка и внутренней поверхности конечностей; общий объем испытуемого материала 2-3 мл. Появление афт на месте введения материала с последующим подтверждением РСК свидетельствует о наличии ВЯ. Однако метод дорог и связан с опасностью выноса вируса за пределы учреждения. Поэтому в диагностической практике он применяется очень редко. Чаще для биопробы используют мышат-сосунков 4-6-дн возраста, морских свинок массой не менее 500 г и первичную культуру клеток почек телят, поросят, ягнят, интравидной железы КРС и перевиваемые клетки - ВНК-21, IB-RS-2. Биопроба на мышатах удобна и экономична. ИД₅₀ испытуемого штамма на мышатах

сосунах и крупном рогатом скоте одинаковы. Мышата-сосуны более чувствительны к вирусу ящура, чем морские свинки. Однако необходимо иметь в виду, что оценка результатов титрования на мышатах-сосунках нередко затруднительна.

Морские свинки легко заражаются при интрадермальном введении вирусосодержащего материала в плантарную поверхность задних лапок в дозе 0,2-0,5 мл. Заражают не менее 5 голов. Первичные поражения обычно появляются через 2-5 дн (по мере созревания). Вторичные поражения - везикулы в ротовой полости - обычно развиваются при заражении штаммами, адаптированными к морским свинкам.

Для выделения вируса чаще всего используют культуру первично-трипсинизированных клеток почек свиней или телят. Наблюдение за инфицированными культурами клеток ведут 7 дн, микроскопируя их ежедневно. Специфическая дегенерация клеток при подтверждении её специфичности в РСК свидетельствует о наличии ВЯ в испытуемом материале.

Индикация и идентификация вируса. В качестве экспресс-метода в настоящее время широко применяется ПЦР. Это быстрый и чувствительный метод обнаружения ВЯ в тканях путем энзиматической амплификации РНК гена полимеразы.

РСК по 100%-ному гемолизу. Применяется для определения типов и подтипов (вариантов) ВЯ, вызвавших заболевание животных, а также для проверки производственных штаммов ВЯ при изготовлении вакцин и лабораторных штаммов в научно-исследовательской работе.

Антигенное родство (R) более 70% свидетельствует о том, что штаммы по антигенным свойствам идентичны друг другу и относятся к одному и тому же варианту, от 10 до 70% - к различным вариантам (подтипам) и менее 10% - к различным типам.

РСК по 50%-ному гемолизу. Успешно применяют в работе научно-исследовательских лабораторий и учреждений биологической промышленности. Разработан способ изучения иммунного статуса вакцинированных против ящура животных в РСК. Он позволяет специалистам на уровне областных ветлабораторий проводить мониторинг за иммунным состоянием стад в простой и достоверной реакции.

РПГА. Это простой, ускоренный, чувствительный метод идентификации ВЯ. По чувствительности реакция превосходит общепринятый метод типирования ВЯ в РСК в 8-16 раз. Сущность её заключается в том, что нагруженные АТ эритроциты агглютинируются при контакте с ящурным АГ гомологичного типа.

Типирование ВЯ. *Определение типа ВЯ методом перекрестного иммунитета.* Испытание перекрестного иммунитета на КРС с целью определения типовой принадлежности полевого штамма ВЯ проводится лишь в том случае, если по лабораторным тестам обнаруживается новый тип ВЯ, ранее не встречавшийся в стране. Определение типа ВЯ методом перекрестного иммунитета возможно и на морских свинках.

Штаммы считают идентичными, если вакцина предохраняет животных от развития генерализованного процесса при заражении используемыми штаммами. В случае иммунологического отличия штаммов вакцинированные животные, инфицированные гетерологичным штаммом, заболевают генерализованной формой ящура.

При определении в культуре леток типа ВЯ его относят к тому типу, сыворотка против которого предотвращает ЦПД. Разработан вариант универсальной эритроиммуноадсорбции (УЭИА), позволяющий определять АГ ВЯ в более высоких титрах, чем в РСК и РПГА.

ИФА. Высокоэффективен для выявления как 146S-, так и 12S-компонентов ВЯ. Этот метод в 500 раз чувствительнее РСК при исследовании проб афтозного эпителия. Установлена высокая степень специфичности и чувствительности ELISA для идентификации и типирования ИФА всех 7 серотипов в эпителиальных тканях. Установлена высокая чувствительность сэндвич-варианта ИФА (на основе щелочной фосфатазы), который по эффективности превосходит в 207-219 раз, а с хромогенными субстратами - в 4-64 раза.

ИФА может быть пригодной в системе лабораторной диагностики ящура при исследовании диагностических штаммов. Для выявления АГ ВЯ в ИФА можно использовать пробы крови, высушенной на фильтровальной бумаге. Первоначальный объем гепаринизированной крови равен 7,65 мкл.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика

Ретроспективная диагностика с целью определения типа и варианта ВЯ, вызвавшего в прошлом заболевание животных, основана на идентификации АТ в РПСК, РДП и РРИД, НРИФ, реакции серозащиты на микротазах и РН в культуре клеток.

Для достоверного выявления АТ и определения их типовой специфичности пробы сыворотки крови должны быть взяты не ранее 7 до момента появления у животных признаков везикулярного заболевания или проведения вакцинации. На исследование следует направлять 3-10 проб сыворотки от каждой возрастной группы. На партию проб сыворотки, направляемой для исследования, оформляют сопроводительный документ.

Выявление, идентификация типовой специфичности и количественное определение АТ к ВЯ в РРИД, РПСК, РНСК и ИИФ могут проводиться в условиях обычных ветеринарно-диагностических лабораторий и не требует создания более строгого санитарного режима, поскольку проводятся с неинфекционными материалами.

Для обнаружения ингибиторных (неполных) АТ применяют РНСК. Эти АТ отличаются высокой авидностью. Они формируют комплекс АГ-АТ, не адсорбирующий комплемент. Связываясь с АГ быстрее полных АТ, они блокируют его, но не связанный при этом комплемент в присутствии гемолитической сыворотки вызывает лизис эритроцитов. Ингибиторные АТ обнаружены сейчас при многих инфекциях, в том числе при ящуре. Данная реакция применяется для определения типов ВЯ по сывороткам переболевших животных, а также для обнаружения постинфекционных и поствакцинальных АТ.

Типирование ВЯ по сывороткам переболевших животных в РДП. В реакции используют: АГ из очищенного и концентрированного лапинизированного ВЯ типов О, А, С и др.; сыворотки от переболевших ящуром животных (не пригодны для исследования в РДП сыворотки крови животных, дважды переболевших ВЯ различных типов), типоспецифические сыворотки; агаровая среда.

Постановка реакции: в центральные лунки 7-ми 6-угольных систем на агаровых пластинках помещают соответствующие АГ типов О, А, С и др. В периферические лунки помещают пробы испытуемых и контрольных сывороток. Затем пластинки выдерживают во влажной камере при 37°C. Реакцию учитывают через 16, 24, 48 и 72 ч после постановки. Положительная реакция характеризуется образованием одной или двух четких линий преципитации между лункой с АГ и сывороткой. ВЯ относят к тому типу, с АГ которого испытуемая сыворотка дает положительную реакцию. В случае обнаружения в сыворотках преципитирующих АТ к 2 и более типам вирус относят к тому типу, с АГ которого испытуемые сыворотки дают наибольший процент положительных реакций.

РРИД. Сущность её заключается в формировании зоны специфической преципитации вирусных антигенов антителами, включенными в состав агарового геля. Реакция является типоспецифичной, позволяет провести исследования по типированию и количественному определению постинфекционных и поствакцинальных АТ.

Компоненты реакции: 1) антигены эталонные 7 типов ВЯ и других везикулярных болезней (ВВС 0-72 и Т-75, БЭС А-48 и С-72, ВС Индиана и Нью-Джерси); 2) сыворотки эталонные 7 типов ВЯ и других везикулярных болезней (ВВС 0-72 и Т-75, БЭС А-48 и С-72, ВФ Индиана и Нью-

Джерси); 3) агар белый или импортный фирм "Серва" или "Дифко", вода дистиллированная, БФР с рН 7,2-7,4. АТ, обнаруженные в испытуемой пробе сыворотки, относят к тому серотипу, с АГ которого они дали положительную реакцию. Их предельным титром считают максимальное разведение испытуемой сыворотки, в котором наблюдается положительная реакция. Титры сыворотки, полученные от вакцинированных животных, зависят от активности использованной вакцины, кратности и сроков ее применения и физиологических характеристик животного (возраст, вид). У 1-кратно вакцинированного против ящура взрослого КРС обычно титры через 30-90 дн после введения вакцины находятся в диапазоне 1:20-1:80, а после 2-кратной иммунизации в эти же сроки титр возрастает до 1:80-1:160. Титр у молодняка, как правило, в 2-3 раза ниже, чем у взрослых животных. У свиней и овец титры ниже, чем у КРС. После переболевания животных титры значительно выше, чем после вакцинации, и обычно превышают 1:160.

Встречный ИЭФ. Может быть с успехом использован для серотипирования ВЯ. Чувствительность его такая же, как и РДП, но учет результатов производится через 1,5 ч, тогда как реакция иммунодиффузии требует не менее 24 ч.

НИФ. При ящуре позволяет проводить дифференциацию АГ переболевших животных от вакцинированных. Выявление в НИФ специфического свечения свидетельствует о наличии в испытуемой сыворотке постинфекционных антител, т.е. о переболевании животного ящуром.

С помощью РНГА определяют напряженность поствакцинального иммунитета у КРС. Установлена корреляция результатов, полученных при РПГА и РН. С помощью монАТ в РН или ELISA определяют не нейтрализуемые варианты ВЯ. В зависимости от чувствительности к монАТ все варианты ВЯ разделены на 3 группы. Варианты 1-й группы имели мутации преимущественно в области 140-160 VP1; варианты 2-й и 3-й групп мутируют в области 204 VP1 и 70, 139, 195 VP3 соответственно. Определены две большие АГ зоны вируса: чувствительная и нечувствительная к трипсину (VP1 140-160 и VP3 соответственно).

Реакция серозащиты на мышатах-сосунах. Используется для определения типа ВЯ по сывороткам животных-реконвалесцентов. Для постановки реакции используют эталонные (адаптированные к организму 4-7-дн мышат-сосунов) штаммы БЯ различных типов. Штам-мы должны быть типоспецифическими и иметь титр на мышатах-сосунах не ниже $7 \lg$ и т.д.

ВЯ, вызвавший заболевание животных, относят к тому типу, при заражении которым привитые сывороткой мышата остались живы. Необходимым условием достоверной оценки реакции серозащиты является об-

зательная гибель контрольных мышат, которым введен вирус, в то время как контрольные мышата, которым вводили только испытуемую сыворотку, должны выжить.

РН в культуре клеток. Для постановки РН необходимо иметь 24 пробирки культур клеток. Отсутствие ЦПД в пробирках, в которые внесена смесь вируса с сывороткой, при четко выраженном ЦПД в контрольных пробирках, указывает на наличие в исследуемой сыворотке АТ против данного типа ВЯ. Специфичность ЦПД можно установить путем исследования в РСК культуральной жидкости, полученной из пробирок с выраженным ЦПД.

Дифференциальная диагностика. При дифференциальной диагностике ящура необходимо исключить ВС, ВЕС, БЭС, катаральную лихорадку овец. Для дифференциальной диагностики в лабораториях используют диагностические наборы, выпускаемые биологической промышленностью, для ящура и ВБС.

Иногда в материале от людей, подозреваемых в заболевании ящуром, выделяли возбудителя энтеровирусной инфекции человека - вирус Коксаки серотипа В. Вирус вызывал видимое ЦПД в перевиваемых культурах клеток в течение 24 ч, имея икосаэдрическую форму, размером 20-30 нм и вызывал гибель мышат при интрацеребральном заражении.

Лабораторная диагностика чумы крупного рогатого скота и мелких жвачных

Чума КРС - острая заразная вирусная болезнь, характеризующаяся высокой лихорадкой, катарально-геморрагическим, крупозно-дифтерическим воспалением слизистых оболочек. Распространена в Индии, странах Ближнего Востока, Египте и в 22 странах Центральной Африки. Вспышки болезни происходят в результате разноса её дикими буйволами и антилопами куду.

Инфекция в бывшем СССР не регистрировалась с 1928 г., в 1991 г. на границе с Монголией была зарегистрирована вспышка чумы среди яков в Тувинской республике. Сотрудники ВНИИВВиМ поставили лабораторный диагноз и ликвидировали эпизоотию с помощью вакцины.

Чума мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) - заболевание овец и коз, характеризующееся лихорадкой, диареей, язвенными поражениями слизистой оболочке ротовой полости, пневмонией. Характерные клинические признаки: тифоподобное состояние, некротический стоматит, поражение слизистых оболочек носа и глаз, профузная диарея, а в терминальных стадиях - вторичная бактериальная пневмония.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных, результатов лабораторных исследований и биопробы на восприимчивых животных. **Лабораторная диагностика** предусматривает: выделение вируса в культуре клеток и идентификацию его в РН, обнаружение вирусного АГ в органах и тканях от павших и вынужденно убитых животных в РСК, РДП, ВИЭОФ, РТНГА, РИГА, РИФ, ИФА; обнаружение специфических АТ у переболевших животных в РСК, РН, РДП, РТГА, ИФА. Разработан экспресс- метод диагностики болезни и видовой дифференциации морбилливирусов. Для этого используется ПЦР небольшого участка (430 п.н.) Р-гена с 389 по 821 н. в связи с тем, что нуклеотидная последовательность его 5'- и 3- концов является достаточно консервативной, что позволяет унифицировать праймеры для всех морбилливирусов. С другой стороны, участок, ограниченный этими праймерами, имеет достаточную степень вариабельности, что позволяет дифференцировать видовую принадлежность вируса. Нуклеотидная гомология амплифицированного участка Р-гена в парах ВЧ КРС - ВЧ МЖЖ, ВЧ КРС - ВЧС, ВЧ МЖЖ - ВЧС для исследованных штаммов составляет соответственно 66,67, 60,84 и 59,21%. Нуклеотидная гомология этого участка гена Р у вируса, выделенного от норок, с ВЧ КРС, ВЧП и ВЧ МЖЖ составила 60,84, 98,6 и 59,21% соответственно.

Выделение вируса. Материал для выделения вируса берут от больных (кровь, пунктат лимфоузлов) или убитых и павших животных (предлопаточные, мезентериальные лимфоузлы, селезенка). Патматериал берут в стерильную, плотно закрывающуюся посуду и доставляют в лабораторию нарочным в опечатанном термосе со льдом при строгом соблюдении мер предосторожности. Гепаринизированную кровь в стерильных условиях разливают по пробиркам и центрифугируют при 2500 мин⁻¹ 15-20 мин. Образовавшийся слой лейкоцитов между эритроцитами и плазмой в форме суспензии или пленки переносят пастеровской пипеткой в стерильный флакон. Пленку лейкоцитов отмывают от эритроцитов питательной средой и измельчают. Суспензию лейкоцитов в питательной среде используют для заражения культуры клеток. Заражать последнюю можно и цельной кровью. Вирус от больных животных можно выделить прижизненно из пунктата предлопаточных лимфоузлов в инкубационный период за сутки до начала лихорадки, а затем на всем протяжении болезни.

Лимфоузлы и селезенку можно хранить при -20°C в течение 60 дн, при -40°C - 6 мес, при 2-4°C - не более 7 дн. В кусочках размером 1-2 см, помещенных в 10%-ный NaCl, вирус сохраняется при 2°C 15-30 дн. Вирус, содержащая нитратная кровь в условиях комнатной температуры сохра-

няет активность 4-6 дн, при 5°C - 1 нед, при 0°C - 3-4 нед. В лиофильно высушенном материале, находящемся в ампулах под вакуумом при -20°C, вирус выживает более 5 лет, а при 2-4° С - не менее 1 года. При лиофилизации в качестве стабилизатора в суспензию добавляют 2% глюкозы и 5% пептона.

Заражение культуры клеток. Используют культуру клеток почки телят, которую после удаления ростовой среды заражают, нанося на слой клеток суспензию лейкоцитов исследуемого животного или суспензию его органов. Для адсорбции вируса культуры выдерживают 2 ч при 37° С, после чего инокулят отсасывают и вносят питательную среду с 2,5% телячьей инактивированной сыворотки. За культурой наблюдают 9-18 дн. На положительный результат указывает ЦПЭ. При отсутствии ЦПЭ делают слепой пассаж. Обычно при изоляции вируса таким методом затрачивается 20-25 дн. Идентификацию проводят в РН.

Заражение восприимчивых животных. Рекомендуют заражать молодняк КРС или телят буйволов кровью или 10-20%-ной суспензией лимфоузлов, полученной от больных животных в первые 5 дн после заболевания. Животным вводят подкожно 10 мл исследуемого материала. Это неразбавленная кровь или 10-20%-ная суспензия селезенки и лимфоузлов. На положительный результат указывает подъем температуры тела через 5 дн после заражения и последующее развитие типичной картины болезни. Смертность очень высокая - около 90%. В случае выздоровления животных дополнительным критерием специфичности течения болезни является рост уровня АТ.

Индикация и идентификация вируса

Вирусоскопия. ЭМ и ИЭМ в практических условиях не применяются. Из экспресс-методов диагностики наибольшего внимания заслуживает применение гибридационного зонда. С помощью его (точечной гибридизации) удастся дифференцировать два родственных морбилливируса - ВЧ КРС и ВЧ МЖЖ. Дифференциальная диагностика с помощью ДНК-зондов помогла идентифицировать вспышку чумы КРС среди популяции баранов в Индии.

Обнаружение специфических телец-включений. В зараженных культурах клеток в цитоплазме одиночных клеток и симпластов появляются сначала мелкие эозинофильные включения округлой формы со светлым ободком вокруг. С увеличением размеров симпластов растут объем и число цитоплазматических включений. Последние принимают многоугольную, продолговатую формы или форму кольца, охватывающего ядра симпластов; в цитоплазме располагается до 10 включений. Вслед за появлением цитоплазматических включений в инфицированных клет-

ках, в том числе и в симпластах, образуются внутриядерные оксифильные включения в количестве 2-4. Хроматиновая сеть ядра нарушается только вокруг включений. В некоторых случаях они занимают почти все ядро.

Биопроба. Идентифицировать ВЧ можно биопробой на иммунном и неиммунном скоте. Двух животных вакцинируют сухой вирусвакциной из шт. ЛТ (согласно утвержденному наставлению по применению препарата). Через 12 дн вакцинированных и двух невакцинированных животных заражают испытуемым материалом (суспензия селезенки, лимфоузлов и крови). При наличии у невакцинированных животных специфической температурной реакции, клинических признаков и отсутствии таковых у иммунных животных биопроба считается положительной. У забитых или павших животных обнаруживают специфический АГ в РСК и РДП.

РН. Применяют качественную и количественную РН. Для установления специфичности вызываемых вирусом поражений клеток проводят качественную РН, а для определения количества АТ в сыворотке иммунных животных - количественную.

РСК. Применяют для прижизненной и посмертной диагностики чумы с целью выявления АГ в гомогенатах лимфоузлов, селезенки, а также в инфицированной культуре клеток. При использовании РСК с целью идентификации вируса в культуре клеток в качестве специфического и контрольного АГ используют культуральную жидкость с зараженной и не зараженной культурами клеток.

Предложена упрощенная модификация РСК для определения растворимых АГ ВЧ КРС. АГ готовят из лимфоузлов или селезенки КРС, кроликов. Отмечено, что АГ, подвергнутые замораживанию - оттаиванию или ультразвуковой обработке, или осаждению сульфатом аммония или сульфатом натрия, более активны.

Гипериммунные сыворотки для идентификации вируса готовят по методу Скотта. Кровь берут от кроликов, иммунизированных ланцинозным, авинизированным или ЛТ-вирусами. Такие сыворотки нужны для обнаружения испытуемого АГ в РСК. Положительные сыворотки и соответствующие им контроли (нормальные сыворотки) получают от КРС в возрасте 12-18 мес. От них берут сыворотку до иммунизации (контрольная) и через 21 день после подкожной прививки 100 иммунизирующих доз (позитивная сыворотка). Такая сыворотка обычно в РН реагирует положительно в разведении 1:40 - 1:80. Полученную сыворотку сохраняют при -20°C и используют в РСК и РН с испытуемым АГ в течение 6 мес. Диагностическую сыворотку для РСК получают также от кроликов, инфицированных, а затем гипериммунизированных ВЧ КРС.

РДП. Реакцию ставят по методу Оухтерлони. Выявление преципитирующего АГ ВЧ в органах больного КРС является ценным диагностическим тестом, поскольку этот АГ регулярно появляется в лимфоузлах больных животных, начиная с 1-го дня повышения температуры. На 3-й день болезни он выявляется лишь у 50% больных. РДП, как и РСК, дает быстрый ответ (через 12-18 ч). Оптимальный срок для взятия проб - период от 4-6 дн после начала лихорадки до появления поражений во рту и диареи. Если нет животного в этой стадии болезни, рекомендуют брать образцы от погибшего животного. Для исследования пригоден материал даже от разлагающихся в течение 52 ч трупов, в качестве антител используют гипериммунные сыворотки кроликов и КРС.

Заведомо положительные и отрицательные АГ, приготовленные соответственно от больных и здоровых животных, используют в РДП одновременно. Положительную преципитирующую сыворотку получают от кроликов, иммунизированных инфицированными кроличьими тканями. РСК, РДП, РН и РИГА являются специфичными и эффективными лабораторными методами выявления АГ и идентификации ВЧ КРС. Однако данные ученых показали, что аттенуированные штаммы ВЧ КРС в естественных условиях не стимулируют продуцирование преципитирующего антигена в тканях животных. Это может быть характерным признаком отличия вакцинного штамма от эпизоотического. В Иране в 1982 г. в зонах, где скот был вакцинирован, у привитых животных не обнаруживали образование преципитирующего антигена. Поэтому в зонах систематической вакцинации скота против данной инфекции диагноз поставить сложно.

ВИЭОФ. Предложен вместо РДП для быстрой диагностики чумы КРС. В качестве испытуемого АГ служит суспензия селезенки и лимфоузлов толстого кишечника КРС и овец, полученных во время вспышки болезни. ВИЭОФ проводят в 0,8%-ной агарозе на вероналовом буферном растворе с рН 8,6. Гипериммунную сыворотку помещают в лунки вблизи анода, исследуемый материал - вблизи катода. Пластины помещают в горизонтальную ванночку с охлажденным вероналовым буфером. Линии преципитации образуются через 45 мин при силе тока 6 мА. ВИЭОФ при обнаружении АГ в тканях павших животных он оказался в 4-16 раз чувствительнее РДП и позволяет получить результат в течение 40 мин.

РТГА. Разработана для экспресс-диагностики чумы КРС. Если исследуемый материал содержит вирус, анти-ГА связываются, а их отсутствие или нехватку можно потом выявить, исследуя сыворотку в РТГА с использованием гемагглютинина ВК. При отсутствии вируса в исследуемом материале количество АТ остается неизменным. В этой реакции исполь-

роксидазной активности клеток лимфоузлов. Установлено, что в первые 7 нед после вакцинации у телят удавалось выявить АТ в 100% случаев всеми испытываемыми методами. В последующий период (с 8 до 12 нед после вакцинации) наиболее эффективным был метод ИФ (АТ выявлены у 84,0-100% телят). Менее чувствительными в этот период были методы ИФА и ВИЭОФ (соответственно АТ обнаружены у 23-77,7 и 7,7-77,7% телят). Для определения АТ к ВЧ КРС в Индии успешно применяют метод иммуно-ELISA. Показаны преимущества конкурентного ЕБЗА со специфическими монАТ над непрямым ELISA.

Реакция радиального гемолиза (РРГ). Рекомендована для обнаружения АТ к ВЧ КРС. В качестве АГ используют суспензию лимфоузлов от зараженных телят. Реакцию ставят на пластинках, куда вносят 2-4 мл 1%-ной агарозы с 0,3 мл конъюгированных с АГ бараньих эритроцитов, обработанных хлоридом хрома и 0,3 мл неразведенного комплемента.

Дифференциальная диагностика. Проводится по данным исследования вирусосодержащего материала (гибридизационным тестом, биопробой, серологическими реакциями с видоспецифической сывороткой). В связи с тем, что в некоторых странах, в том числе и в европейских, чума КРС давно ликвидирована, при случайном заносе она может быть ошибочно диагностирована как вирусная диарея или злокачественная катаральная горячка, что необходимо иметь в виду при дифференциальной диагностике чумы.

Лабораторная диагностика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота

Аденовирусная инфекция КРС (АВИ КРС, аденовирусная пневмония телят, аденовирусный пневмоэнтерит) у телят протекает остро и характеризуется поражением органов дыхания, пищеварения и конъюнктивитами. КРС часто является носителем латентных аденовирусов (АВ) КРС, вызывающих бессимптомные инфекции, патогенез и роль которых в общей патологии животных остается неясной. АВИ КРС регистрируется во многих странах мира.

Поставить диагноз на АВ по эпизоотологическим данным, клиническим и патологоанатомическим признакам нельзя, так как сходную патологию могут вызывать вирусы других таксономических групп: парагриппа-3, диареи, неориккетсии и др. Поэтому при постановке диагноза решающее значение имеют лабораторные исследования.

Лабораторная диагностика АВИ КРС заключается в следующем: обнаружение АГ в патологическом материале (мазках, отпечатках, сре-

зах), полученном от больных животных, в ИФ и РСК; выделение возбудителя в культуре клеток ТБ, ПЭК или ЛЭК и его групповая идентификация в серологических реакциях: (РСК, РДП и РИФ); выявление АТ в сыворотке крови больных и переболевших животных (ретроспективная диагностика) в серологических реакциях: (РСК, РИГА, РДП и ELISA).

Лабораторную диагностику АВИ проводят с использованием соответствующего набора диагностикумов, выпускаемого биологической промышленностью, и параллельно с исследованием материала на ПГ-3, РС-инфекцию, ИРТ и ВД-БС. Показана возможность тестирования АВИ с помощью ДНК-зонда. Это, по существу, экспресс-метод лабораторной диагностики АВИ, который можно с успехом применять при массовом обследовании телят в хозяйствах промышленного типа. Наиболее четкую картину гибридизации наблюдали на 5-7-е сут в пробах смывов из носа. Это соответствует динамике накопления вируса в организме зараженных животных.

Серологическая идентификация. Идентификацию выделенных шт. вируса проводят в ИФ, РСК и РДП. Ввиду того, что КС и преципитирующий АГ вирусов 1-й подгруппы (1, 2 и 3) отличны от АГ 2-й подгруппы (4, 5, 6 и др.), РИФ, РСК и РДП ставят с 2-мя антисыворотками, соответствующим 2 подгруппам. Препараты считаются положительными при наличии флюоресценции в 10% клеток, зараженных патологическим материалом, при ее отсутствии в контрольной (незараженной) культуре клеток. Срок выявления АВ в культуре клеток зависит от заражающей дозы и колеблется в пределах 20-96 ч. Показана возможность применения сыворотки к гексону 1-го типа АВ человека для обнаружения АВ КРС. Близкое АГ родство АВ 1-й подгруппы КРС и человека может служить основанием для создания на основе гексона единого диагностикума для ИФ-выявления данных АВ.

Исследование в данном методе антигексоновых сывороток к АВ позволяет повысить его эффективность в 3 раза в сравнении с использованием антисыворотки к цельному вирусу.

НИФ. Для экспресс-диагностики АВИ КРС в клинических образцах разработан вариант непрямого ИФ клеточных культур на покровных стеклах, зараженных АВ, с помощью монАТ с групповой специфичностью гексонов всех АВ млекопитающих.

РСК. С ее помощью можно успешно обнаруживать и идентифицировать выделенные полевые шт. АВ. РСК ставят по общепринятой методике в макро- или микровариантах. В качестве испытуемого АГ используют органы и ткани больных животных, а также культуральный вирус, полу-

ченный после заражения культуры клеток. Разработаны методики приготовления АГ и схемы иммунизации для получения (1:1280) сывороток.

РДП. Ставят в чашках Петри в слое застывшего агара. Как и РСК, его используют для идентификации вновь выделенных шт. АВ с гипериммунными сыворотками кроликов (сыворотки морских свинок для этой цели не применяют). Шт. серотипов 1-й подгруппы (Bovine 10, Bovine 19, WBR 1) в РДП прекрасно реагируют между собой, тогда как шт. 2-ой подгруппы (ТНТ/62, В4/65 и 671/130) проявляют низкую активность в РДП даже с гомологичными сыворотками. Однако, если использовать концентрированные АГ этих шт., с помощью РДП удается четко выявить перекрестную АГ-связь между ними. В качестве испытуемого АГ используют культуральную вирусосодержащую жидкость, которую необходимо концентрировать.

РТНГА. Рекомендуют для идентификации выделенного в культуре клеток вируса. При положительных реакциях РСК и РДП устанавливают принадлежность АВ к 1-й или 2-й подгруппе АВ КРС и проводят его типирование с типоспецифическими сыворотками к АВ КРС. Типирование бычьих АВ осуществляют в научно-исследовательских учреждениях, имеющих типоспецифические сыворотки и вирусы для РН.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Необходимо иметь в виду, что при положительном результате выделения и идентификации АВИ для окончательной постановки диагноза необходимо исследовать парные сыворотки больного животного с выделенным вирусом. Если при помощи РИГА и РСК выявлено 4-кратное и более повышение титра АТ к выделенному вирусу во 2-й сыворотке больного по сравнению с 1-й, ставят диагноз. В реакциях используют парные пробы сывороток, взятые в первые 2-3 сут болезни и через 14-30 дн. У заболевших животных вначале выявляются АТ в РИГА, затем - в РН и РТГА и уже через 1-1,5 нед - в РДП и РСК. КС и ПА сохраняются у животных-реконвалесцентов до 4 мес. У экспериментально заражённых телят ИНА обнаруживают на 5-й дн после заражения в титре $2,2 \log_2$ и на 10-й дн - в титре $4-4,3 \log_2$.

ELISA. Установлена в 100 раз большая его чувствительность для выявления АТ к гек-соновому АГ АВ по сравнению с РСК. Были получены гипериммунные, высокоактивные и специфические сыворотки против гексонов АВ 1-й подгруппы (BAV1 и BAV3) и 2-й подгруппы (BAV7), которые были рекомендованы при разработке иммуноферментного набора для серодиагностики АВИ КРС. Для диагностики АВИ биопромышленность выпускает 2 диагностических набора для выявления и идентификации вируса и АТ методами ИФ, РСК, РДП и РНГА.

Дифференциальная диагностика. Клинико-эпизоотологическая диагностика АВИ затруднена из-за сходства её с ПГ-3, ВД-БС, ИРТ, РС-инфекцией, хламидиозом и другими болезнями, поражающими респираторно-кишечный тракт животных. Кроме того АВИ часто протекает в ассоциации с вышеуказанными болезнями. Поэтому только лабораторные исследования, проводимые с использованием диагностических наборов к указанным болезням, помогут правильно поставить диагноз.

Лабораторная диагностика ортомиксовирусных инфекций

Вирусы имеют особое сродство к мукополисахаридам и гликопротеидам. Имеют сходные биологические свойства: способность агглютинировать эритроциты, наличие у некоторых представителей нейраминидазы, легкость культивирования в КЭ и тропизм к органам дыхания. Вирусы имеют принципиальные различия по внутриклеточной локализации АГ, по чувствительности к препаратам, затрагивающим синтез белков и нуклеиновых кислот и по генетическим свойствам. С 1980 г. принята следующая номенклатура субъединиц вирусов гриппа рода А, включающая вирусы человека, лошади, свиньи, кур, уток, индюков и некоторых видов птиц.

Таблица 105 - Номенклатура субъединиц вирусов гриппа рода А

Субъединица	Обозначение	Характерный штамм
НА	Г1	А/WS/33; А/FM/1/47; А/свинья/Айова15/30
	Г2	А/Сингапур/1/68
	Г3	А/Тонконг/1/68; А/лошадь/Майами1/63; А/утка/Украина1/61
	Г4	А/утка/Чехословакия/56
	Г5	А/крячка/Ю. Африка/61
	Г6	А/индюк/Массачусетс 3440/65
	Г7	А/лошадь/Прага1/56; А/FPV/Dutch/27
	Г8	А/индюк/Онтарио 6118/68
	Г9	А/индюк/Висконсин/66
	Г10	А/дышленок/Германия/49
	Г11 Г12	А/утка/Англия/56; А/утка/Альберта 60/76
НА	Н1	А/WS/33; А/PR/8/34
	Н2	А/Сингапур/1/57
	Н3	А/крячка/Ю. Африка/61; А/индюк/Англия/63
	Н4	А/индюк/Онтарио 6118/68
	Н5	А/буревестник/Австралия/72
	Н6	А/утка/Англия/56
	Н7	А/лошадь/Прага1/56
	Н8	А/лошадь/Майами 1/63
	Н9	А/утка/Мемфис 546/74

Согласно Международной номенклатуре любой штамм вируса гриппа рода А обозначается по следующей схеме: род/источник изоляции/место изоляции/ собственный номер изолята/год изоляции/формула вида - серотипы ГА и нейраминидазы. Для штаммов, изолированных от человека, источник изоляции не пишется; для всех других штаммов год изоляции обозначается 2-мя последними цифрами. Семейство ортомиксовирусов (от греч. orthos -правильный, прямой и муха - слизь) включает три рода вирусы гриппа А и В, вирусы гриппа С и тоготоподобные вирусы.

Типичным представителем рода вирусов гриппа А и В является вирус гриппа А/PR/8/34(Н1N1). Вирионы представляют собой частицы неморфной, чаще округлой формы, диаметром 80-120 нм. Они состоят из фрагментированного нуклеокапсида спиральной симметрии диаметром 9-15 нм и липопротеидной оболочки, на поверхности которой имеются выступы длиной 10,0-13,5 нм. Мол. м. вирионов 250 МД,

Геном состоит из 8-и неодинаковых по размеру (900-2350 нуклеотидов) фрагментов 1-спиральной минус-РНК. Вирионная РНК ортомиксовирусов не обладает инфекционностью. В вирионах обнаружено 7 белков, 4 из которых (PB1, PB2, PA, NP) связаны с нуклеокапсидом, а 3 (НА, NA, М1) входят в состав липопротеидной оболочки, причем 2 из них (НА и NA) являются гликопротеинами. Гликопротеины образуют 2 вида выступов наружной оболочки вирионов. Выступы 1-го вида образованы семагглютинином (НА) с мол.м. 75-80 кД (около 500 а.к.). Каждый выступ

состоит из 3-х молекул НА, которые организованы в палочкообразную структуру. Каждая молекула НА в свою очередь состоит из 2-х субъединиц (НА 1-330 а.к., НА 2-22 - а.к.), соединенных дисульфидной связью. НА ответственен за адсорбцию и проникновение вирионов в клетку и ГА-активность вируса. АГ к НА нейтрализуют инфекционность вируса и подавляют его ГА-активность. Выступы 2-го типа образованы нейраминидазой (NA) с мол.м. 60-70 кД (450-470 а.к.). Все подтипы НА и NA вируса гриппа А обозначают последовательными номерами независимо от происхождения вируса. Установлено 14 АГ подтипов по НА и 9 подтипов по NA. Вирус гриппа В не подразделяют на АГ подтипы. Синтез вирусспецифических белков происходит в цитоплазме клетки.

В естественных условиях вирус гриппа А поражает человека, свиней, лошадей и птиц, а вирус гриппа В - только человека. Передаются вирусы аэрогенным путем.

Типичный представитель рода вирусов гриппа С - вирус гриппа С/Taylor/1233/47. Вирус гриппа С обнаружен у человека и свиней.

В состав рода тоготоподобные вирусы входят вирусы Тогото (прототипный вирус) и Дори, переносимые клещами и иногда поражающие человека. Морфологически они сходны с другими ортомиксовирусами и содержат 6-7 фрагментов 1-спиральной минус-РНК.

Грипп кур (классическая чума птиц, грипп птиц А1, подтип 7, эксудативный тиф) - острая контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся общим угнетением, отеками, поражением органов дыхания и пищеварения.

В настоящее время грипп птиц в форме КЧП регистрируется редко. Чаще инфекция проявляется эпизоотическими вспышками, вызываемыми штаммами других АГ подтипов с более низкой, чем вирус КЧП, патогенностью. Такие вспышки зарегистрированы в США, Италии, Англии, ФРГ, СССР и других странах. Вирусы гриппа птиц (ВГП) выделены от кур, индюков, уток, перепёлок, фазанов, глухарей, длиннохвостых попугаев, цесарок и др.

Антигенная вариабельность и родство. В настоящее время вирусы гриппа А птиц на основании их поверхностных АГ - ГА (Н) и нейраминидазы (N) - разделены на 13 по Н-АГ и 9 вариантов по N-АГ (табл. 106). Штаммоспецифические АГ-связи определяются с помощью: РТГА - для определения сходства по ГА; РТНА - для определения сходства или различия по НА; теста двойной диффузии - для определения сходства ГА и НА. У штаммов вируса гриппа А птиц, имеющих АГ характеристику H1N1, выявлено не менее 4 АГ детерминант нейраминидазы. Четкие раз-

б) диагностический набор для идентификации вируса НБ и Ш (актуального эпизоотического типа).

Выделение вируса. *Взятие и подготовка материала.* В качестве вирусосодержащего материала используют селезенку, головной мозг, синусы, трахею, лёгкие, воздухоносные мешки, кишечник от больной птицы или свежих трупов. Материал в лабораторию доставляют в замороженном виде в термосе со льдом. Инфекционные титры вируса в назальных смывах бывают максимальными через 2-4 дня после заражения птицы и достигают 10^5 - 10^7 ЭИД₅₀/мл смыва. Изолировать вирусы из клоачных смывов удаётся чаще всего на 5-8-й день после экспериментального заражения птицы.

Заражение куриных эмбрионов. Испытуемую суспензию инокулируют 9-10-дн КЭ (не менее 5 на одну пробу) в аллантаоисную или амниотическую (лучше) полости общепринятым методом и инкубируют в течение 72 ч. Экстраэмбриональную жидкость каждого эмбриона отдельно проверяют на ГА-активность капельной РГА с 1 %-ной взвесью эритроцитов кур. При отсутствии положительной РГА проводят еще 3-5 слепых пассажей, используя для заражения КЭ эмбриональную жидкость предыдущего пассажа. Если титры ГА низкие, проводят таким же образом еще 2-3 дополнительных пассажа. Проба испытуемого материала считается отрицательной, если в 3-5 слепых пассажах не будет обнаружено ГА и патогенного действия вируса (гибели КЭ). При положительной РГА проводят идентификацию выделенного вируса.

Заражение культуры клеток. Вирус после 2-5 пассажей хорошо разводится в культуре фибробластов КЭ. ЦПД обычно проявляется через 24-48 ч (в зависимости от дозы и адаптации). Присутствие его устанавливают при помощи РГА и РГАд. Предложен ускоренный метод титрования инфекционности вируса гриппа в культуре клеток путем подсчета гемадсорбирующих клеток. Метод позволяет получить результат через 8 ч после заражения.

Биопроба на цыплятах. Испытуемую суспензию инокулируют цыплятам 2-3-месячного возраста. Летальную инфекцию у цыплят можно вызвать при любом методе заражения (подкожно, внутримышечно, в мозг, конъюнктиву) подтипами А1, А7 и А5. Заражение per os с кормом и водой удается непостоянно, лишь в случае высокой патогенности эпизоотического изолята гриппа. Зараженные цыплята, как правило, гибнут через 36-72 ч в зависимости от дозы и вирулентности возбудителя.

Индикация и идентификация вируса. Для этой цели широко используют методы ИФ, цитоскопию, биопробу (на птице и КЭ) и серологическую идентификацию. С помощью монАТ можно идентифицировать и

только разные группы вирусов (ВГП и ПМВ), но и определять подтипы ВГП и серотипы ПМВ птиц, и даже штаммы внутри одного подтипа, а также локализацию компонентов вириона в зараженных клетках (МРВГП - МА клонов 1С6, 5С10, N:2 - МА клоны 303 и т.д.). На основе монАТ можно готовить диагностические препараты для выявления АГ и АТ в РТГА, НИФ, РСК, ИФА и др. реакциях.

РГА. Для индикации вируса в патологическом материале можно использовать РГА. Надосадочную жидкость после центрифугирования суспензии проб из органов и тканей больной птицы, а также смывов исследуют в капельной или пробирочной РГА с 1%-ной суспензией эритроцитов кур или 0,5%-ной взвесью эритроцитов морской свинки. Реакцию учитывают через 20 мин и 1 ч. Специфичность определяют в РТГА.

Цитоскопия. Метод заключается в исследовании тканевых элементов в отпечатках, полученных со слизистой оболочки верхних дыхательных путей (лучше) и органов. Препараты высушивают и окрашивают одним из методов: по Романовскому, Пигаревскому, Быковскому и т. п. При окраске по Быковскому и Пигаревскому в цитоплазме клеток при гриппе обычно обнаруживают тельца-включения ярко-красного цвета; при окраске по Романовскому - фиолетового цвета. Внутриклеточные включения находят не только в клетках цилиндрического эпителия, но и в цитоплазме макрофагов, лейкоцитов и плоского эпителия. В настоящее время этот принцип исследования используется с применением люминесцентной микроскопии.

Метод простого флюорохромирования. На мазки-отпечатки из органов и смывов наносят 1-2 капли рабочего раствора акридина оранжевого (1:10000), покрывают покровным стеклом и свежий препарат (в течение 10 мин после приготовления) рассматривают в люминесцентном микроскопе. Ядра клеток выявляются по изумрудно-зеленому свечению, РНК плазмы клеток - в виде не резко ограниченных гранул красного или оранжевого цвета. В препарате, имеющем вирус гриппа, выявляются включения в виде четко отграниченных ярко-красных гранул в цитоплазме клеток.

Серологическая идентификация

Для идентификации гриппа млекопитающих и птиц наиболее простым и высоко достоверным методом является РТГА. РН - штаммоспецифическая и также высоко достоверная, но используется в диагностике значительно реже. Ее обычно применяют при некоторых неясных и спорных случаях.

Реакция связывания комплемента. Используют для определения типоспецифичности выделенного вируса, когда в РТГА не удастся уста-

новить родственных связей между выделенным и эталонными штаммами вируса гриппа по антисывороткам к ним. В этом случае в РСК с эталонными иммунными сыворотками против вирусов гриппа типов А, В и С устанавливают типовую принадлежность штамма.

В последнее время для типирования нейраминидазы вируса начали применять РТНА, но в диагностической ветеринарной практике она пока еще не применяется. Ее используют, в основном, для изучения АГ связей различных штаммов вируса гриппа.

Реакция торможения гемагглютинации. Идентификацию испытуемого вируса проводят с набором эталонных штаммоспецифических гриппозных сывороток к его АГ вариантам. Для дифференциации в реакцию вводят сыворотку против вируса НВ. РТГА ставят микро- или макрометодом по общепринятой методике.

Иммуноферментный метод. Может быть использована как экспресс-метод диагностики гриппа птиц. Препараты готовят непосредственно ex tempore от убитой больной или свежелавшей птицы. Прямой метод ИФ позволяет определять АГ ВГП в мазках-отпечатках тканей птиц, идентифицировать АГ данного вируса из различных тканей организма, инкубационных яиц, печени зараженных эмбрионов и культур клеток фибробластов; выявить вирусный АГ даже в тех случаях, когда вирус из пораженных тканей выделить не удается.

В ветеринарной диагностической практике для идентификации выделенного вируса РДП не используют, так как необходимы концентрированные и очищенные АГ. В основном применяют ее для изучения АГ структуры вирусов гриппа. Разработаны наборы для ИФА с монАТ, непосредственно обнаруживающие ГА, нуклеокапсидный или матриксный белки вируса гриппа. Идентификацию вирусспецифической нуклеиновой последовательности предлагается осуществлять ПЦР с 2-мя типами праймеров (на основе генов неструктурного белка и ГА). Тест стандартизован для определения АТ к ВГП в сыворотке крови у индеек.

Минимальные АГ различия между вариантами и родительским вирусом выявлялись только монАТ, продуцируемыми клетками гибридомы PEG-1 или фрагментами селезенки гипериммунных животных. МонАТ дают возможность точно проследить филогенетические взаимоотношения между вирусными штаммами в составе субтипа, а в сочетании с методами пептидного картирования и определения последовательности а.к. - выявить молекулярную структуру АГ участка ГА.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Обнаружение анти-ГА, ВНА и КСА - надежный признак протекающей или уже прошедшей инфекции ГП в стаде.

РТГА. Исследование парных сывороток проводят с диагностической целью при атипичном, часто вялом течении болезни с поражением органов дыхания. Сыворотку от диких птиц на присутствие противогриппозных АТ исследуют при изучении роли перелетных птиц в распространении гриппа. Обязательным условием для ретроспективной диагностики ГП является одновременное исследование парных сывороток, так как для диагностических целей имеет значение сравнительный титр АТ против вирусов различных серологических подтипов в 1-й и 2-й пробах сыворотки. Первую пробу сыворотки хранят при 4°C или в замороженном виде. Обе пробы исследуют одновременно. Перед постановкой реакций сыворотки прогревают при 60°C 30 мин, а затем освобождают от термостабильных ингибиторов, используя CO₂, KO₄ и др. методы. Если титр АТ во 2-й пробе сыворотки (через 10-14 дн после заболевания) превышает не менее чем в 4 раза титр АТ к тому же типу вируса в 1-й пробе, то РТГА считается положительной, подтверждающей диагноз гриппа птиц. При постановке РТГА с парными сыворотками больных птиц необходимо использовать не только набор эталонных штаммов (например, к вирусам A/Fowl plague, A/Chick/Scotland, A/Turkey, A/Duck), но и местные штаммы того птицеводства, где зарегистрирована болезнь. При анализе результатов РТГА необходимо указывать, сколько сывороток было с низким, средним и высоким титром к тому или иному штамму вируса гриппа. В ряде случаев вместо индивидуальных сывороток показатели иммунитета стада (после переболевания или прививки живой вакциной) можно изучить на сыворотках, полученных от нескольких птиц. В этих случаях испытуемые сыворотки, взятые от отдельных птиц, нужно соединять в равных объемах. На протяжении опыта (120 дн после реконвалесценции) в сыворотках кур находили анти-ГА: до 75-го дня титры сохранялись примерно на одном уровне (5-5,8 log₂), а в дальнейшем снижались (до 4,4-4,6 log₂).

РСК применяют для обнаружения АГ и АТ в целях ранней и ретроспективной диагностики гриппа. Ставят с аллантоисными жидкостями КЭ или с очищенными диагностикумами. РДП широкого применения не нашла, так как необходимы высокие концентрации чистых АГ. Среди исследователей нет единого мнения о чувствительности этой реакции. Некоторые авторы указывают, что чувствительность РДП сравнительно невысока, поскольку достоверные положительные результаты получали лишь при исследовании сывороток с титром АТ в РТГА 1:80 и выше.

Реакция радиального гемолиза. В настоящее время используется для сероэпидемиологических исследований и при оценке эффективности противогриппозных вакцин. РРГ с ВГ А обладает выраженной штаммовой

специфичностью: диаметр зон гемолиза с гомологичными АГ при исследовании сывороток хорьков, зараженных 6-ю различными вирусами, были в 1,5-3 раза больше, чем с гетерологичными. При правильном подборе штамма РРГ может быть с успехом использована для определения антиГА.

Показано хорошее совпадение результатов титрования АТ в ELISA, РСК и ИФ. Однако в ELISA значительно выше (титр 1:481-1:1520), чем в РСК и ИФ. Сенсибилизацию лунок панелей проводят РНК-АГ вируса гриппа А. Предложен новый метод приготовления АТ эритроцитарных диагностикумов к вирусам гриппа, которые с успехом могут быть изготовлены на основе любых штаммов вируса гриппа. Они позволяют определять типовую принадлежность эпизоотических и межэпизоотических штаммов ВГП, свиней и лошадей. В практической работе врачу ветеринарной лаборатории, возможно, придется встретиться не только с гриппом кур и уток, но и с гриппом индеек.

Таблица 107 - Лабораторные методы дифференциации гриппа и ньюкаслской болезни птиц

Маркеры	Вирус (ВГМП)	КМП	Вирус НБ
Экспресс-диагностика (РГА):			
взрослых кур	+	-	-
цыплят	+	+	-
РГА с эритроцитами:			
уток	+	+	-
вешаки	+	-	-
кошки	+	-	-
Чувствительность ГА к действию азотистой кислоты	+	-	-
Адсорбция ГА на формалинизированных эритроцитах, предварительно обработанных:			
<i>вирусом КЧП</i>	-	-	-
<i>вирусом НБ</i>	+	-	-
Лабораторная диагностика:			
Выделение вируса на РЭ	-	-	-
<i>Сроки жизни зародков:</i>			
зайчаток (зависит от дозы)	До 30 ч	Более	48 ч
птицы	48 ч	96 ч	
Патогенность для мышей -	-	-	-
голубей -	-	-	-
Титр ГА в ХАО титр ГА в аллантоической жидкости	>1	-	-
Чувствительность к фетальному действию метиленовой сини	-	-	-

Обозначения (+) - положительные результаты,
(-) - отрицательные результаты

Умея диагностировать грипп кур и уток, имея набор диагностикумов, врач лаборатории при необходимости сможет поставить диагноз при гриппозной инфекции индеек.

При респираторных вирусных болезнях КРС, свиней и птиц (грипп, парагрипп, РС-инфекция) разработан направленный тест. Это новый иммуноферментный мембранный тест быстрого обнаружения вирусов гриппа в носоглоточных смывах. Чувствительность направленного метода Flu-A составляла 90%. С помощью этого теста более легко обнаруживается клеточно-ассоциированный АГ, присутствующий в клинических пробах, чем свободный вирус. С помощью Flu-A теста удалось обнаружить вирусы гриппа А птиц (субтипы ГА Н3 и Н6) и свиней (Н1N1) в клоачных смывах и гомогенатах.

Дифференциальная диагностика. КЧП (H7N1) и другие формы гриппа птиц следует отличать от НБ, ИБ, ИЛТ, гемофилеза и респираторного микоплазмоза. Для идентификации вирусов НБ и КЧП используется диагностический набор.

В сомнительных случаях для дифференциального диагноза ставят РН на КЭ и заражают птиц, иммунных к вирусу НБ.

Лабораторная диагностика гриппа свиней

Грипп свиней (инфлюэнца свиней, энзоотическая бронхопневмония) - высоко контагиозная, остро протекающая болезнь, возникающая в холодное время года и характеризующаяся внезапным началом, резко выраженной лихорадкой, общей слабостью и поражением органов дыхания. Вирус гриппа свиней (ВГС) может вызвать заболевание людей и, наоборот, установлена возможность заражения свиней вирусом гриппа человека.

Болезнь впервые диагностирована в США в 1918 г. во время пандемии гриппа людей. Встречается во многих странах Европы и Америки, зарегистрирована и в бывшем СССР В отдельных хозяйствах причиняет большой экономический ущерб. Описана вспышка гриппа среди 115 свиноматок, вызванная "новым типом" вируса гриппа Н3N2, который появился в Дании в 1990 г. Степень опоросов сократилась с 90 до 43% - через 14 дн после появления заболевания. Снизилось количество новорожденных поросят.

Выделение вируса. *Выделение вируса на лабораторных животных.* Используют хорьков, белых крыс, но чаще белых мышей. В качестве исходного материала для выделения вируса используют кусочки лёгкого, трахеи, бронхиальный экссудат, носовые смывы от больных свиней.

Мышей заражают интразально под эфирным наркозом и в течение 5-7 дн наблюдают за ними, обращая внимание на общее состояние живот-

ных. Если животные не гибнут, их убивают. На вскрытии отмечают изменения в лёгких. Затем проводят ещё 3-4 пассажа. По мере адаптации вирулентность вируса для белых мышей значительно возрастает, они гибнут на 4-7-й, а иногда на 14-й день после заражения.

Выделение вируса на КЭ. Испытуемый материал инокулируют в амниотическую или перитонеальную полости 9-12-сут КЭ, которые после заражения инкубируют 48-72 ч, иногда до 96 ч при температуре 37°C. Для выделения вируса обычно проводят 2-3 слепых пассажа.

Выделение вируса в культуре клеток. Культура клеток почек поросёнка - универсальная биологическая система, применяя которую можно выделить вирус от больных свиней. Для быстрой индикации вируса гриппа в 1-слойных культурах почечного эпителия поросят используют РАД с эритроцитами курицы, морской свинки или 0-группы человека. ГАД, положительная РГА, а также дегенеративные изменения клеток указывают на присутствие вируса в исследуемом материале. Вирус, вызвавший явление ГАД, должен адаптироваться к КЭ и вызывать накопление ГА.

Риноцитоскопия. Со слизистой оболочки носа делают мазки-отпечатки. Положительный диагноз ставят на основании обнаружения в отпечатке в первые 1-3 дн болезни большого количества клеток цилиндрического эпителия. Позднее содержание цилиндрических клеток в мазке уменьшается. Вопрос о диагностическом значении цитоплазматических включений при гриппе свиней неясен; в литературе нет достаточно обоснованных сообщений.

Обнаружение вируса в РГА. При постановке РГА обычно используют эритроциты кур или морской свинки. Берут 0,5 мл носового смыва, добавляют 0,5 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов, тщательно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 1-2 ч. Результаты реакции учитывают общепринятым методом. Чувствительность реакции можно повысить, увеличив объем испытуемых смывов. РГА со смывами используют только при массовом заболевании гриппом, так как процент специфических реакций не превышает 30.

Серологическая идентификация

РСК. Все ранее выделенные эпизоотические штаммы ВГС относятся к типу А. Однако это не исключает возможности обнаружения вируса гриппа иной типовой принадлежности, поэтому тип выделенных вирусов определяют в РСК. Данную реакцию используют при выделении вируса, идентификация которого не удастся с помощью РТГА. В этом случае в РСК с эталонными иммунными сыворотками против гриппа типов А, В и С устанавливают типовую принадлежность выделенного вируса. В Ленинградском институте им. Пастера предложена усовершенствованная

методика РСК для идентификации вирусов гриппа, в которой используют иммунные типовые сыворотки морских свинок (коммерческие лошадиные типоспецифические сыворотки для этой цели непригодны). В РСК применяют две дозы комплемента. Использование в реакции сыворотки морской свинки и аллантоисного АГ не требует титрования комплемента в их присутствии, так как они не обладают антикомплемментарными свойствами. При идентификации вирусов гриппа РСК не заменяет РТГА, позволяя установить типовую принадлежность штаммов, РСК не вскрывает различий между ними.

ИФ. ИФ (прямой и непрямой варианты) используют для быстрого обнаружения АГ вируса в патологическом материале и в биологических системах, в которых проводят выделение вируса (КЭ, лабораторные животные, культура клеток). Локализация вирусного АГ характеризуется вначале нежной диффузной флюоресценцией в ядре, затем в перинуклеарной зоне. Постепенно мелкогранулярное свечение распространяется по всей цитоплазме, а внутриядерное - ослабевает. Методика постановки ИФ общепринятая.

РТГА. Идентификацию выделенного на КЭ вируса проводят с набором штаммоспецифических сывороток с использованием эритроцитов кур. РТГА ставят по общепринятой методике. Сыворотка, задерживающая РГА до разведения не меньше четверти ее гомологичного титра, соответствует типу вируса. Например, РТГА со штаммами:

Сыворотка к вирусу гриппа	Гомологичный титр	шт. №2		шт. №3		шт. №4	
		титр	отношен	титр	отношен	титр	отношен
Шт. №1 типа А	1:320	1:80	0,25	1:160	0,5	1:40	0,125

В данном примере штаммы № 2 и 3 принадлежат к БГС типа А и родственны штамму № 1, так как сыворотка к этому штамму нейтрализует ГА активность штаммов 2 и 3 соответственно до 0,25 и 0,5 своего гомологичного титра (1:320).

РН. Ставят, главным образом, в КЭ, где хорошо размножаются вирусы гриппа. Применение ее на мышах весьма ограничено ввиду того, что немногие штаммы вируса гриппа патогенны для мышей. РН может быть поставлена в 2-х вариантах по общепринятой методике.

ИФА. Вирусспецифические АГ выявлялись в ИФА в цитоплазме ФКЭ и клеток эпителия дыхательного тракта мышей в виде гранул желтого цвета. Установлена высокая чувствительность метода. Недавно иммуноферментная методика модифицирована. Стало возможным использовать ее для выявления ГА вируса гриппа как в составе вирусных частиц, так и в изолированном из вирионов состоянии. Модификация основана на прямой адсорбции вирионов гриппа и вирусспецифических белков на полистироловых гранулах. Определены параметры тест-системы для реали-

зации ее максимальной чувствительности. Эффективность выявления ГА зависит от сорбционных свойств ГА содержащих вирусных препаратов. Для интактных вирионов гриппа максимальная чувствительность тест-системы равна 1-2 нг ГА в образце. Разработан экспресс-вариант методики, позволяющий выявить 30-40 нг ГА в образце при полной продолжительности анализа около 4 ч.

Метод молекулярной гибридизации. Применяют для анализа носоглоточных смывов, полученных от заболевших в период эпидемиологического подъема заболеваемости гриппом, что позволяет рекомендовать его для использования в эпизоотологическом анализе. С помощью РТГА с использованием наборов монАТ, метода ПЦР и секвенирования ее продуктов, продемонстрирована высокая система АГ- и генетической консервативности ГА изолятов ВГС, полученных в 1986-1991 гг.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. При ретроспективной диагностике важно выяснить, отмечалась ли циркуляция вируса гриппа у животных на данной ферме. Для этого исследуют кровь 10-20 свиней на присутствие анти-ГА. Начиная с 7-10-го дня после начала болезни в крови реконвалесцентов появляются АТ. ВНА у свиней появляются на 6-7-й день. Максимальный титр их обычно бывает между 14-м и 27-м да.

РТГА. Обнаружение анти-ГА в крови переболевших животных наиболее простой, достаточно точный и пригодный метод проведения единичных и массовых исследований при диагностике гриппа. Для этого при помощи РТГА определяют сдвиг специфических АТ в парных сыворотках, взятых от животных в различные сроки после переболевания. Получают от каждого больного животного две пробы сыворотки: в первые дни болезни (1 проба) и в период реконвалесценции (2-я проба). Интервал между взятием 1-й и 2-й проб должен быть не менее 8-14 дн. Если в сыворотке, полученной от больных свиней в стадии выздоровления (через 14-30 дн после начала болезни), количество АТ возросло по сравнению с исходным уровнем в 1-й сыворотке, взятой в первые дни болезни, в 4 раза и более, то это свидетельствует о том, что вспышка гриппа прошла. Анти-ГА в крови экспериментально зараженных поросят образуются во всех случаях на 8-10-й день, на 21-й день наблюдается некоторое снижение их титра, и к 40-му дню титры их в РТГА колеблются от 1:8 до 1:32.

Сыворотки перед исследованием прогревают при 60°C 30 мин, освобождают от термостабильных ингибиторов (обработкой CO₂) и неспецифических АГ (адсорбцией с помощью эритроцитов кур). РТГА ставят общепринятым методом с 4 ГАЕ вируса. Для удаления неспецифических ингибиторов из сывороток, содержащих АТ к вирусу гриппа, в Румынии

зapatентован способ обработки, в котором используют фильтрат *Clostridium welchii*, позволяющий с большей надежностью получить сыворотки без ингибиторов, но сохранившие исходные концентрации специфических АТ. Использование рекомбинантного вируса, устойчивого к неспецифическим сывороточным ингибиторам, позволяет исследовать сыворотки без их предварительной обработки. При сопоставлении чувствительности РТГА и ИФА была установлена их равноценность в выявлении числа сероконверсии к вирусам гриппа, однако величина титров АТ, по данным РТГА, была в 2 раза ниже, чем в ИФА.

РН. Ставят ее в монослойной культуре клеток, для чего используют адаптированный штамм с хорошо выраженным ЦПД. Испытуемые сыворотки инактивируют 30 мин, а для реакции используют 100 ТЦД₅₀ вируса; смеси инкубируют при температуре 37°C 30 мин. При необходимости РН ставят и на КЭ по общепринятой методике. В США РН по подавлению бляшкообразования вирусами гриппа А1, А2 и В в перевиваемой линии клеток почек собак оказалась в 100 раз чувствительнее, чем РНГА.

Перед постановкой реакции сыворотки разводят от 10⁻¹ до 10⁻⁸ и инкубируют с 60-160 БОЕ индикаторного вируса гриппа в течение 1 ч при 34-36°C. Затем смеси вносят в чашки Петри с культурой клеток почек собак, выращенной в среде Игла при добавлении глутамина и нормальной телячьей сыворотки. На клетки наслаивают среду покрытия (среда Игла с 50% декстрозы, 1% декстрана и 0,1% трипсина), затем чашки в течение 2-5 дн инкубируют при 34-36°C в атмосфере с 5% СО₂. К вирусу гриппа А1 чувствительна только 1-дн культура, а к вирусу А2 - 2-дн культура клеток почек собак. Указанная модификация РН удобна тем, что не требует освобождения сывороток от неспецифических ингибиторов и выявляла АТ в сыворотках, в которых не удавалось обнаружить АТ с помощью РТГА.

РРГ. Более чувствительна, чем РТГА. Она была предложена для определения титра АТ в сыворотках свиней, для чего из свежотмытых эритроцитов цыплят готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере рН 7,2. Вирус гриппа А, выделенный от свиней (шт.А/свинья/Висконсин/15/30), в форме аллантаоисной жидкости, содержащей 1024 ГАЕ в 0,05 мл, добавляют к равному объему суспензии эритроцитов. Смесь выдерживают 10 мин при 4°C, а затем дважды отмывают и ресуспендируют. Готовят расплавленную 1,5%-ную агарозу (А-37), содержащую 0,1% азида натрия. Затем к 4,5 мл суспензии эритроцитов с адсорбированным вирусом добавляют 1 мл комплемента и смешивают с 24,5 мл расплавленной и охлажденной до 45°C агарозой. После застывания среды вырезают луночки диаметром 3 мм. Каждую луночку заполняют

ют исследуемой сывороткой и пластины выдерживают ночь во влажной камере при 4°C, а затем инкубируют 3 ч при 37°C. Испытуемые сыворотки перед исследованием инактивируют 30 мин при 56°C. О наличии АТ к вирусу судят по образованию зоны лизиса вокруг луночек. Установлена корреляция титров АТ в полевых и экспериментальных сыворотках, выявленных при использовании РРГ и РТГА.

Описанный метод прост и быстро выполним. Неспецифическая ингибция свиных сывороток снимается при прогревании. РРГ оказалась более чувствительной при выявлении АТ к слабоавидным штаммам вируса А/Виктория/3/75 и В/Анон/2114/76. При правильном подборе штамма вируса РРГ может быть с успехом использована для определения антигеммагглютинирующих АТ при массовых обследованиях на грипп.

РНГА. При серодиагностике гриппа эта реакция позволяет выявлять АТ в значительно более высоких разведениях сывороток, чем РСК и РТГА (в 35 и 10 раз соответственно). Различия между показателями и РНГА и РН не превышали 1,1%. Благодаря высокой чувствительности РНГА давала возможность регистрировать сероконверсию раньше, чем другие серологические методы. ELISA применительно к гриппу свиней не разработан. РСК не нашла широкого практического применения из-за трудностей, связанных с прокомплементарными свойствами сыворотки свиней.

Дифференциальная диагностика. Трудность распознавания ВГС связана с тем, что вирусные респираторные болезни (инфекция Сендай, пневмонии хламидиозной природы, аденовирусная инфекция и пр.), а также микоплазмоз сопровождаются катаральными процессами в дыхательных путях. Атипичные формы гриппа свиней иногда могут протекать хронически и напоминают вирусную пневмонию свиней (весьма собирательный термин прошлого, под которым могут скрываться пневмонии разной этиологии). В последнее время установлено, что гриппоподобные болезни свиней могут быть обусловлены микоплазмами. Свинопоголовье может явиться как резервуаром для сохранения и возникновения эпидемических вариантов, так и промежуточным звеном в ходе эпидемического и эпизоотического процессов.

Лабораторная диагностика болезни Ауески

Болезнь Ауески (БА, псевдобешенство, инфекционный бульварный паралич, зудящая чума, бешеная чесотка) – остро протекающая болезнь с/х животных всех видов, пушных зверей и грызунов. Из млекопитающих устойчивы приматы. Молодые животные восприимчивее взрослых. Пти-

цы не чувствительны. БА характеризуется признаками поражения головного и спинного мозга, сильным зудом и расчесами (у всех видов животных, кроме свиней).

Болезнь встречается во всех европейских странах, Южной и Северной Америке, Африке, Азии в виде энзоотий и наносит большой экономический ущерб.

Вирус болезни Ауески (ВБА) относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*, роду *Varicellavirus*. Впервые установил и описал болезнь в Европе венгерский учёный А. Ауески в 1902г. АГ вариантов у ВБА не установлено. Методом перекрестной ИФ установлено АГ родство ВБА и простого герпеса. Вирус индуцирует образование ВНА, КСА, ПА.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований.

Основные методы лабораторной диагностики: выделение вируса, прямая и непрямая иммунофлюоресценция, РДП, радиоиммунологический метод, кожная проба, РН, РСК, ELISA и биопроба.

Выделение вируса. *Взятие и подготовка материала.* Для выделения возбудителя болезни Ауески используют головной мозг, кусочки легких, селезенки, печени, лимфатических узлов, миндалин, полученные при вскрытии погибших животных. При жизни от больных свиней вирус можно выделить из носовых секретов, в которых он появляется на 4-6-й день болезни и сохраняется в течение 5-11 дней после выздоровления. От абортировавших животных используют плоды и плаценту.

При сборе материалов для вирусологического исследования следует помнить о неравномерном распределении вируса в разных участках мозга, поэтому, чтобы избежать ошибок при постановке диагноза, следует брать минимум 2-3 пробы из разных участков мозга, расположенных на некотором расстоянии друг от друга. Обычно при вскрытии отбирают кусочки мозжечка, продолговатого мозга из разных мест больших полушарий головного мозга.

Собранный материал помещают в стерильные пенициллиновые флаконы или пробирки и доставляют в лабораторию в термосе со льдом. Материал можно консервировать в 50%-ном забуференном растворе глицерина (рН 7,2-7,4). Секреты носовой полости собирают стерильными ватными тампонами, которые вводят в носовые ходы, а затем погружают в пробирки с раствором Хенкса, содержащим антибиотики.

В сопроводительном документе необходимо дать сведения о проведении иммунизации животных и применяемой вакцине.

В лаборатории материалы обрабатывают обычными методами: готовят 10%-ную суспензию, центрифугируют при 3-5 тыс. об/мин в течение 15-30 мин. Материалы, консервированные глицерином, предварительно отмывают от него.

Для большей вероятности выделения вируса и уменьшения количества исследуемых образцов кусочки из различных отделов мозга от одного животного объединяют в общую пробу, которую затем измельчают, обрабатывают антибиотиками и исследуют. Для лучшей сохраняемости вируса в суспензии к ней можно добавить 1-2% нормальной инактивированной сыворотки крови телят. До использования суспензию лучше хранить и замороженном виде (минус 30°C) или при 4°C.

Заражение животных. В качестве лабораторной модели для выделения вируса Ауески из патологических материалов обычно используют двух кроликов массой 2-2,5 кг, которым внутримышечно или подкожно вводят по 1 мл 10%-ной суспензии исследуемого материала. Инкубационный период в этом случае продолжается 36-48 ч. иногда он может длиться 4-6 дней, а в некоторых случаях — даже до 12 дней.

Различают энцефалитическую, менингеальную, паралитическую, зудневую и стертую формы болезни. Течение экспериментальной инфекции многом зависит от способа заражения.

Энцефалитическая форма начинается беспокойством, переходящим в сильное возбуждение, — животное бежит по клетке, боязливо оглядываясь, у него отмечают расширение зрачков, повисание ушей, скрежетание зубами, обильное истечение слюны изо рта. Возбуждение сменяется депрессией — больные кролики лежат на боку или на животе, задние лапы часто вытянуты, при попытке встать животные теряют равновесие и падают. Смерть наступает в период приступа возбуждения или угнетения, гибели часто предшествуют параличи конечностей.

Зудневая форма наиболее характерна для кроликов при внутримышечном или подкожном введении материала. В положительных случаях у животных после 2-3-дневного инкубационного периода появляется сильный зуд в месте инокуляции. Вначале отмечают общее беспокойство, животное часто вздрагивает, оглядываясь на место введения материала, затем начинает лизать и вырывать шерсть в этой области. Часто можно наблюдать, как кролик с ожесточением грызет кожу и подлежащие мышечные ткани на месте инъекции. Иногда зуд отмечают и на других участках тела, что приводит к особенно сильному беспокойству. Кролики

падает на бок и может погибнуть внезапно, без развития параличей, или же они появляются незадолго до смерти.

Менингеальная форма характеризуется сильным возбуждением, скрежетом зубов и опистотонусом. Животное падает на бок и погибает при наличии клонических судорог. Однако при вскрытии в менингеальных оболочках макроскопически иногда не обнаруживают никаких следов воспаления. Они могут быть выявлены лишь гистологически (следы лимфоцитарного менингита).

При стертых и молниеносных формах болезни Ауески у большинства кроликов не проявляется никаких симптомов болезни. Погибают они обычно ночью. Вечером накануне гибели животное кажется вполне нормальным, а утром обнаруживают его труп в характерном положении — на боку.

Биопробу считают положительной, если кролики погибают с клиническими признаками болезни Ауески (нервная клиника, зуд, расчесы) через 2-10 дней после инокуляции суспензии из патологического материала. Если кролики погибают без признаков болезни Ауески, биопробу повторяют, используя патологический материал первого пассажа. Считают, что инокуляция материала в переднюю камеру глаза кролика приводит к характерной зудневой форме болезни. Материалом для выделения вируса от погибших кроликов служат ткани головного и спинного мозга, а также паренхиматозные органы (легкие, печень). Гибель кроликов после введения патологического материала от свиней или пушных зверей без признаков зуда и, расчесов может свидетельствовать о выделении вакцинных штаммов вируса болезни Ауески.

Показано, что культуры клеток так же чувствительны к вирусу Ауески, как и кролики; к тому же они могут быть использованы для лабораторной диагностики атипичного течения болезни, при котором опыты по выявлению вируса в мозгу свиней путем заражения кроликов дают отрицательные или нетипичные результаты.

Заражение культуры клеток. Для выделения вируса от павших, больных свиней и кроликов обычно используют первично-трипсинизированные культуры клеток почек и щитовидной железы свиней, семенников телят, фибробластов куриных эмбрионов, перевиваемые линии РК-15, ВНК-21. К вирусу высокочувствительны субкультуры первого пассажа клеток почки поросенка и крупного рогатого скота.

При первичном выделении вируса из патологического материала лучше помещать пробирки во вращающийся барабан, что способствует сокращению сроков появления цитопатогенного действия. Для выявления последнего пробирки на протяжении 5 сут ежедневно просматривают под

микроскопом. При отсутствии цитопатических изменений на 5-й день культуры подвергают однократному замораживанию и оттаиванию и делают повторный пассаж. Каждый материал пассируют 3-5 раз.

При первичном выделении вируса признаки цитопатогенного действия появляются на 4-5-й день после инокуляции культуры. В последующих пассажах сроки появления ЦПД сокращаются до 15-20 ч, причем оно становится более выраженным. Характер цитопатических изменений в различных культурах может быть неодинаковым, что обусловлено различным действием вируса на клетки эпителиального и фибробластического типов. В культуре клеток почки поросенка, эмбриона свиньи или крольчонка цитопатогенные действия вируса выражаются в образовании синцития. Сначала в культуре появляются очаги округлых клеток, границы между которыми исчезают; а ядра перемещаются к центру и образуют конгломераты, окруженные общей оболочкой. Через несколько часов группы этих клеток принимают шарообразную форму, в цитоплазме их появляется зернистость. Затем происходит обильное отслаивание клеток с поверхности стекла.

В культуре фибробластов куриного эмбриона цитопатогенное действие вируса проявляется в округлении клеток, появлении зернистости и вакуолизации цитоплазмы с последующим отслоением клеток от поверхности стекла. Титры вируса в период максимального развития ЦПД обычно достигают $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ ТЦД₅₀/мл.

Диагноз на болезнь Ауески ставят в том случае, если видовая принадлежность вируса, выделенного в культуре клеток, подтверждена в РН. Вирулентные штаммы вируса образуют типичные симпласты. Штаммы, многократно пассированные в культуре куриных фибробластов, вызывают менее выраженного симпластообразования и пролиферацию клеток. Штаммы, пассированные в культуре фибробластов куриных эмбрионов в 10-50 раз снижают свою вирулентность.

Индикация и идентификация вируса

Вирусоскопия не проводится.

Электронно-микроскопическая диагностика. Метод электронной микроскопии позволяет обнаружить вирус болезни Ауески через сутки после экспериментального заражения в мазках-отпечатках, которые готовят непосредственно на электронно-микроскопических сеточках со слизистой оболочки глаза, носа, ротовой полости и из мочи.

Обнаружение специфических телец-включений. Это вспомогательный метод идентификации вируса. Внутрядерные тельца-включения обнаруживают в препаратах из зараженной культуры клеток, окрашенных

гематоксилин-эозином, а также при электронной микроскопии, в случае типичного ЦПД, культуры клеток куриного эмбриона и почки свиньи.

Серологическая идентификация. Для идентификации вируса болезни Ауески используют в основном РН в культуре клеток или на кроликах, метод флюоресцирующих антител. РДП, РНГА, ELISA-метод и др. Кроме того, для этой цели можно использовать РСК, однако из-за нестандартности антигена и непостоянства результатов самой реакции она не нашла широкого применения.

РН. Удобный и надежный метод идентификации выделенного вируса. Используют культуру клеток того же вида, на которой был изолирован вирус. Реакцию ставят по общепринятой методике, чаще используют вариант: различные разведения вируса (10^{-1} - 10^{-7}) и постоянную дозу сыворотки. Перед постановкой реакции культуральный вирус размораживают, центрифугируют в течение 30 мин при 2-3 тыс. об/мин и в реакции используют надосадочную жидкость. Положительную и отрицательную сыворотки разводят 1:10 питательной средой для культуры клеток, содержащей антибиотика, и прогревают при 56 °С 30 мин. Результаты РН учитывают по ЦПД через 2-5 сут. Вирус считают идентифицированным, если индекс-нейтрализации составляет 2lg и выше.

Для РН могут быть использованы и кролики. Методика постановки РН на них заключается в том, что 0,1 мл суспензии вируса (суспензия мозга и селезенки кролика, погибшего после заражения вирусом, разведенная 1:50 поддерживающей средой или раствором Хенкса) смешивают с 2 мл сыворотки крови, взятой от 2-3 переболевших свиней. Смесь тщательно встряхивают и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 2 ч, после чего вводят подкожно двум кроликам. Параллельно ставят контроль, прибавляя такое же количество вирусной суспензии к 2 мл нормальной сыворотки крови свиней, с последующим выдерживанием в термостате и инокуляцией двум кроликам. Кролики, которым введена смесь вируса с иммунной сывороткой, остаются здоровыми, а контрольные погибают через 60-72 ч после инокуляции при наличии характерных признаков болезни Ауески. 1 мл сыворотки переболевших свиней, полученной через 4 нед после выздоровления, может нейтрализовать 25 кроличьих ЛД₅₀ вируса.

Приготовление гипериммунной сыворотки для РН. Ее получают от 2-3 свиней, переболевших болезнью Ауески, через 4 нед после выздоровления. Гипериммунные сыворотки готовят путем инокуляции взрослых свиней, которым с 2-недельным интервалом подкожно вводят вирус в нарастающих дозах (50 и 100 мл) с последующей инъекцией двух таких же доз внутривенно. Кровь для получения сыворотки берут через 2 нед

после последней иммунизации. Полученная сыворотка в разведении 1:90 нейтрализует от 1000 до 3160 ТЦД₅₀ вируса.

Кроликов использовать для получения антисывороток нельзя, так как они очень чувствительны к вирусу Ауески.

Сыворотки крови от здоровых и переболевших животных сохраняют до использования в замороженном состоянии (минус 20-30°C). Перед постановкой реакции их размораживают, инактивируют прогреванием в водяной бане при 56 Т. в течение 30 мин. после чего готовят серийные двукратные разведения от 1:2 до 1:256 (при постановке реакции в культуре ткани с постоянной дозой вируса), используя в качестве разбавителя поддерживающую среду. При идентификации вируса используют гипериммунную сыворотку в разведении 1:5. При постановке реакции на кроликах используют неразведенную сыворотку от переболевших животных.

РИФ. Используют для быстрой индикации и идентификации антигена вируса Ауески в клетках культур ткани, инфицированных материалом, содержащим вирус, а также в замороженных срезах ткани мозга кроликов, зараженных суспензией патологического материала, или поросят, заболевших в естественных условиях.

Препараты готовят и окрашивают по общепринятой методике. При подготовке гистосрезов необходимо блоки толщиной 2-3 мм вырезать из различных отделов головного мозга. Вскрывать трупы с целью взятия материалов для иммунофлюоресцентного исследования необходимо как можно быстрее после гибели животных, так как четкие результаты будут получены только при исследовании свежих образцов и замороженных в криостате или в смеси сухого льда со спиртом.

В положительных случаях в срезах мозга обнаруживают специфическую флюоресценцию. В головном мозге поражаются главным образом нейроны коры. При малом увеличении можно видеть широкие полоски флюоресцирующих нейронов, в которых заметны только отдельные флюоресцирующие клетки. В срезах мозжечка пораженные клетки распределены более беспорядочно. Часто они видны как флюоресцирующие фокусы в зернистом слое. Иногда в них оказываются вовлеченными единичные клетки Пуркинье, но особого аффинитета вируса к этим клеткам обычно не наблюдают.

Распределение флюоресценции внутри клеток может варьировать в широких пределах. Иногда вирусный антиген обнаруживают как в цитоплазме, так и в ядре, но обычно свечение ядра выражено сильнее. Часто флюоресцирующие массы имеют вид светящейся пыли или мелких гранул. В отдельных случаях удается обнаружить внутриядерные включения типа А Каудри, однако более неправильной формы, чем в препаратах.

фиксированных и окрашенных обычными методами. Иногда светится только цитоплазма, причем степень свечения и характер распределения также варьируют. Часто обнаруживают скопление светящихся гранул вокруг ядер. В некоторых районах можно заметить мелкие светящиеся частицы вдоль аксонов. Для выделения вируса инфекционный материал, полученный из мозговой ткани, миндалин и селезенки животных, наносят непосредственно на монослой чувствительных к вирусу клеток и центрифугируют 40-60 мин при 1500 г. Затем инокулят заменяют питательной средой, а инфицированные клетки инкубируют в термостате в течение 12-14 ч. После фиксации препараты обрабатывают конъюгатом моноклональных антител с флюоресцином и исследуют в люминесцентном микроскопе.

Результаты иммунофлюоресцентного исследования хорошо согласуются с данными биопробы на кроликах и результатами выделения вируса в Культуре к теток.

РНГА. Антиген вируса болезни Ауески с помощью иммуноглобулинового варианта РНГА и РТНГА можно выявлять за 1-3 дня до появления клинических признаков болезни, в период болезни и после переболевания. При приготовлении эритроцитарного иммуноглобулинового диастикума используют гипериммунную сыворотку свиней и крыс с вируснейтрализующим титром 11,5 и 11,0 \log_2 соответственно. Данная реакция имеет преимущества перед РН.

РДП. Реакцию с успехом применяют для идентификации вируса, репродуцированного в культуре клеток. Получены обнадеживающие результаты при исследовании полевого материала микрометодом РДП.

РИЭФ. Это ускоренный метод распознавания антигенов. Антиген вируса болезни Ауески в электрополе движется к аноду, антитела — к катоду, и ни месте встречи их образуется линия преципитации. Время появления полос зависит от напряжения тока. РИЭФ значительно чувствительнее и протекает в 10-15 раз быстрее, чем обычная РДП.

РСК. Данная реакция не нашла широкого применения, так как положительные результаты получаются только при использовании специального метода изготовления антигена.

Иммуноферментная идентификация вируса. Можно быстро идентифицировать вирус прямым иммунопероксидазным методом. Антисыворотку к вирусу для мечения ферментом получают на поросятах 6-месячного возраста, которых вначале заражают интраназально в дозе $10^{3.3}$ ТЦД₅₀, а через 12 нед вводят внутримышечно в 4 участка тела частично очищенный вирус, смешанный с полным адъювантом Фрейнда. Через 9 дней инъекцию повторяют. Иммунопероксидазный метод по чув-

ствительности равен иммунофлюоресцентному, превосходит метод высе-ления вируса в культуре клеток.

При окрашивании прямым иммунопероксидазным методом в мазках-отпечатках обнаруживали клетки, содержащие антиген вируса в виде красно-коричневых гранул в цитоплазме и ядре нейронов мозга и в эпи-телии слизистой оболочки фарингеальной области. Эндогенная перокси-дазная активность была небольшой в мазках из мозга и значительной в фарингеальных препаратах за счет воспалительных клеток и эритроцитов. Фиксированные препараты-отпечатки из мозга и фарингса выдерживают хранение при комнатной температуре в течение 144 ч, что важно при транспортировке материала в лабораторию.

Метод рестрикционного анализа и гибридизации. Разработана экс-пресс-диагностика болезни Ауески у свиней с помощью специфических гибридизационных зондов. Предложен метод точечной гибридизации (ДНК-зонда) для выявления вируса в материалах из органов свиней. Дан-ный метод позволит выявлять геном вируса при латентной инфекции. Ги-бридизационные зонды, основанные на применении рекомбинантной ДНК, позволяют обнаруживать вирусный геном в костном мозге (50%), макрофагах, лимфоцитах и тимусе (20%) зараженных поросят.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. В настоящее время практические специалисты и научные работники склонны считать, что метод серологической проверки животных с выбраковкой положи-тельно реагирующих и последующими перепроверками является более успешным и эффективным в борьбе с болезнью Ауески, чем вакцинация. С вакцинацией связан ряд проблем. Однако с помощью серологических реакций нельзя отличить естественно инфицированных животных от вак-цинированных.

Диагноз на инфекцию ставят обычно при помощи РН в культуре кле-ток, определяя титры вируснейтрализующих антител к вирусу Ауески в сыворотках крови реконвалесцентов.

Для серологического исследования животных берут не менее 5 мл кро-ви. Сыворотку получают методом отстаивания, хранить ее можно до 10 сут при 4°C. При длительном хранении следует заморозить.

Для более точной диагностики лучше исследовать парные сыворот-ки, взятые с интервалом в 3-4 нед. Титры антител у переболевших живот-ных могут колебаться в широких пределах - от 1:32 до 1:256. У поросят и подсвинков, зараженных вирусом Ауески, специфические вируснейтра-лизующие антитела появляются к 6-8-му дню после заражения, достигая максимума через 3-4 нед. Через 100 дней после заражения титры вирус-нейтрализующих антител начинают снижаться, а через 135 дней антител

уже обычно не находят. У естественно больных и переболевших под-свинок вируснейтрализующие антитела удастся установить примерно в те же сроки, хотя в сыворотках переболевших свиней их иногда удастся обнаружить в течение 4,5 лет. Антитела также находят и у свиней, перенесших бессимптомную инфекцию.

Динамика вируснейтрализующих антител у животных других видов изучена недостаточно.

Характерным является увеличение титра антител у свиноматок непосредственно перед опоросом: новорожденные поросята получают антитела от матерей.

Для обнаружения и титрования антител, кроме РН, применяют РНГА, РДП, РСК, ELISA-метод и ряд других реакций.

РН. В культуре клеток ставят с постоянной дозой вируса (1000 ТЦД₅₀/0,1 мл) и разными разведениями сыворотки (от 1:2 до 1:16) по общепринятой методике. Для контроля благополучного стада допускается исследование групповых сывороток от 5 животных. Сыворотки перед постановкой реакции инактивируют при 56 °С в течение 30 мин. Результаты РН считают положительными при отсутствии цитопатического действия в разведениях сыворотки 1:2 и выше при дозе вируса 1000 ТЦД₅₀/0,1 мл. Наличие специфических антител в испытуемых сыворотках крови свидетельствует и о возможном инфицировании животных или вакцинации их против болезни Ауески; положительный результат исследования сывороток крови невакцинированных животных — о подозрении на болезнь, что подтверждают постановкой биологической пробы. Предложен микрометод РН для диагностики болезни Ауески.

Для выявления животных, инфицированных вирусом болезни Ауески в естественных условиях, РН более надежна, чем вирусологическое исследование смывов полости рта и глотки.

Наибольшей чувствительностью обладает метод постановки РН в культуре клеток Vero со штаммом Phylaxia.

Приготовление антигена для РН. В качестве антигена для постановки реакции нейтрализации в культуре клеток используют вирус с предварительно определенной активностью ($10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ ТЦД₅₀/мл). Для сохранения активности вирус хранят замороженным при минус 30°С. Если его выращивают на бессывороточной среде, то для лучшей сохраняемости к культуральной жидкости перед замораживанием можно добавить 2% нормальной сыворотки крови теленка. Перед постановкой реакции культуральный вирус размораживают, центрифугируют в течение 30 мин при 2500-3000 об/мин, после чего надосадочную жидкость собирают и в соот-

ветствии с титром вирусного материала разводят - до содержания 100-1000 ТЦД₅₀/0,1 мл.

Для постановки РН на кроликах обычно используют суспензию (1:50) головного мозга и селезенки кролика, погибшего после биопробы, при наличии симптомов болезни, характерных для болезни Ауески.

РНГА. Успешно применяют ее для выявления специфических антител в молозиве, молоке и сыворотках крови животных к вирусу болезни Ауески. Пробы молока и молозива автор брал в течение недели после опороса свиноматок и консервировал их 1%-ным раствором борной кислоты. Сыворотку молока и молозива перед реакцией инактивировал при 56°C 30 мин. Для изготовления эритроцитарного диагностикума наиболее пригоден концентрированный культуральный вирус с титром 8,5 lg ТЦД₅₀/мл.

Некоторые авторы считают, что РН менее чувствительна, чем РНГА, с помощью РН антитела на ранней стадии болезни не выявлялись, их обнаруживали лишь с 12-го дня, тогда как РНГА регистрировала их наличие на 5-й день.

РДП. После концентрации и очистки вируса с помощью химических детергентов (20%-ный дезоксихокат натрия, 20%-ный) тритон-Х, 1%-ный β-меркаптоэтанол) получают антигенную фракцию, которая реагирует в агаровом геле с сыворотками в титре 1 : 4 в 100% случаев.

ELISA-метод. Он в 60-100 раз более чувствителен, чем РН. Антитела в ELISA обнаруживают на 5-6-й день после заражения, в РН — на 9-10-й. Иммуноглобулины классов G и M определяют в ELISA с 5-го дня после инокуляции вируса, причем максимум титров IgM приходился на 9-10-е сутки, а IgG- на 10-15-е сутки.

ELISA-метод вполне может быть использован вместо РН для диагностики болезни при условии наличия соответствующего оборудования и высококачественных диагностических наборов. С помощью данного теста можно проводить регулярные обследования.

Для определения у свиней антител к вирусу болезни Ауески рекомендуется использовать микрометод. Антиген готовят из культуры клеток РК-15, зараженной полевым штаммом вируса. Через 48 ч инкубирования зараженные клетки культуры разрушают замораживанием, оттаиванием и дополнительно ультразвуком, а затем концентрируют в 30 раз ультрацентрифугированием. Антиген в трисбуфере с pH 9,6 адсорбируют в течение ночи при 4 °C в луночках микропанели. После этого луночки промывают, вносят пробы испытуемых сывороток в разведении 1:160 в твин-20-фосфатно-буферном растворе и инкубируют 2 ч при комнатной температуре. Фиксацию антител на антигене определяют добавлением антисви-

ных кроличьих глобулинов, меченных пероксидазой, разведенной в твин-20-фосфатном буферном растворе 1:10000. Количество связанной пероксидазы определяют в реакции с ортофенилендиамином в присутствии перекиси водорода в цитрат-фосфатном буфере с pH 5 при комнатной температуре. Реакцию прекращают через 15 мин добавлением 50 мкл $2\text{NH}_2\text{SO}_4$.

Метод ELISA оказался более чувствительным и быстро выполнимым тестом, чем РН в культуре клеток. После ультрафиолетового облучения луночки с иммуносорбентом можно хранить при 4°C длительное время.

Можно титрование антител осуществлять этим методом, но при этом применять лишь один препарат — стафилококковый белок А, меченный пероксидазой хрена. Последний дает возможность избавиться от применения антивидового препарата, меченного ферментом.

Для упрощения определения антител к вирусу болезни Ауески предложено использовать бумажные фильтры, которые пропитывают испытуемым образцом крови, высушивают и хранят до проведения индикации. Последняя проводится стандартным иммуноферментным методом ELISA. Специфичность данного метода составляет 100%, чувствительность — 90-96%.

РРИД. Антитела к вирусу болезни Ауески могут быть определены в течение одной ночи ферментной радиальной иммунодиффузией. Титры антител определяют визуально по окрашенным круговым зонам, диаметр которых (в мм) пересчитывается на соответствующие значения титров. Описана техника исполнения теста: неинфекционный антиген вируса болезни Ауески наслаивают на поверхность чашки и покрывают агаром. В лунки добавляют исследуемые сыворотки, и антитела диффундируют через слой агара. Происходит специфическое связывание с антигеном. После контакта в течение ночи агар вынимают, отмыванием удаляют несвязанные неспецифические антитела, добавляют конъюгат (видоспецифичный, связанный с ферментом аптииммуноглобулин), он прикрепляется к связанным антителам. Добавление агара с субстратом и катализатором (H_2O_2) приводит к реакции между ферментом в конъюгате и этим субстратом, в результате чего получается кольцо. Диаметр его (в мм) соответствует определенному количеству антител в сыворотке. При обнаружении антител у вакцинированных свиноматок чувствительность была 92%, пассивных антител у новорожденных поросят — 76%, зараженных полевым штаммом — 99%.

Лабораторная диагностика инфекционного ларинготрахеита кур

Инфекционный ларинготрахеит кур (ИЛТ) – вирусная контагиозная респираторная болезнь, поражающая кур (всех возрастов), индеек, фазанов.

Вирус инфекционного ларинготрахеита (ИЛТ) птиц относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesvirinae*, к роду *Varicellavirus*. Вирус впервые выделил Бичь в 1930 г. в США. Штаммы вируса ИЛТ различаются по вирулентности для птиц и КЭ, тропизму, скорости выделения из клеток в тканевой культуре, устойчивости при хранении, молекулярно-структурными особенностями. Иммунологических различий среди штаммов вируса ИЛТ не обнаружено. В организме кур вирус ИЛТ индуцирует образование ВНА.

Впервые описан в 1925 г. Мей и Титслер под названием инфекционный бронхит. С 1931 г. её стали именовать инфекционным ларинготрахеитом. Регистрируется во всех странах мира, где развито промышленное птицеводство.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков болезни (расстройство акта дыхания, кашель, удушье, поражение глаз, откашливание слизи с примесью крови), патологоанатомических изменений (геморрагическое и катаральное воспаления слизистой оболочки гортани и трахеи, фибриновые массы в конъюнктивальном мешке, казеозные пробки в просвете гортани) и результатов лабораторных исследований. Часто болезнь протекает атипично, характерные признаки ее слабо выражены или их нет. В таких случаях решающее значение в диагностике приобретают лабораторные методы исследования.

Выделение вируса. Для вирусологического исследования от больных птиц берут экссудат из трахеи, от павших или вынужденно убитых в начальной фазе болезни (между 2-7 днями) — слизистые оболочки гортани, трахеи, конъюнктивы, носовых ходов и кусочки легких. Материал замораживают и сохраняют при минус 20°C и ниже. Для гистологических исследований материал помещают в 10%-ный раствор нейтрального формалина.

Из патологического материала готовят суспензию 1:5 на растворе Хенкса или изотоническом растворе NaCl, центрифугируют при 1500-2000 об/мин в течение 15 мин, к надосадочной жидкости добавляют по 1000 ЕД пенициллина и 500 мкг стрептомицина в расчете на 1 мл, выдерживают в течение 3-4 ч при 2-4 °С. Затем используют для инокуляции КЭ, культуры клеток или молодых не иммунных к инфекционному ларинготрахеиту цыплят.

Заражение куриных эмбрионов. Для каждой пробы используют по 10 эмбрионов 9-12-дневного возраста. Заражают на ХАО. Погибших в первые 24 ч после инокуляции эмбрионов не учитывают. Оставшихся живых эмбрионов на 6-8-й день убивают. Макроскопические изменения ХАО появляются через 2,5-3 сут и достигают максимума к 5-6-му дню. Штаммы вируса инфекционного ларинготрахеита вызывают мелкоузелковые и очаговые поражения хорионаллантоиса. Узелковые поражения обнаруживаются по всей поверхности хорионаллантоиса, очаговые — только па месте инокуляции вируса. Необходимо учитывать, что не все штаммы вызывают гибель куриных эмбрионов на 4-6-й день. Для выявления специфических поражений необходимо проведение не менее трех пассажей, используя ХЛО, суспендированную в аллантоисной жидкости предыдущего пассажа.

Выделение вируса надо подтвердить обнаружением телец-включений Зейфрида, РП, РДП, биопробой, а также РИФ и электронной микроскопией.

Заражение культур клеток. Наиболее пригодны в данном случае культуры клеток почек эмбриона и цыплят, в которых первые изменения наблюдаются иногда уже через 24 ч после заражения, а через 48-72 ч в клеточной культуре обнаруживаются многоядерные гигантские клетки, в которых можно обнаружить внутриядерные включения. Специфичность этих изменений доказывают в РИФ или РН. Наблюдение за культурой клеток проводят до 6-7 дней.

Индикация и идентификация вируса. *Обнаружение специфических телец-включений.* Вирус инфекционного ларинготрахеита размножается в эпителиальных клетках слизистой оболочки гортани, трахеи, клоаки, вызывая острое воспаление этих оболочек с образованием внутриядерных включений. Включения обнаруживаются до наступления некроза эпителия между первым и пятым днями после интрахеального заражения цыплят. В мазках из конъюнктивы включения находят через 48 ч после заражения. Ядро, содержащее включение, обычно увеличено, отмечается гиперхромация ядерной оболочки. Включения имеют округлую форму, иногда форму диплококков и занимают $1/2 - 2/3$ клеточного ядра. Вокруг включения видим неокрашенная зона, что считается характерным. Болезнь можно диагностировать на основании обнаружения внутриядерных включений. Для этого на предметных стеклах готовят мазки из соскобов эпителия слизистой оболочки, фиксируют в абсолютном метиловом спирте в течение 3-5 мин, окрашивают раствором краски Гимза (1 капля краски на 1 мл дистиллированной воды) в течение 2 ч при 37 °С, затем мазки промывают, обрабатывают абсолютным метиловым спиртом, снова про-

мывают, высушивают и просматривают. В положительных случаях цитоплазма эпителиальных клеток окрашивается в бледно-голубой цвет, ядерные оболочки таких клеток более темные, внутриядерные включения четко видны, светло-красного цвета, по форме варьируют (шарообразные или колбасовидные), окружены ясно видимыми светлыми ободками. Количество их в ядре от 1 до 4. Указанный метод позволяет иногда в течение 3-4 ч диагностировать инфекционный ларинготрахеит даже при атипичном проявлении. Вероятность обнаружения телец-включений в патологическом материале существует только в начальной фазе болезни — между 2-м и 7-м днями.

РИФ. Данный метод позволяет обнаружить вирусный антиген при помощи специфической флюоресцирующей сыворотки в мазках из слизистой оболочки трахеи, конъюнктивы от больных цыплят (в период острого течения болезни), из пораженной ХАО и инфицированных культур клеток. Реакцию ставят по общепринятой методике. Чаще используют прямой метод. Положительную флюоресценцию в мазках от больной птицы наблюдают в период острого течения болезни, когда обнаруживаются внутриядерные включения и можно выделить вирус на эмбрионах кур.

Биопроба. Ставят ее на цыплятах 30-90-дневного возраста путем аппликации вирусосодержащего материала на слизистую оболочку гортани, трахеи, глаз, носа, подглазничного синуса, клоаки. При наличии вируса в исследуемом материале у зараженных цыплят на 6-12-й день развиваются типичные клинические признаки экспериментальной инфекции. При инокуляции материала в подглазничный синус в положительных случаях развивается синусит с отеком, выделениями из носовых ходов и слезотечением. Положительная реакция на клоачную пробу проявляется с 3-го по 8-й день, но чаще — на 4-5-й день в виде отечности слизистой оболочки фабрициевой сумки и катарального, геморрагического или фибринозного воспаления.

Наблюдение за зараженными цыплятами ведут до 14 дней. Чаще всего заражение цыплят проводят на слизистую оболочку трахеи и клоаки, так как этот метод позволяет определить вирулентность штамма, а также провести дифференциацию его от вирусов, вызывающих сходное поражение ХАО у инфицированных куриных эмбрионов. При интратрахеальном заражении 4-недельных цыплят вирулентным штаммом инфекционного ларинготрахеита CS-1 наибольший титр вируса в тканях трахеи (10^8 БОЕ/г) установлен на 2-4-е сутки. Позднее количество вируса резко снижалось, и на 7-й день его не обнаруживали, хотя антиген вируса в эпите-

лии трахеи в большом количестве выявляли на 7-е и 8-е сутки с помощью флюоресцирующих антител.

Последнее время естественные инфекции все чаще протекают в нетипичной, хронической или бессимптомной формах. Выделяемые штаммы также менее патогенны для куриных эмбрионов, не всегда приводят к их гибели и даже не всегда вызывают патологические изменения на слизистых оболочках при непосредственном введении исследуемого материала.

РН на куриных эмбрионах. Реакцию ставят по общепринятой методике. Чаще всего в диагностической практике используют метод: разведение вируса и постоянная доза сыворотки. Результаты РН выражают в индексах нейтрализации. Принято индексы нейтрализации от 1 до 9 считать отрицательными от 10 до 49 — сомнительными, от 50 и выше — положительными. РН можно проводить и на культурах клеток почек куриного эмбриона и 3-8-дневных цыплят.

РДП. Для идентификации возбудителя в РДП используют набор куриных антисывороток, полученных к различным вирусам птиц. РДП ставят по общепринятой методике. Согласно стандарту для РДП при диагностике инфекционного ларинготрахеита птиц 1,5%-ный агаровый гель готовят на вероналовом буферном растворе с рН 7,2, который готовят следующим образом: в 100 мл горячей дистиллированной воды растворяют 1,84 г веронала, после охлаждения доливают дистиллированной водой до 1000 мл и растворяют в полученном растворе 10,3 г медиала. Раствор хранят при 4 °С.

В среднюю лунку помещают исследуемый антиген, а в периферийные лунки — гипериммунные преципитирующие сыворотки. Специфические линии преципитации появляются через 24 - 48 ч, однако в некоторых случаях они появляются к 72 ч и располагаются между средней линией и лункой, содержащей сыворотку.

Реакция проста по технике выполнения и позволяет выявлять примерно 75% положительных случаев, установленных при помощи заражения эмбрионов.

РДП специфична, но недостаточно чувствительна, ее используют главным образом для ретроспективной диагностики среди взрослых кур.

Приготовление гипериммунных сывороток и антигенов. Гипериммунные вируснейтрализующие сыворотки получают на кроликах по следующей схеме: вирусу (суспензии хорионаллантоисных оболочек 1:10 после центрифугирования при 2500 об/мин в течение 30 мин) вводят кроликам внутривенно в течение 3 лет по 3 раза в неделю (через день) в первую неделю — по 2 мл, во вторую — по 3, в третью — по 4 мл. Через 7 нед

после первичной иммунизации кролику внутривенно инъецируют 10 мл вируса, а на следующий день — кролику внутривенно инъецируют 15 мл внутривенно. Через 7 дней после последнего введения антигена кроликов обескровливают. Гипериммунные кроличьи сыворотки используют в РН для типирования вируса инфекционного ларинготрахеита.

Получение гипериммунных преципитирующих сывороток на птице. Центрифугированную суспензию хорионаллантоисной оболочки в разведении 1:10 вводят взрослым петухам в подкрыльцовую вену в объеме 1-2 мл по схеме четыре инъекции с промежутками в один день; 7 дней отдыха; четыре инъекции с промежутками в один день. На 6-й день после последней инъекции пробно берут кровь из сердца; в случае неактивности сыворотки проводят трехкратное введение вируса с суточными интервалами; на 6-й день вторично берут пробу крови.

Идентификация вируса с помощью моноклиальных антител. По чувствительности ИФЛ-тест с моноклональными антителами сопоставим с методом выделения вируса, но более быстрым и более чувствительным по сравнению с иммунофлюоресценцией.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. В нетипичных случаях, особенно при хроническом течении инфекции, провести диагностику позволяет установление роста титра антител при исследовании парных сывороток. Однако такого рода исследования проводятся главным образом с целью получения данных, свидетельствующих о перенесении заболевания данной популяцией и указывающих на степень распространенности возбудителя на определенной территории.

Пробы сыворотки от птицы исследуют дважды — через 14-28-дневный интервал. Повышение титра антител к вирусу и числа положительно реагирующих птиц в стаде свидетельствует о наличии и распространении инфекции в хозяйстве, а сохранение или снижение уровня антител — о прошедшей инфекции.

Для серологического исследования кровь берут на 14-й и 28-й дни от начала болезни не менее чем от 5-10 птиц по 5 мл от каждой. До начала исследования сыворотку сохраняют в замороженном состоянии при минус 20-70°C. Сыворотки (больных и переболевших птиц, а также контрольные) инактивируют при 56°C 30 мин.

Приготовление антигенов для РН и РДП. Хорионаллантоисные оболочки куриных эмбрионов с характерными для данного вируса поражениями гомогенизируют с равным количеством буферного изотонического раствора с рН 7,2-7,4, к которому добавлены антибиотики из расчета по 100 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл раствора. Суспензию центрифугируют при 3000 об/мин 20 мин. Надосадочную жидкость сливают

и используют в качестве антигена, если она содержит вируса не менее 10^{-5} ЭИД₅₀/мл. Антиген сохраняют в замороженном состоянии.

Предложена следующая методика концентрации и очистки вируса: вирусосодержащий материал концентрируют полиэтиленгликолем с мол. массой 6000; конечная концентрация его в вирусосодержащей суспензии равна 7%; концентрирование ведут при 4°C в течение 3 ч, центрифугируют концентрированный вирус при 3000 об/мин 30 мин. Инфекционная активность полученного вируса 10^{-6} - 10^7 ЭИД₅₀/мл.

РН. На куриных эмбрионах или культурах клеток ставят по общепринятой методике, чаще используют модификацию: постоянная доза сыворотки и различные разведения вируса. Число рядов соответствует числу испытуемых сывороток плюс два ряда контроля (с нормальной и иммунной сыворотками), а число пробирок в ряду — числу разведений вируса. После контакта (1 ч при комнатной температуре) смесь сыворотки с каждым разведением вируса инокулируют не менее чем четырьмя куриными эмбрионами на ХАО по 0,2 мл. Эмбрионы инкубируют при 37°C в течение 6 дней. При вскрытии выявляют специфические изменения на ХАО. В РН рекомендуется использовать неразведенные сыворотки. Оценку результатов реакции проводят по индексу нейтрализации. Сыворотку с индексом нейтрализации 10 или меньше считают отрицательной, а с индексом больше 10 — положительной.

РДП. Проводят по общепринятой методике, используя стандартный антиген. Эта реакция может выявить 25-50% переболевших птиц. Однако простая техника постановки ее и быстрое получение результатов дают возможность с минимальными затратами средств и времени обследовать большое количество птицы.

Лабораторная диагностика ньюкаслской болезни

Ньюкаслская болезнь (НБ), псевдочума птиц - высоко контагиозная вирусная инфекция, главным образом куриных, характеризующаяся пневмонией, энцефалитом, множественными точечными кровоизлияниями и поражением внутренних органов. Зарегистрирована на всех континентах. Наносит громадный экономический ущерб и относится к особо опасным инфекциям. Ее впервые диагностировал и описал Крансвелд в 1927 г. на острове Ява.

При характерном течении болезни постановка диагноза не представляет сложности. При вспышке болезни на фоне пассивного или поствакцинального иммунитета, а тем более в стационарно неблагополучном хозяйстве поставить диагноз бывает чрезвычайно трудно. В этих случаях тща-

тельно изучают эпизоотическую ситуацию, клиническую и патологоанатомическую картину. Решающее значение имеют лабораторные исследования - выделение вируса на КЭ, его индикация и идентификация в РГА - РТГА, определение вирулентности вируса на КЭ и цыплятах, а также выявление АГ в сыворотке переболевших или вакцинированных птиц и РТГА.

Выделение вируса. Вирус, в зависимости от его тропизма можно выделить из головного и костного мозга, трахеи, кишечника, селезенки, легких, печени. Для исследования рекомендуется брать голову, легкие, трахею и селезенку от только что павших или вынужденно убитых птиц. Вирус удастся выделить только в период вспышки болезни. Через 15 дн выделить его обычными методами, как правило, не удастся. Поэтому патологический материал необходимо брать в начале вспышки (в первые 3-5 дн) и направлять в лабораторию в термосе со льдом. Внутренние органы можно помещать в стерильный 50%-ный р-р глицерина на дистиллированной воде. Смывы из трахеи и клоаки лучше консервировать на холоде или при температуре не выше 4°C. Мазки-отпечатки исследуют методом ФА, срезы - с помощью ЭМ или ИЭМ, а суспензию - в РГА. Это позволит выявить специфический АГ (вирус) и ГА-агент в течение 3-5 ч, определить направленность дальнейших исследований.

Заражение КЭ. Эмбрионы 9-11-дн возраста заражают по 0,2 мл, не менее 10 КЭ на каждый материал, в аллантаисную полость общепринятым методом и инкубируют 72 ч при 37,5°C (погибших в первые 24 ч эмбрионов не учитывают). Если через 72 ч нет погибших КЭ, то 5 из партии зараженных убивают, оставляя их при 4°C на ночь. Остальные 5 КЭ инкубируют до 120 ч и затем убивают. Аллантаисную жидкость от погибших и живых КЭ проверяют на ГА в РГА с куриными эритроцитами (1-5%-ная взвесь). Обычно велогенные штаммы вируса вызывают гибель КЭ уже через 32-60 ч после заражения, мезогенные - через 60-90, а лентогенные - через 100 ч и более. Иногда при первом пассаже не удается выделить вирус, поэтому необходимо провести не менее 3-х "слепых" пассажей. Учитывая, что в вакцинируемых стадах можно выделить и вакцинный вирус (шт. Н, La Sota, Бор 74/ВГНКИ и др.), вторым этапом исследования должно быть определение патогенности выделенного изолята. Первым ориентиром могут служить данные РГА. Обычно полевые изоляты обладают низкой ГА-активностью, проявляя ее в разведениях 1:16 - 1:128, тогда как вакцинные штаммы, наоборот, проявляют высокий ГА-титр - 1:256 - 1:2048.

Ненадежным оказался метод выделения вируса от зараженных иммунных кур: чем выше иммунитет у несушек, тем меньше вероятности выде-

ления вируса из их эмбрионов. При исследовании большого количества полевых образцов на выделение вируса НБ можно использовать фрагменты ХАО, связанные с яичной скорлупой. Для этого фрагменты ХАО размером 0,6-1,0 см² культивируют в среде Игла. Эффективность выделения вируса 97%. При внесении вируса в среду культивирования или непосредственно на ХАО КЭ получены совпадающие результаты.

Заражение культуры клеток. Выделение вируса в культуре клеток осуществляется редко, так как культуральный вирус по ГА-активности значительно уступает эмбриональному. Однако в тех случаях, когда в лаборатории можно получить культуру фибробластов КЭ и специалисты владеют этим методом, его можно применять для выделения и идентификации вируса. Приготовление вирусной суспензии, выращивание и заражение культуры клеток куриных фибробластов производят общепринятым методом. Можно использовать перевиваемые линии ВНК-21 и Нер-2.

В зараженной культуре фибробластов КЭ вирус НБ через 48-60 ч вызывает ЦПИ, специфичность которых подтверждается реакцией гемадсорбции с эритроцитами кур. С вирусосодержащей культуральной жидкостью может быть поставлена РГА в отношении эритроцитов крови кур. Обычно при первичном выделении ГА-титр культурального вируса не превышает 1:32 - 1:128. Отсутствие или низкие титры ГА вируса в первом пассаже на культуре ткани не дают основания исключить НБ.

Заражение птиц. Если КЭ под руками нет, вирус можно выделить на неиммунной к НБ птице. Для этого испытуемый материал 1:10 (0,5 мл) внутримышечно инокулируют цыплятам в возрасте 2-4 мес. За инфицированной птицей наблюдают 10-12 дн. При появлении характерных для болезни симптомов птиц в атональном состоянии убивают и берут пробы головного мозга и селезенки, которые можно использовать для заражения КЭ и иммунологической пробы (для одновременного заражения птиц иммунной и неиммунной групп).

Титрование вируса. Обычно проводят на КЭ, культурах клеток по общепринятой методике и на 6-10 нед цыплятах. Доза инокуляции вируса для цыплят 0,5 мл (внутримышечно или внутривенно). Срок наблюдения 15 дн.

Индикация вируса

Экспресс-методы выявления антигена вируса НБ. Через 24 ч в инфицированных культурах клеток (шт. Н) наблюдают появление многоядерных симпластов и цитоплазматических эозинофильных включений неправильной глыбчатой формы. Через 48 ч после заражения цитоплазма бывает нафарширована тельцами-включениями. В ядрах изменений не отмечалось. Разработан высокочувствительный авидин-биотиновый

ИФА. В данном тесте применяют монАТ к вирусу НБ, очищенные и меченые биотином. Тест характеризуется простотой выполнения и короткими сроками (3-4 ч) получения результатов. Непрямой точечный вариант ИФА является быстрым, легким, специфическим методом обнаружения вируса в смывах с различных органов.

Для идентификации РНК вируса НБ пользуются экспресс-методом ПЦР, амплифицирующей участок длиной 238 п.н. в гене белка слияния Р с использованием в качестве праймеров нуклеотидов, фланкирующих последовательность.

В организме птицы, зараженной вирусом НБ, в процессе продолжительного контакта с вирусом эритроциты теряют способность ГА. Чтобы косвенно доказать присутствие вируса в организме, от исследуемой птицы берут 0,04 мл крови в формализированную (0,1%-ную) вирусосодержащую аллантоисную жидкость, вирус должен обладать высокой агглютинирующей активностью. Если на стекле наступает гемагглютинация, это свидетельствует об отсутствии в исследуемой капле крови вируса НБ. Учет реакции ведут через несколько секунд. Метод применим для выявления патогенного вируса в вакцинированном стаде, так как вакцинные штаммы лентогенной группы агглютинацию эритроцитов не вызывают.

РГА. Используют с целью ориентировочного определения присутствия вируса в исследуемом материале и для его титрования. ГА вируса входят в состав вирусной частицы (вириона) и могут содержаться в инфицированных аллантоисной и амниотической жидкостях, оболочках и органах КЭ, легких, печени почках и селезенке погибшей птицы, в жидкой и клеточной фракциях тканевых культур. Можно брать эритроциты крови кур, морской свинки, лошади, человека и др. Разные виды вирусов и даже шт. одного и того же вируса могут отличаться друг от друга способностью агглютинировать эритроциты указанных животных. Спектр ГА служит характеристикой биологической активности вируса и штаммов. Например, большинство шт. вируса НБ не вызывает ГА эритроцитов лошади, чем отличается от вируса классической чумы птиц, который способен ГА их в высоких разведениях.

Предложена экспресс-диагностика атипичных форм НБ кровекпельной реакцией гемагглютинации (ККРА). Простота постановки её, совмещение исследований на НБ и пуллороз позволяют включить ее в технологический процесс ветобработки птицы.

Серологическая идентификация

Вирусы НБ можно идентифицировать в РТГА, РН, РСК, РИФ и др.

РТГА. Основной, высокоспецифичный и простой в выполнении метод идентификации вируса НБ. Для постановки необходимо иметь эталонные

специфические сыворотки к вирусу и выделенный на КЭ вирус (аллантаинская жидкость). РТГА ставят общепринятым методом в макро- и микро-вариантах. Идентификацию вируса считают завершенной, если эталонная специфическая сыворотка тормозит ГА-активность вируса в пределах целого или 1/2-1/8 титра с гомологичным эталонным АГ.

Для быстрой идентификации выделенного вируса рекомендуют следующий метод: на предметное стекло наносят капли аллантаинской жидкости и 1%-ную суспензию куриных эритроцитов. Затем ставят пробу на нейтрализацию ГА-активности. Для этого на предметное стекло наносят каплю той же аллантаинской жидкости, каплю эталонной специфической сыворотки и хорошенько перемешивают. Если агглютинации эритроцитов нет, значит выделенный вирус является вирусом НБ.

Приготовление гипериммунных сывороток. 5-8-мес кур с титрами анти-ГА поствакцинального иммунитета против НБ 1:4-1:64 гипериммунизируют вирус-вакцинами из шт. В1, La Sota, Н. Первое введение делают с адьювантом (автоклавированная смесь ланолина с вазелином в соотношении 1:1,5). На 1 мл смеси добавляют 5 мл вакцинного вируса. Смесь растирают в ступке и помещают в водяную баню на 30 мин при температуре 56°C. 1-й раз вакцину вводят с адьювантом в объеме 1 мл внутримышечно, 2-й раз - через 3 дня без адьюванта, 3-й раз еще через 3 дня без адьюванта. Через 10 дн проверяют активность гипериммунных сывороток. Титр их обычно составляет 1:6144-1:12288.

РН на КЭ. Используют для идентификации вируса редко, так как она трудоемка и длительна. Реакцию используют в спорных ситуациях. РН ставят общепринятым методом обычно в варианте разведения вируса и постоянной дозы сыворотки. Реакцию считают положительной при индексе нейтрализации >21lg.

РСК. В диагностической практике при НБ используют редко. Предложена РСК как быстрый и дешевый метод дифференциации штаммов вируса НБ по вирулентности.

РИФ. Метод основан на применении родаминсульфохлорида для конъюгации иммунной сыворотки к вирусу с целью идентификации вирусного АГ в пораженных клетках павших и убитых птиц. Применение этого красителя наиболее приемлемо и удобно благодаря яркому оранжево-красному свечению АГ. ФИТЦ-конъюгаты (флюоресцеинизотиоцианат) менее пригодны. Для обнаружения специфического АГ применяют гомологичные РСХ-конъюгаты общепринятым методом. В большинстве случаев АГ выявляется в ядрах клеток белой крови (лимфоцитах, моноцитах, псевдоэозинофилах и эозинофилах) или пораженных клеток указанных органов в виде яркой флюоресценции оранжево-красного цвета. В

контрольных препаратах, обработанных теми же гомологичными конъюгатами, подобного свечения не наблюдается, лишь в некоторых случаях выявляется точечное желто-оранжевое свечение в цитоплазме юных эозинофилов.

Установлено, что вирусный АГ в зараженных культурах клеток (ФЭК и ВНК-21) выявляется, начиная с 4 ч (для велогенных штаммов) и с 6 ч (для лентогенных штаммов), до 10-12 ч свечение АГ отмечали только в цитоплазме, а через 20 ч - в цитоплазме и ядрах клеток.

РНГА. Во ВНИВИП разработана методика получения высушенных стандартных высокочувствительных и специфических эритроцитарных тест-препаратов с АГ к вирусу НБ для экспресс-диагностики. Указанный эритроцитарный диагностикум позволяет выявить вирус в экскретах органов и тканей.

ИФА. Методом ИФА вирусный АГ выявляют в ранние сроки после заражения до появления ЦП Д. Через 12 ч после заражения видны единичные АГ-содержащие клетки.

Идентификация при помощи монАТ. Исследованы различные штаммы вируса и изоляты НБ на гомологичное родство к монАТ. В результате тестирования 40 изолятов и штаммов с использованием набора из 9 монАТ выявлено 8 групп. Вирусы каждой группы обладали не только общими АГ-свойствами, но и одинаковыми эпизоотическими чертами. МонАТ к ГА и гликопротеину Р рекомендовано использовать для определения патогенности и биологической характеристики штаммов, циркулирующих в стадах вакцинированных и невакцинированных птиц. Они могут быть использованы для идентификации полевых изолятов, АГ-родственных шт. La, Sota и В₁, быстрой дифференциации этих вакцинных штаммов от вирулентных полевых изолятов.

Метод картирования олигонуклеотидов. Этим методом исследован биохимический состав нескольких штаммов вируса НБ, выделенных в штатах Калифорния, Техас и Флорида, это позволило легко дифференцировать штаммы друг от друга. Часть штаммов оказались идентичными. Считают, что метод олигонуклеотидного картирования может быть эффективно использован с целью оценки эпизоотической ситуации на любой территории.

Определение вирулентности выделенного вируса. Помимо серологической идентификации часто возникает необходимость определения вирулентности выделенного изолята. Это особенно важно в том случае, когда возникает подозрение, что выделенный возбудитель является штаммом, применяемым для массовой вакцинации. Степень вирулентности можно определить следующими методами.

Метод Хенсона - определение индекса внутримозговой вирулентности. Исследуемым материалом в разведении 1:10 заражают интрацеребрально в дозе по 0,05 мл 10 1-дн цыплят, полученных от невакцинированных против НБ кур. Время наблюдения 8 дн. Все погибшие цыплята считаются специфическими; их сумму умножают на коэффициент 2. Все цыплята, проявившие клинические признаки, тоже считаются специфическими; их сумму умножают на коэффициент 1. Индекс интрацеребральной патогенности вычисляют путем деления суммы баллов на 80 (число наблюдений за 10 цыплятами в течение 8 дн). Для лентогенных штаммов индекс до 0,2, для велогенных штаммов - больше 1,5. Недостатком данной методики является - постоянный период наблюдения - 8 дн.

Метод определения среднего времени гибели 10-дн эмбрионов, вызванный минимальной летальной дозой (СВГ/МЛД). Для этого готовят серию 10-кратных разведений исследуемого вируса от 10^{-1} до 10^{-10} , пять из них (10^{-1} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} используют для заражения 10-дн КЭ в аллантаоисную полость в объеме по 0,1 мл. Каждым из этих разведений инокулируют по 10 КЭ: по 5 заражают в 8 ч утра и 5 - в 16 ч и инкубируют их при 37°C. Наблюдают за ними 2 раза в день через 8 ч в течение 120 ч. Час гибели каждого погибшего эмбриона регистрируют. Минимальной летальной дозой считают самое большое разведение вируса, вызывающее гибель всех инокулированных эмбрионов. Среднее время гибели находят путем деления суммы часов гибели всех эмбрионов, вызванной минимальной летальной дозой, на число эмбрионов: среднее время гибели до 60 ч - велогенные штаммы; среднее время гибели от 61 до 90 ч - мезогенные штаммы; среднее время гибели от 90 и больше 100 ч - лентогенные штаммы.

Однако методы эти дорогостоящие и требуют много времени - необходимо затратить по меньшей мере 7 дн для того, чтобы дифференцировать дикие штаммы от вакцинных.

РСК. Быстрый и дешевый способ дифференциации штаммов. Диагноз ставят в течение 3 дн после получения проб. Самое слабое связывание комплемента вызывают велогенные дикие штаммы, самое сильное - лентогенные (например La, Sota), в границах между сильными и слабыми - мезогенные. Кроме того, вирулентные штаммы менее антигенны, чем вакцинные, в отношении индукции синтеза КСА у морских свинок. Самую отчетливую дифференциацию дает сыворотка морских свинок, иммунизированных штаммом Хитчнера (В₁).

Биопроба. Для идентификации проводится биопроба на восприимчивых цыплятах в возрасте не менее 6 нед. Цыплят заражают в клоаку. Несколько особей заражают в глаз, внося туда каплю вируса. За птицами

наблюдают 10 дн. Если в течение этого периода ни один цыпленок не погибает, считают, что штамм не относится к висцеротропным. Если же птицы заболеют и погибнут в течение 10 дн, производят вскрытие. В США принята следующая оценка интенсивности изменений (в баллах): точные кровоизлияния или некротические изменения в трахее - 25; точечные кровоизлияния или некротические изменения в трахее и сопутствующая им отечность трахеи и в области входа в грудную клетку - 100; точечные кровоизлияния или некротические изменения в зобе - 100; некроз и изъязвление желез слепой кишки и пейеровых бляшек - 100; точечные кровоизлияния или некротические изменения слизистой оболочки клоаки - 10; воспаление брюшины в области яичника - 10; точечные кровоизлияния в других местах - 10. Диагностика считается обоснованной, если общее число баллов достигает 150 или более.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика

Критерием, позволяющим судить о персистенции вирулентного вируса в стаде, являются титры АТ в сыворотке крови птиц. Исследования проводят только с парными сыворотками, полученными от одних и тех же птиц. Первую пробу берут перед вакцинацией (или в начале болезни), вторую - на 15-20-й день, последующие один раз в месяц. Применяют РТГА, РРГ, ELISA.

Дифференциальная диагностика. НБ следует дифференцировать от ИБП, гриппа, ПМВ-2, ИЛТ, колибактериоза и микоплазмоза птиц. Для лабораторной диагностики гриппа птиц, ИБ и НБ используют диагностикумы биофабричного производства. Дифференциация вирусов гриппа, насчитывающих 14 подтипов, и парамиксовирусов, включающих 9 серотипов, возможна только в лаборатории.

Лабораторная диагностика классической чумы свиней

Классическая чума свиней (КЧС) - высококонтагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, поражением кровеносной и кроветворной систем, крупозным воспалением легких и крупнонодифтерическим воспалением толстого кишечника. Группа А по данным МЭБ.

К ВКЧС восприимчивы домашние свиньи всех пород и возрастных групп, особенно чистопородные, а также дикие кабаны.

Болезнь регистрируется главным образом в Азии, Центральной и Южной Америке, а также в некоторых регионах Европы и Африки.

Вирус чумы свиней относится к семейству *Flaviviridae*, род *Pestivirus*. Вирусную природу КЧС установили в 1908 г. Швейнитц и Дорсе.

Антигенная вариабельность ВКЧС не доказана. По вирулентности различают А-, В- и С-варианты вируса. В группу А входят вирулентные эпизоотические штаммы, вызывающие у свиней всех возрастов остро протекающую болезнь. Вирусы подгруппы В вирулентны только для поросят и при циркуляции в стаде вызывают атипичную или хроническую чуму.

Подгруппа С – американский слабовирулентный шт. 331. Установлено одностороннее родство между ВКЧС и вирусом диареи КРС: АТ к вирусу диареи КРС нейтрализуют ВКЧС, но АТ к ВКЧС не нейтрализуют вируса диареи. В сыворотке крови свиней-реконвалесцентов обнаруживают ВНА, ПА и КСА.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Эпизоотологические и патологоанатомические данные зависят от восприимчивости свиней, вирулентности штамма и комплекса мероприятий по профилактике КЧС.

Если в очаге штамм вируса вирулентный, поголовье свиней не иммунное, то болезнь характеризуется высокой контагиозностью, большей смертностью, гипертермией, геморрагическими поражениями кожного покрова, признаками поражения органов ЖКТ и ЦНС. Обращают внимание выраженный геморрагический диатез в различных органах, мраморность лимфоузлов, инфаркты селезенки, кровоизлияния в почках на фоне их анемии, катарально-геморрагический гастроэнтерит, лимфоцитарный энцефаломиелит. Однако частая вакцинация свиней против чумы создает иммунный фон, влияющий на симптомы болезни и характер патоморфологических изменений. При хроническом течении характерными изменениями являются очаговый дифтеритический налет (бутоны), коричневая экзема, фибринозный плеврит и перикардит, некроз миндалин. Хроническая болезнь часто протекает на фоне других инфекций. Правильный диагноз может быть поставлен только лабораторными исследованиями.

Экспресс-методы обнаружения вируса КЧС. Рекомендована дифференциация пестивирусов с использованием ДНК-зонда на ВКЧС. В качестве гибридизационного зонда используют комплементарную ДНК (меченую ³²P) к участку гена белка Р125. Для быстро-Д обнаружения ВКЧС в тканях с помощью ПЦР из образцов тканей животных фенольным дом выделяют препараты РНК, подвергают обратной транскрипции и амплифицируют ПЦР. Используемые "гнездовые" праймеры позволяют амплифицировать разные изоляты ВКЧС. ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет дифференцировать различные пе-

стивирусы. Предложен вариант ПЦР для выявления ВКЧС с использованием 4-х праймеров для амплификации фрагментов гена белка

Е-1. Чувствительность метода составляет 10 ТЦД₅₀.

Выделение вируса. Для выделения вируса берут пробы крови, кусочки селезенки, миндалин, лимфоузлов, грудной кости, почек и легких от 2-3 животных в первые 2ч после гибели или убоя больных в атональном состоянии. Материал отбирают в стерильные флаконы, закрывают резиновыми пробками, флаконы обрабатывают снаружи 5%-ным р-ром хлорамина или осветленным 20%-ным р-ром хлорной извести, обертывают марлей, смоченной дезинфицирующим р-ром, и помещают в полиэтиленовый пакет. Взятый патматериал помещают в термос со льдом, опечатывают и отправляют с нарочным в лабораторию с сопроводительным документом. В лаборатории из каждой пробы готовят 20%-ную суспензию на 0,85%-ном р-ре NaCl, которую трижды замораживают и оттаивают, центрифугируют при 3-4 тыс. мин⁻¹ 20-30 мин. Надосадочную жидкость обрабатывают антибиотиками 1ч при 37°C и используют для выделения вируса.

Выделение вируса в культуре клеток. Используют перевиваемую культуру клеток РК-15, выращенную на стеклянных пластинках. На каждую пробу материала берут не менее 8 пробирок, в которые вносят по 0,4 мл исследуемого материала. Адсорбируют вирус 2 ч 137°C, затем его удаляют, клетки отмывают средой и заливают 2 мл поддерживающей среды с 2% сыворотки теленка. Для контроля качества культуры клеток оставляют 10 пробирок незаряженными. Инкубируют 24-96 ч. ВКЧС в культуре клеток РК-15 не вызывает, поэтому индикацию его проводят методом прямой ИФ. Через 24-96 ч после инокуляции пластинки с монослоем клеток извлекают из пробирок, подсушивают на воздухе и 10 мин фиксируют в холодном (4°C) ацетоне, подсушивают на воздухе и помещают их клетками вниз на капле ФИТЦ-Ig ВКЧС, нанесенного в рабочем разведении на предметные стекла. Препараты выдерживают во влажной камере 30 мин при 37°C, затем промывают в сосуде с 0,01 М ФСБ с рН 7,2-7,5 30-40 мин в темном месте, ополаскивают в дистиллированной воде, подсушивают на воздухе и заключают в забуференный глицерин (9 частей глицерина и 1 часть 0,01 М ФСБ с рН 7,5). Для этого на обезжиренное предметное стекло наносят каплю забуференного глицерина, помещают препарат клетками вниз и заливают края расплавленным парафином, Просматривают под люминесцентным микроскопом.

В инфицированных препаратах, обработанных ФИТЦ-Ig, АГ вируса обнаруживают по ярко-зеленому диффузному свечению цитоплазмы пораженных клеток, располагающихся группами, которые называют флюо-

ресцирующими микробляшками. Через 24-48 ч в культуре клеток РК-15 наблюдают появление микробляшек. При их отсутствии в первом пассаже проводят 2-й и 3-й пассажи испытуемого материала с последующим ИФ через 24-96 ч.

Индикация и идентификация вируса. *Гистологические исследования.* Проводят с целью обнаружения специфических изменений нервных тканей. От павших или убитых свиней берут кусочки полушария головного мозга, мозжечка, аммоновых рогов, спинного мозга в различных участках. Гистологические препараты окрашивают гематоксилин-эозином. В большинстве случаев (70-93%) в ЦНС обнаруживают негнойный лимфоцитарный энцефаломиелит, характеризующийся периваскулярными лимфоцитарными инфильтратами, очаговой пролиферацией клеток микроглии (глиальных узелков) и дистрофией ганглиозных клеток. В срезах, приготовленных из лимфоузлов, сердечной мышцы и печени, можно обнаружить присутствие ацидофильных внутриядерных телец-включений, несколько меньших, чем ядрышки. В лимфоузлах их находят на 6-12-й день после заражения.

ВКЧС обладает выраженным гематотропизмом в отношении костного мозга, содержащего большее количество бластных клеток, чем лимфоузлы и селезенка. Поэтому костный мозг поражается первым; ингибируются миелопоэтические и эритропоэтические клетки и пролиферируют крупные клетки с базофильной цитоплазмой. Наряду с этим обнаруживают картину глубокого цитолиза и дистрофию лимфопоэтических органов.

При подозрении на чуму для уточнения диагноза несколько тяжелобольных животных убивают и исследуют мазки из костного мозга грудной клетки.

Биопроба. Из благополучного по инфекционным болезням хозяйства берут поросят в возрасте 2-3 мес массой 20-30 кг. В качестве материала используют 10%-ную суспензию, приготовленную из органов (селезенки, лимфоузлов, костного мозга) или крови от павших животных. Суспензию обрабатывают антибиотиками, выдерживают не менее 4 ч при 4°C, центрифугируют и надосадочную жидкость используют для заражения животных. Трех поросатам вводят подкожно по 1 мл крови или по 2 мл суспензии органов. Двум животным исследуемый материал не инокулируют, содержат их отдельно для контроля. Двум поросатам, иммунным к ВКЧС, вводят исследуемый материал в тех же дозах с целью дифференциальной диагностики в отношении АЧС. За всеми животными наблюдают 21 день и ежедневно измеряют температуру тела.

Диагноз считают положительным, если 2 из 3-х неиммунных поросят заболевают, проявляя симптомы болезни, и погибают, а 2 иммунных

остаются здоровыми или проявляют незначительные и кратковременные (1-4 дн) признаки болезни слабой интенсивности (повышение температуры тела не выше 41°C). Однако следует иметь в виду, что при отсутствии реакции у восприимчивых животных или в случае ее недостаточной выраженности, нельзя с уверенностью исключить присутствие вируса в исследуемом материале. Отрицательный результат заражения может быть следствием либо слишком малого количества в нем вируса, либо слабой вирулентности последнего. Поэтому следующим шагом является повторное, спустя 3-6 нед после инокуляции исследуемого материала, заражение (реинфекция) подопытных свиней на этот раз вирусом с заведомо известной вирулентностью. Отсутствие у животных реакции на это заражение свидетельствует о приобретении ими иммунитета в результате первой инокуляции (бессимптомного переболевания) и косвенно указывает на присутствие вируса в исследуемом материале. Одновременно с проведением второй пробы заражают дополнительно двух восприимчивых поросят (контроль) вирусом, использованным для реинфекции.

Иногда биологическая проба себя не оправдывает или дает неясные результаты при выделении штаммов вируса, вызывающих легкое заболевание. Такие штаммы у инокулированных поросят вызывают хроническую болезнь. Дело осложняется тем, что штаммы со слабой вирулентностью могут не обладать иммунизирующими свойствами, а это не позволяет уточнить диагноз при использовании дополнительного контрольного заражения вирулентным штаммом (реинфекции). При диагностике заболевания, обусловленного такими штаммами могут понадобиться молодые животные и дополнительные пассажи для повышения вирулентности.

Предложена шкала оценки вирулентности полевых штаммов ВКЧС:

- слабовирулентные (патогенные лишь для поросят-сосунов) не иммунизирующие штаммы. Поросята-сосуны заболевают в первые дни жизни и смертность их велика, поросята-отъемыши (12-15 кг) реагируют только в определенные дни подъемом температуры тела, не приобретая иммунитета;
- слабовирулентные (патогенные для молодых животных) иммунизирующие штаммы. У животных массой 15-20 кг развивается хроническая болезнь, подсвинки массой 35 кг реагируют подъемом температуры тела, продолжающимся несколько дней. На вскрытии обнаруживаются незначительные точечные кровоизлияния. Животные приобретают иммунитет;
- сильно вирулентные штаммы вызывают у животных массой 30 кг острое заболевание, смертность 40% и больше. На вскрытии характерны геморрагические изменения.

Тест модуляции фагоцитарной активности макрофагов. Дефицит фагоцитарной функции приводит к нарушению локальных иммунных реакций с развитием воспалительных процессов на слизистых оболочках. При КЧС происходит локализация фагоцитарной функции лейкоцитов: при репродукции вакцинного шт. ЛК-ВНИВВиМ снижается процент и индекс фагоцитоза нейтрофилов и макрофагов, а при репродукции вирулентного вируса шт. Ши-Мынь повышается процент и индекс фагоцитоза нейтрофилов и снижается таковой у макрофагов. При КЧС *in vivo* и *in vitro* фагоцитарная активность лейкоцитов крови кратковременно (до 4 сут) снижается при инфицировании вакцинным штаммом и повышается у макрофагов при инфицировании вирулентным штаммом ВКЧС. Установленный в инфицированных клетках-мишенях цитопатический эффект, выражающийся в модуляции фагоцитарной активности свинных макрофагов, используют в диагностике КЧС.

Серологическая идентификация

Иммуофлюоресценция. Из проб органов (лимфоузлы, селезенка, почки, миндалины) готовят замороженные срезы. Из проб костного мозга и лейкоцитарного концентрата - мазки. Для приготовления последних берут грудную кость, делают продольный разрез и вынимают красный костный мозг, из которого делают несколько мазков. Для приготовления мазков из лейкоцитарного концентрата от больных или подозреваемых в заболевании свиней берут 15 мл крови с антикоагулянтом, энергично встряхивают, оставляют на 1 ч при комнатной температуре, затем отбирают плазму с лейкоцитами и центрифугируют 10 мин при 1000 мин^{-1} , из осадка лейкоцитов (беловатый осадок) делают 2-3 мазка. Приготовленные препараты (срезы и мазки) фиксируют в охлажденном ацетоне 10 мин, после испарения ацетона промывают 15-20 мин в ФБР рН 7,2 и окрашивают при 37°C 30 мин конъюгатом в рабочем разведении, к которому добавляют краситель Эванса в соотношении: 3 части конъюгата и 1 часть красителя, затем препарат промывают в фосфатном буфере и оставляют на 10 мин в дистиллированной воде. После частичного подсушивания на воздухе на препарат наносят забуференный глицерин (9 частей глицерина и 1 часть ФБР рН 8), покрывают покровным стеклом и микроскопируют. Аналогично ставят контроли: а) исследуемый материал и нормальный конъюгат с красителем Эванса; б) не инфицированный материал и специфический конъюгат с красителем Эванса.

При микроскопии фон препарата флюоресцирует красно-оранжевым цветом, ядра клеток темные, специфическое свечение характеризуется зеленым цветом цитоплазмы. В мазках из красного костного мозга и лейкоцитарного концентрата специфическая флюоресценция отличается боль-

шой яркостью и количеством флюоресцирующих клеток. Специфическое свечение в цитоплазме даже в отдельных клетках препаратов, полученных от подозрительных по заболеванию животных, указывает на наличие вируса КЧС. В контрольных препаратах подобного свечения не должно быть.

Указанный метод отличается специфичностью и быстротой. Однако во избежание погрешностей метода при внедрении его в лаборатории следует иметь в виду, что специфичность результатов зависит от следующих факторов: качества сыворотки-маркера (она должна иметь высокие титры, быть моновалентной, полученной от свиней, не обработанных другими АГ), качества исследуемого материала (должен быть отобран не позже 2-3 ч после смерти животного, фиксирован в ацетоне или замораживанием и сразу же отправлен на исследование). В сопроводительном письме необходимо указывать клиническую и эпизоотологическую характеристику болезни, даты и названия прививок. При учете реакции следует иметь в виду, что вакцинный вирус сохраняется в организме вакцинированных свиней до 15 дн после вакцинации и в ИФ не дифференцируется от полевого вируса.

В Болгарии для ИФ диагностики КЧС из вены больных животных получают кровь, готовят препараты лимфоцитов и лизированных эритроцитов и вносят их в пробирки с пластинками, содержащими культуру клеток СПЭВ. Через определенные промежутки времени пластинки извлекают и подвергают ИФ-обработке для выявления АГ вируса. Первые признаки размножения вируса в клеточном монослое выявляются через 12ч после заражения. Максимального развития признаки достигают через 48-72 ч. Ценность прямого метода ИФ повышается при использовании его для прижизненной диагностики путем исследования биопсированных миндалин. В Японии с этой целью сконструирован прибор.

Установлено преимущество метода для идентификации АГ вируса с использованием культуры клеток РК-15 по сравнению с исследованием гистопрепаратов или мазков-отпечатков. В случае исследования органов свиней, иммунизированных вирус-вакцинами, когда АГ вакцинного вируса еще можно обнаружить в мазках-отпечатках, существует реальная возможность получения ложноположительных результатов. Поэтому для идентификации изолятов ВКЧС чаще применяют метод флюоресцирующих АГ в культуре клеток РК-15, который, несмотря на трудосложность, характеризуется большей чувствительностью и легкостью учета результатов по сравнению с выявлением АГ в срезах ткани. Через 24-48 ч после заражения обнаруживали флюоресцирующие микробляшки из 5-30 кле-

При помощи метода ИФ в сочетании с методом культуры клеток удается диагностировать чуму почти у всех больных свиней. В таком сочетании метод позволяет обнаружить ВКЧС и в мясе вынужденно убитых животных. Для обнаружения АГ вируса в миндалинах наиболее эффективен метод непрямой ИФ с контрастированием синькой Эванса.

РНГА. Для обнаружения АГ вируса в патологическом материале из органов и тканей свиней используют следующие компоненты:

- а) АТ-эритроцитарный диагностикум;
- б) специфический АГ - вирус-вакцина КЧС;
- в) нормальный (контрольный) АГ;
- г) 1%-ный р-р нормальной лошадиной сыворотки в забуференном физиологическом р-ре с рН 7,2;
- д) формализированные и танизированные эритроциты барана;
- е) исследуемый материал.

РНГА ставят микрометодом в объеме 0,075 мл с помощью аппарата Такачи или Титертек. Готовят двукратные разведения исследуемого материала (от 1:2 до 1:512) в объеме 0,05 мл и такие же разведения контрольных АГ (специфического и нормального). Затем во все луночки вносят 0,025 мл 3%-ной суспензии эритроцитарного диагностикума. Кроме того, ставят дополнительно контроли; а) 0,05 мл 1%-ного р-ра нормальной сыворотки лошади и 0,025 мл эритроцитарного диагностикума; б) 0,05 мл исследуемого материала в разведениях и 0,025 мл формализированных и танизированных эритроцитов. После этого пластинки встряхивают и оставляют на 1,5-2 ч при комнатной температуре. Учет реакции проводят в крестах по 4-бальной системе. РНГА считают положительной при обнаружении агглютинации не менее чем на три креста в разведениях 1:8 и выше.

РДП и ИЗОФ. Реакции различаются методами получения линий преципитации: в РДП это происходит посредством свободной диффузии р-ров АГ и АТ из лунок в агаровом геле равномерно во все стороны, а в ИЗОФ АГ и АТ движутся строго навстречу друг другу под действием электрического поля, в результате чего увеличивается их концентрация в месте встречи и там образуются более выраженные полосы преципитации.

Для постановки ИЗОФ необходим специальный прибор для электрофореза, дающий регулируемое напряжение постоянного тока до 300В. ИЗОФ в несколько раз чувствительнее метода РДП, требует незначительного количества материала и позволяет получать результаты через 30 мин. Метод стандартизован, описана методика приготовления агарозного геля. Он используется для выявления АГ ВКЧС в мезентериальных лим-

фоузлах и суспензии ткани поджелудочной железы при клинических случаях болезни. Помимо АГ, данный метод позволяет выявлять и специфические АТ. Метод быстрый, легко осуществим и более чувствителен для лабораторной диагностики КЧС, чем РДП.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика

В настоящее время в лабораторной диагностике КЧС используются три метода обнаружения специфических АТ к ВКЧС: реакция нейтрализации флюоресцирующих микробляшек (РНФБ), реакция непрямой ИФ и непрямой вариант твердофазного ИФА. Наиболее эффективными методами обнаружения специфических АТ к ВКЧС являются РНФБ и ИФА. Эффективность обнаружения АТ к ВКЧС в ИФА по сравнению с РНФБ составляла 96,5%. На основании этих данных непрямой вариант ИФА рекомендован для обнаружения специфических АТ к ВКЧС.

НИФ. НИФ применяется для выявления и титрования АТ в сыворотках крови переболевших свиней. Используют зараженные вирусом перевиваемые клетки (РК-15) на стеклышках, на которых титруют испытуемые сыворотки в 2-кратных разведениях от 1:20 до 1:640 в непрямой ИФ по общепринятой методике с использованием во втором этапе реакции антисвиного ФИТЦ-Ig. Титром АТ к КЧС считают последнее разведение сыворотки, обеспечивающее зеленое свечение (на 2 креста) диффузного цитоплазматического АГ вируса при отсутствии подобного свечения в контролях с интактными тест-объектами и нормальной свиной сывороткой.

Реакция нейтрализации флюоресцирующих бляшек (РНФБ). В качестве чувствительной системы необходимо использовать перевиваемую культуру клеток РК-15, выращенную на покровных стеклах в пробирках. РНФБ проводят микрометодом, используя пластиковые панели Titertek. Суспензию клеток (в 1 мл 10-800 тыс. клеток) готовят на среде Игла (МЕМ) с 5% фетальной сыворотки крови КРС с добавлением буфера НЕРЕС. Постановка микрометодом РНФБ более производительна, чем использование макрометода. Данный метод может успешно применяться и для титрования специфических АТ. Пробы сывороток крови берут от животных не ранее 15 дн после клинического выздоровления. Перед использованием их инактивируют при 56°C 30 мин. Сыворотки разводят от 1:2 до 1:2560 и смешивают с равным объемом вакцинного вируса в количестве 100 ККИД₅₀ (клеточно-культуральных инфекционных доз), встряхивают и выдерживают 60 мин при 37°C. Каждое разведение сыворотки с вирусом вносят по 0,4 мл в 4 пробирки с культурой клеток РК-15 на стеклышках. Адсорбируют 2 ч при 37°C. Смесь сыворотка-вирус сливают, отмывают клетки средой, заливают 2 мл поддерживающей среды и инку-

бируют при 37°C. Реакцию учитывают через 48 ч инкубации. Препараты вынимают из пробирок, ополаскивают в 0,01 М ФБР pH 7,2-7,4 и обрабатывают, как указано выше (см. "Выделение вируса в культуре клеток"). Реакция сопровождается соответствующими контролями (смесь вируса со средой, гипериммунной и нормальной сыворотками и незараженная культура клеток). Отсутствие флюоресцирующих микробляшек (при наличии их в контроле вируса в смеси с питательной средой и нормальной сывороткой) в препаратах ВКЧС, обработанных гипериммунной и испытуемыми сыворотками в разведении 1:2 и выше, указывает на наличие в материалах специфических АТ. Титром АТ считают то предельное разведение сыворотки, при котором наблюдается полное подавление образования флюоресцирующих микробляшек.

Во избежание получения ложных результатов при использовании культуры клеток необходимо добавлять в среду бычью сыворотку, свободную от вируса диареи КРС и АТ. ВНА выявляются через 21 день после заражения. Обнаружение их с помощью непрямой ИФ в культуре клеток широко применяли в США на последних этапах программы искоренения болезни. Однако при интерпретации результатов следует учитывать частые случаи инаппарантной инфекции у свиней, вызванной серологически родственным вирусом диареи КРС, поэтому все положительно реагирующие сыворотки свиней необходимо исследовать и на вирус диареи.

Для массового обследования свиней на субклиническую инфекцию КЧС в ФРГ предложен тест, сочетающий РН с ИФ. В качестве тест-системы используют культуру клеток РК-15. Если у одной или нескольких свиноматок отдельного стада в сыворотке крови обнаруживают ВНА, всех поросят убивают с последующим исследованием органов ИФ.

При исследовании проб сывороток из неблагополучных хозяйств в РН (с 200-300 БОЕ патогенного шт. Альфорт 331) до 50% их оказалось положительными. Наличие АТ свидетельствовало о носительстве вируса. Вирус смогли выделить только у молодых поросят.

Описана усовершенствованная методика выявления ВНА к ВКЧС, в которой постановка теста значительно облегчена за счет использования цитолитического штамма вируса, выделенного из персистентно инфицированной перевиваемой культуры клеток JB-RS-2 и индуцировавшего четкое ЦПД в нескольких перевиваемых линиях клеток почки поросенка. Реакцию ставят в культуре клеток РК-15 на микропанелях при 38°C в термостатах с подачей CO₂. По воспроизводимости и чувствительности методика не уступает реакции с использованием метода ИФ АТ, но требует значительно меньшего труда. Предлагаемый метод обладает рядом

преимущества: исключает необходимость использования ИФ; учет результатов можно проводить без микроскопа; реакцию ставят микрометодом; используемый вирус аттенуирован. Для постановки РН необходимо вначале провести титрование ВКЧС.

Титрование ВКЧС. Поскольку титрование на чувствительных под-свинках связано с экономическими трудностями, а в культуре клеток вирус не вызывает ЦПД, то для титрования используют разработанный Менлингом в 1963 г. метод ИФ зараженных серийными разведениями вирусосодержащего материала культур клеток. Точное определение инфекционной активности вируса может быть осуществлено методом флюоресцирующих бляшек. Для этого с монослоя клеток удаляют ростовую среду и заражают каждым разведением вируса (от 10^{-1} до 10^{-6}) по 0,4 мл в 6 пробирок культуры клеток РК-15, выращенных на пластинках. После 2 ч инкубации в пробирки добавляют по 2 мл поддерживающей среды и инкубируют 72 ч при 37°C. Затем по 4 пластинки на каждое разведение вируса вынимают из пробирок и обрабатывают методом прямой ИФ, как указано выше (см. "Выделение вируса в культуре клеток").

Титром ВКЧС считают наибольшее его разведение, вызывающее образование специфического цитоплазматического АГ, выявляемого после второго пассажа вируса в культуре клеток РК-15. Титр вычисляют по методу Рида и Менча, выражая его в ККИД₅₀/объем. При рассмотрении такого монослоя в люминесцентном микроскопе обычно обнаруживают флюоресцирующие фокусы, состоящие из 20-30 инфицированных клеток. Число таких фокусов обычно соответствует числу инфекционных единиц в инокуляте. Такой метод имеет преимущества, так как инфекционные титры воспроизводимы и могут быть определены уже через 24 ч после инфицирования культуры; титр вируса обычно бывает высоким, точность метода удовлетворительная и результаты можно получить уже через 24 ч. Однако метод довольно сложен, чтение результатов под микроскопом при массовых исследованиях утомительно. Метод обладает тем важным преимуществом, что позволяет идентифицировать и титровать даже ослабленный, применяемый в качестве живой вакцины вирус. Установлена некоторая разница между титрами вируса по ЦПД, ИФ и титром патогенным для свиней.

ИЭОФ. Используется в 1%-ной агарозе как диагностический при выявлении АТ к ВКЧС в сыворотках зараженных свиней. Для исследования применяется АГ, экстрагированный из зараженных ВКЧС клеток РК-15. Показано, что этот культуральный АГ ВКЧС идентичен преципитирующему АГ вируса, экстрагированного из ткани селезенки зараженных свиней. Обнаружено, что ПА к ВКЧС появляются в сыворотках через

2-3 нед после заражения животных слабовирулентными штаммами или модифицированным живым вакцинным штаммом. Выявлено, что метод ИЭОФ в 2-16 раз чувствительнее, чем иммунодиффузия в агаровом геле. Несмотря на меньшую его чувствительность по сравнению с РН, результаты, полученные с помощью ИЭОФ, хорошо согласуются с результатами, полученными методом подавления бляшкообразования. Считается, что ПА к ВКЧС могут персистировать до 3 лет после 1-кратной вакцинации шт. С. Методом ИЭОФ невозможно было дифференцировать АТ к ВКЧС от АТ к вирусу диареи КРС; при получении положительных результатов необходимо сочетать его с РН.

ИФА в непрямой модификации. На миллипоровские фильтры (тип ОН, диаметр пор 0,3 мкм), диаметр которых равен 0,6 см, смоченные р-ром АГ ВКЧС, наносят свиные сыворотки. Затем фильтры инкубируют в р-ре кроличьего IgG (против IgG свиньи), меченого пероксидазой хрена RZ=3,0. Активность связанной пероксидазы определяют в р-ре субстрата 3,3-диаминобензидина. Опытные образцы окрашивались в коричневый цвет, контрольные оставались бесцветными. Реакция громоздкая.

ELISA. Разработан метод определения АТ к ВКЧС на микроплатах, поддающийся автоматическому анализу. Описана методика получения очищенного и концентрированного АГ для теста ELISA из шт. Альфорт, размноженного в культуре клеток РК-15. Результаты ELISA и РН близки. ELISA легок в выполнении, дешев, позволяет быстро исследовать большое количество образцов, высокочувствителен и рекомендован в качестве метода оценки при крупномасштабных обследованиях.

С использованием иммуноглобулинов баранов, инфицированных ВКЧС, разработана технология изготовления ИФ-конъюгатов, пригодных для выявления вирусного АГ в патологическом материале. При постмортальной диагностике вирус выявляется со 100% эффективностью без биологического накопления. При экспериментальном заражении вирус в пробах мочи и крови обнаруживали через 8-10 ч, при контактном заражении - через 72-96 ч. Положительные результаты при индикации ВКЧС в объектах ветеринарного надзора (зерно, почва, вода) получены при концентрации вируса, превышающей 100 ИД₅₀/мл (мг) (100). Показано успешное применение ИФА для выявления ВКЧС в культуре клеток РК-15.

Описано получение монАТ для диагностики КЧС на мышах линии BALB/c 4-кратно иммунизированных ВКЧС (шт. Альфорт). Клетки селезенки мышей "сливали" с миеломными клетками Sp2/0. Полученные гибридомы культивировали в 20% среде ДМЕМ Ну-Нт при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Продуцирующую специфические АТ культуру дважды субклонировали и после определения изотипа АТ инокулировали интрапери-

тонеально мышам BALB/c. Образующаяся асцитная жидкость содержала высокие концентрации монАТ, которые после соответствующей очистки конъюгировали пероксидазой хрена.

Разработан способ изготовления иммуноферментных конъюгатов для ИФА с использованием монАТ к ВКЧС с сохранением активности фермента и высокой специфической активностью иммуноглобулина, а также метод флюоресцирующих зондов (МФЗ), который не уступал по чувствительности и специфичности МФА. Разработан метод выявления ВКЧС методом молекулярной гибридизации и ПЦР.

Дифференциальная диагностика. КЧС необходимо отличать от африканской чумы, пастереллеза, сальмонеллеза, рожи, БА, ВД-БС, паратриппа и гриппа. При африканской чуме ярче выражен геморрагический диатез, увеличена и размягчена селезенка, полнокровие и кровоизлияния в почках. Чаще поражаются, имея вид кровяных сгустков, порталные, почечные и брыжеечные лимфоузлы. Сильно выражен отек интерстициальной ткани легких, скопление в грудной полости кровянистой жидкости. Редко отмечают инфаркт селезенки, постоянно - тотальный распад лимфоцитов и тканей лимфоидных органов. Для дифференциации ставят тест перекрестного иммунитета, тест гемадсорбции и РИФ.

Пастереллез, как правило, не принимает характера эпизоотии, поражает преимущественно взрослых животных. Для него характерны отек подкожной клетчатки подчелюстного пространства, распространяющийся на шею и глотку, серозный лимфаденит, фибринозно-некротизирующая пневмония, слабо выраженный геморрагический диатез. Кроме того, обнаруживают возбудителя при бактериологическом и биологическом исследованиях.

Рожа обычно возникает в летний период года и характеризуется стойкими явлениями кожи (рожистая эритема) и во внутренних органах, увеличением селезенки, гломерулонефритом и катаральным гастроэнтеритом. Рожу свиней диагностируют выделением возбудителя. Не исключено одновременное течение чумы и рожи. В этом случае диагноз ставят на основании биологической пробы на чуму и бактериологического исследования на рожу.

Сальмонеллез наблюдают спорадически и энзоотически среди молодняка 1-5-мес возраста. Характеризуется слабым геморрагическим диатезом, развитием в толстом кишечнике плоских рыхлых струпьев и язв, а не "бутонов", очаговыми некрозами печени. Результаты бактериологических исследований являются также основанием для дифференциации КЧС.

Грипп и парагрипп свиней исключаются вирусологическим исследованием материала, взятого из верхних дыхательных путей (наличие ГА вируссодержащего материала в первых пассажах на КЭ, гемадсорбции в культуре ткани, цитоплазматических включений при риноцитоскопии).

Болезнь Ауески чаще наблюдается среди поросят. Проводят вирусологические исследования и биопробу на кроликах.

Вирусную диарею у инфицированных свиней устанавливают с помощью ПЦР, поскольку большой неструктурный протеин пестивирусов 125 кД высоко консервативен, а мажорный протеин конверта *gp.53* четко различается у ВКЧС и диареи КРС.

Лабораторная диагностика инфекционного гастроэнтерита свиней

Инфекционный гастроэнтерит свиней (ИГС) (трансмиссивный гастроэнтерит свиней -ТГС) - остро протекающая высококонтагиозная болезнь, главным образом поросят до 3-мес возраста.

Проявляется рвотой, тяжелой диареей и высокой смертностью (часто до 100%) среди поросят до 2-нед возраста. ИГС первыми описали Доил и Хитчингс (США) в 1946г.

Распространенность в большинстве европейских стран составляет около 100%.

В естественных условиях к вирусу восприимчивы свиньи и собаки. Собаки могут быть носителями вируса, инаппарантным источником для восприимчивых свиней.

Вирус инфекционного гастроэнтерита свиней (ВИГС) – сем. *Coronaviridae*, род *Coronavirus*. ВИГС впервые выделил и описал японский исследователь Тайима (1970г).

Штаммы вируса, выделенные от животных в разных странах, серологически идентичны, хотя в последние годы появились варианты.

ВИГС имеет 1 серотип, не имеет связи с вирусом энзоотической диареи свиней.

Существует иммунологическое различие между кишечным и культуральным ВИГС. В 1977г установлено АГ родство ВИГС с вирусом инфекционного перитонита кошек (ВИПК), а также коронавирусом собак (КВС).

Вирус ИГС обладает выраженной АГ активностью и индуцирует синтез ВНА. ВИГС агглютинирует эритроциты цыплят, морских свинок и КРС.

Для выращивания ВИГС применяют: первичные КК тестикул, кожи, легких, щитовидной железы, тощей, подвздошной кишок, эпителия слизистой оболочки носовой полости и перевиваемые клетки тестикул поросенка (ЦПД после предварительной адаптации, синцитий, бляшки в КК щитовидной железы свиньи и в перевиваемой линии клеток семенников свиней); органы культуры пищевода; суспензионную культуру линии клеток почки поросенка ППК-666. Для выделения вируса наиболее пригодны культура клеток щитовидной железы свиньи и перевиваемая линия РК-15.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни и результатов лабораторных исследований. Лабораторная диагностика включает изоляцию вируса из органов погибших поросят, идентификацию его в РН и РИФ в культуре клеток и выявление специфических АТ в сыворотках крови больных и переболевших животных. В качестве экспресс-диагностики используют РИФ для обнаружения вирусного АГ в органах животных.

Выделение вируса. Для исследования в лабораторию направляют тонкий кишечник (тощую и подвздошную кишки с содержимым) и мезентериальные лимфоузлы от поросят в начальной стадии проявления клинических признаков болезни (первые часы диареи). Кроме того, целесообразен отбор органов и тканей (кусочков лёгкого, печени, селезёнки, почек, головного мозга). Патологический материал от трупов, пролежавших более 2 ч или гибели, для исследования не пригоден. Материал необходимо брать от 8-9 больных поросят 3-5 поражённых помётов (по 2-3 поросёнка из помёта). От каждого поросёнка берут пробы массой 10 г. Отрезок кишки длиной 10-12 см перевязывают и берут с содержимым. Пробы патматериала доставляют в лабораторию в плотно закрытых стеклянных флаконах, помещённых в сосуд Дьюара с жидким азотом или в термос с сухим льдом. Для серологических исследований направляют парные сыворотки крови от свиноматок, в помётах которых болеют новорождённые поросята, взятые с интервалом в 21 день. Вирусосодержащий материал сохраняют в активном состоянии в течение нескольких лет при температурах минус 20:-70°C. При -28°C вирус остаётся активным около 3,5 лет. При 4°C он может сохраниться в течение 1-го мес. В связи с фоточувствительностью вируса все вирусосодержащие материалы следует защищать от действия света. С целью длительного сохранения патологический материал (фрагменты кишечника) можно замораживать до -30:-70°C и использовать по мере надобности в течение 2-3,5 лет. Для вирусологических исследований оттаиванию подвергают лишь необходимую часть патологического материала. Исходный материал стараются посто-

янно держать в глубоко замороженном состоянии. Упаковка должна надёжно предохранять материал от какого-либо воздействия на него жидкого азота. Для выделения вируса из органов поросят (отдельно паренхиматозных органов и кишечника) готовят 10%-ную суспензию на р-ре Хенкса по общепринятой методике и после проверки её на стерильность используют для заражения чувствительной системы (культура клеток, поросята).

Заражение культуры клеток. Выделение вируса проводят на первичных и перевиваемых линиях клеток поросят (почек, щитовидной и слюнных желез, тестикул). Материалом каждой пробы инокулируют не менее 4-8 пробирок с культурой клеток. Для исследования методом ИФ заражают культуру клеток, выращенную на стеклышках. Её просматривают ежедневно в течение 5-7 сут. При отсутствии ЦПД в первом пассаже проводят 5-7 последовательных пассажей. Обычно ЦПД вируса наступает через 2-7 пассажей и характеризуется набуханием, утолщением с последующим укорочением и округлением клеток до полного разрушения мюнослоя. Идентификацию выделенного вируса проводят в РИФ и РН.

Заражение восприимчивых животных. В связи с наличием большого количества штаммов ВИГС, не обладающих ЦПД, биопроба на восприимчивых поросятах - надёжный метод выделения вируса. У зараженных животных вирус сравнительно легко удаётся выделить из фекалий, однако в наивысших концентрациях он содержится в слизистых оболочках тонкого кишечника, особенно двенадцатиперстной и тощей кишок. Уже через 24-72 ч после клинического проявления болезни титры вируса в этих тканях достигают 10^6 - 10^7 ИД₅₀/г. Поэтому, если необходимо выделить вирус, поросят убивают через 24 ч после появления диареи и полученные от них материалы (содержимое и соскобы слизистой тонкого кишечника) подвергают вирусологическому исследованию. В крови и почках поросят вирус удаётся обнаружить через 24-48 ч после заражения, но титры его обычно низкие - 10^1 - 10^2 ИД₅₀ лишь изредка концентрация вируса в почечной ткани может достигать 10^5 - 10^6 ИД₅₀/г.

У новорожденных поросят, зараженных интраназально, через 2 ч после заражения вирус может быть обнаружен в ткани легких (титры до 10 ИД₅₀/г), а у поросят, зараженных интраназально в 6-дн возрасте, вирус может быть обнаружен в слизистой оболочке носа (титры до 10 ИД₅₀/г). Для подтверждения диагноза важно также исследование в РН парных слювороток, 1-ую из них берут на 3-5-й день после начала болезни, а 2-ую (от выживших животных) - через 1-2 нед.

Для биопробы можно использовать супоросных свиноматок за 3-5 дн до опороса. Свиноматку заражают 10%-ной суспензией, приготовленной

из пораженных стенок тонкого кишечника вынужденно убитых больных поросят, или вирусосодержащей культуральной жидкостью. Исследуемый материал вводят per os в количестве 10 мл. Контролем служит 2-я су-поросная свиноматка. Биопробу считают положительной, если через 24 ч (реже через 48ч) поросята, родившиеся от зараженной свиноматки, заболевают с клиникой ИГС. В сомнительных случаях проводят исследования органов от вынужденно убитых в атональном состоянии поросят подопытной группы на наличие вируса методами РИФ и РН.

Индикация и идентификация вируса

Электронная и иммуноэлектронная микроскопия. Возбудителя болезни определяют по ультраструктуре, выявляемой с помощью негативного контрастирования, а также маркировки вируса гипериммунной сывороткой. За положительные результаты ЭМ считают наличие в препаратах вирионов размером 70-120 нм, на оболочке которых размещены булавовидные шипы, характерные для коронавируса. В препаратах, обработанных иммунной сывороткой к вирусу, на оболочках вирионов обнаруживают скопления белковых молекул. В контрольных препаратах, обработанных гетерологичной иммунной сывороткой, таких скоплений нет. Иммуноэлектронная микроскопия более чувствительный метод.

Гистологические исследования. Кусочки ткани двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок фиксируют в 10%-ном забуференном р-ре нейтрального формалина, готовят из них гистологические препараты при помощи обычных методов и исследуют под микроскопом на наличие поражений, характерных для ИГС. Особенно характерно наличие атрофии кишечных ворсинок, которая наиболее ярко выражена в первые 3-4 дн после начала болезни. Соотношение длины ворсинок тощей кишки к глубине крипт у здоровых животных составляет 7:1, у больных ИГС около 1:1. Наиболее характерными изменениями являются выраженная дегенерация эпителия слизистой оболочки кишечника, поверхностный некроз эпителия кишечника и кишечных ворсинок. Для уточнения диагноза в условиях практики рекомендуется убить 2-3 больных поросят, взять небольшие участки тощей и подвздошной кишок (10-15см), продольным разрезом вскрыть слизистую оболочку, осторожно промыть её физиологическим р-ром и погрузить в дистиллированную воду, затем посмотреть под лупой при увеличении в 60-80 раз (например, МБС 6 или МБС 9) и верхнем освещении на предмет состояния ворсинок. Укорочение их служит подкрепляющим патологоанатомическим тестом в подозрении на ИГС. Контролем при этом служит аналогичная часть кишечника от клинически здорового поросенка или передний отрезок (5-7 см от пилориче-

ского сфинктера) 12-перстной кишки. Помимо атрофии ворсинок в тонком кишечнике, в протоплазме эпителиальных клеток выявляют вакуоли.

Взаимодействие вируса с энтероцитами тонкого кишечника сопровождается глубокими деструктивными изменениями их апикальной части, а в более поздние сроки болезни - всей клетки. Для этих изменений характерны полная потеря микроворсинок, нарушение целостности плазматической оболочки и полный лизис клетки. Вследствие указанных поражений энтероциты кишечника не способны выполнять нормальные процессы адсорбции, всасывания, пристеночного пищеварения и другие физиологические функции.

Метод интерференции. Встречаются полевые штаммы ВИГС, которые хорошо размножаются в клеточных культурах, но не проявляют ЦПД. Для обнаружения нецитопатогенных изолятов в монослое культур клеток свинных почек используют феномен интерференции. Такие шт. тормозят развитие ЦПД в культурах клеток, инфицированных ВД-БС КРС. Аналогичные результаты получены и при применении интерферогенных шт. ВБА.

Метод иммуноцитоллиза. Метод иммуноцитоллиза использовался в Чехословакии для идентификации ВИГС в культуре клеток СПЭВ.

ИФ. Её используют для быстрой индикации и идентификации АГ ВИГС в культуре клеток, инфицированных вирусным материалом, а также мазках-отпечатках, гистологических срезах патологического материала (фрагментов тонкого кишечника) от животных, естественно-больных или заболевших после экспериментального заражения. РИФ применяют в прямом и непрямом вариантах по общепринятым методикам. ИФ считается положительной при наличии в препаратах ярко-зеленого свечения клеток или цитоплазмы с ярко светящимися гранулами разного размера при отсутствии флюоресценции в контрольных препаратах. Свечение лейкоцитов и дегенеративно измененных клеток не учитывается. Выявление вируса может быть успешным, если исследования проводятся на поросятах не позднее чем через 24 ч после их заболевания. Наибольшее количество флюоресцирующих эритроцитов обнаруживают до и с наступлением диареи, позже число их невелико. Наиболее эффективным методом диагностики болезни оказалось исследование в РИФ замороженных срезов тощей кишки животных, убитых в период острой фазы заболевания. Однако, по мнению других исследователей, метод мазков-отпечатков миндалин с помощью прямой РИФ превосходит исследования тощей кишки.

Для ИФ диагностики ИГС применяли меченый конъюгат против вирусного перитонита кошек. Такие конъюгаты готовили из перитонеаль-

ной жидкости большой кошки с титром АТ в жидкости не ниже 1.2560. Конъюгат анти-ВИГС получают из иммунной сыворотки поросят, свободных от патогенной микрофлоры, титр АТ 1:256. При исследовании срезов слизистой оболочки тонкого кишечника поросят, зараженных вирусом, получены одинаковые результаты с конъюгатом анти-ВИПК и анти-ВИГС равной интенсивности свечения. При исследовании с помощью конъюгата анти-ВИГС срезов селезенки кошек, зараженных ВИПК, получены отрицательные результаты. Это свидетельствует об одностороннем антигенном родстве между этими вирусами. Таким образом, для диагностики ИГС можно с успехом использовать конъюгаты анти-ВИПК. Поскольку наличие у кошек АТ к вирусам свиней маловероятно, перитонеальная жидкость, полученная при заражении вирусом перитонита, может служить хорошим препаратом для изготовления диагностического конъюгата. Конъюгаты к ВИГС, полученные из иммунной сыворотки поросят, могут давать неспецифическую флюоресценцию.

Для диагностики ИГС ИФ в качестве источника АТ предложено иммунное молозиво. Показано, что концентрация иммуноглобулинов в молозиве даже выше, чем в сыворотке крови. ИФ как метод диагностики имеет ряд проблем, главная из которых наличие перекрестной реакции с ВИПК, КВС и РКВС. Поликлональные АТ не дифференцируют ВИГС и РКВС, некоторые монАТ реагируют с ВИГС и не реагируют с РКВС. Такая дифференциация может быть проведена как в ИФ, так и в ИФА. РКВС обнаруживается в респираторных тканях и эпителиальных клетках носовой полости, но тем не менее для дифференциации необходимо использовать монАТ, поскольку ВИГС может также реплицироваться в указанных органах.

РН. При выделении вируса в культуре клеток его идентификацию проводят с помощью РН, используя 1000 ТЦД₅₀ вируса и 20 нейтрализующих доз сыворотки (вирус и сыворотку предварительно титруют).

Помимо культуры клеток для идентификации вируса, изолированного в биопробе, ставят РН на восприимчивых поросятах в возрасте 1-5 дн.

ВИЭОФВ. Вирус ИГС в этой реакции образует 1-2 линии преципитации с гомологичными сыворотками и может быть легко выявлен в экстрактах из содержимого кишечника экспериментально зараженных поросят. Богатая АГ структура (наличие трех АГ с различной электрофоретической подвижностью) позволила использовать для его обнаружения модифицированную методику ВИЭОФ (двойной ВИЭОФ), повышающую результативность.

ELISA. Разработан ELISA - метод с использованием монАТ и поликлональных АТ для выявления АГ ВИГС в различных материалах:

культуральном и очищенном вирусах, смывах тонкого кишечника или фекалиях экспериментально инфицированных поросят. Метод пригоден для обнаружения вирулентного полевого штамма, не адаптированного к культуре клеток. Метод специфический, быстрый и недорогой.

Идентификация с помощью монАТ. Показано существование 6 различных эпитетов ВИГС (шт. ТО-163). Антигенная вариабельность вируса имеет эпизоотологическое значение и должна подтверждаться с помощью монАТ. Метод гибридизации нуклеиновых кислот недавно разработан для обнаружения ВИГС по геномной последовательности в образцах кала или инфицированных тканей. Остатки (фрагменты) РНК 5'-конца ВИГС пепломерного гена не отличаются от ВТГС и РКВС. В исследованиях избирательно дифференцировали кишечные ВИГС изоляты из США, Японии, Англии, живые аттенуированные ВИГС вакцинные штаммы из США, изоляты РКВС, ВИПК и КВС.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика

РН. Диагноз на прошедшую инфекцию обычно ставят при помощи РН в культуре клеток, определяя титры ВНА в сыворотках крови реконвалесцентов. Для этого используют постоянную дозу вируса (100-1000 ТЦД₅₀) и двукратные разведения испытуемой сыворотки, которую предварительно инактивируют 30 мин при 56°C. Для более точной диагностики лучше исследовать парные сыворотки, взятые с интервалом 3-4 нед. Титры АТ у переболевших животных могут колебаться от 1:8 до 1:1280. ВНА обычно появляются на 7-8-й день после заражения и циркулируют в крови 18 мес. На 14-й день титр их у свиноматки, 3-дн и 3-нед поросят достигает 1:128 - 1:1024, а у отъемышей и откормочных свиной - 1:32-1:256, с 3-4 мес титр медленно снижается, через год он уже на 2-3 разведения ниже максимального. У некоторых: свиноматок, наоборот, титр АТ резко снижается. Колостральные АТ обычно исчезают у поросят в возрасте 3-4 мес, в связи с чем обнаруженные у животных в это время ВНА следует относить за счет инфекции.

Для выявления и титрования АТ предложен микрометод РН с использованием микропланшетов. Сначала готовят двукратные разведения исследуемых сывороток (от 1:4 до 1:256) в объеме 0,05 мл, затем во все лунки микропипеткой вносят по 0,05 мл вируса, содержащего 100 ТЦД₅₀. После часовой инкубации при комнатной температуре во все лунки вносят по 0,05 мл суспензии клеток почек или щитовидной железы свиной в концентрации 300 тыс. клеток в 1 мл питательной среды, содержащей 30% инактивированной телячьей сыворотки. Пластины с культурой клеток выдерживают в термостате при 37°C в течение 4 да с 5% СО₂. Контролем РН служат 8 лунок с незараженной культурой клеток. Реакцию

учитывают через 48-96 ч при условии наличия ЦПД в лунках, инфицированных вирусом в разведении 10^{-1} и 10^{-2} , и в лунках, инфицированных смесью вируса с отрицательной сывороткой, и при отсутствии ЦПД в лунках, инфицированных смесью вируса со специфической сывороткой, и в лунках, не зараженных вирусом. Положительными считают сыворотки, которые в разведении не ниже 1:4 полностью нейтрализуют 100 ТЦД₅₀ вируса.

Тест нейтрализации бляшкообразования более чувствителен, чем РН, Титр АТ в нем колеблется от 1:100 до 1:5000, а в РН- 1:10 до 1:160.

РНГА. Используют для определения АТ в парных сыворотках крови больных животных, а также для контроля за эпизоотическим состоянием племенных хозяйств-репродукторов в отношении гастроэнтерита. При этом у 5% поголовья 2 раза в год выборочно исследуют сыворотку крови на наличие АТ к вирусу. РНГА ставят в макро - и микровариантах по общепринятой методике. Положительными считают сыворотки, которые в разведении 1:16 и выше вызывают агглютинацию эритроцитарного диагностикума. РНГА более чувствительна, чем РН. АТ у заражённых поросят выявляются на 4-й день. РНГА используют как для подтверждения клинического диагноза, так и для выявления скрытых форм болезни и вирусносительства. Реакция позволяет выявлять антитела к ВИГС в 2 раза чаще, чем РН. В бывшем СССР разработан эритроцитный диагностикум, с помощью которого можно выявить специфические АТ у вакцинированных и больных ИГС.

ИФ. Описана модификация этого метода, обеспечивающая быстрое выявление и титрование АТ к ВИГС. Сущность её заключается в приготовлении большого количества тefлонизированных стёклышек с лунками, содержащими АГ ВИГС. Их получают путём посева в лунки смеси инфицированных и неинфицированных клеток перививаемой линии свиной тестикулов. Стёклышки помещают в чашки Петри, которые инкубируют 16-18 ч в термостате с газовой смесью воздуха, содержащей 5% CO₂. Около половины клеток в каждой лунке оказывались инфицированными вирусом, что обеспечивает контрастность, помогающую определить специфическую флюоресценцию в присутствии разной степени фонового окрашивания. После фиксирования ацетоном стёклышки можно хранить до использования в НИФ при минус 20°C. Сравнение этой модификации с РН, показывает что по чувствительности она не уступает, обладая рядом преимуществ: быстротой получения результатов (3 ч по сравнению с 4-6 дн для РН); простотой постановки; значительно меньшим расходом культуры клеток; возможностью хранения полученных препаратов в замороженном состоянии в течение нескольких месяцев.

Важным оказалось также то обстоятельство, что токсичность исследуемых сывороток, часто существенно осложняющая проверку их в РН, не является препятствием для получения результатов.

РДП. Позволяет выявлять АТ к ВИГС. АГ в данной реакции служит щелочной экстракт содержимого кишечника поросят, зараженных ВИГС.

ELISA. Успешно используется для выявления и количественного определения сывороточных АТ к ВИГС. При исследовании сывороток от поросят, инокулированных культуральным или кишечным ВИГС, ELISA выявлял АТ к вирусу в среднем на 3 дня раньше, чем РН при исследовании проб сывороток от поросят, зараженных культуральным вирусом, и на 1 день раньше при обследовании сывороток от поросят, зараженных кишечным вирусом, причём титры АТ в ELISA превышают титры ВНА. Имеются и другие достоинства ELISA по сравнению с РН, в частности, на результаты реакции не влияет присущая некоторым полевым сывороткам цитотоксичность. С 1981 г. этот тест в двух вариантах - косвенный и послойный (двухсэндвичный) - успешно используется в ветеринарной практике Италии. Интересно, что с его помощью можно количественно оценивать Ig 3 классов: G, M и A. Модифицированный автордиографический тест для выявления АТ к вирусу ИГС был предложен в 1983 г. в Чехословакии.

Метод блокирования ELISA. Этот метод используется для дифференциации ВИГС и РКВС с помощью монАТ. В блок-ELISA АГ ВИГС реагирует с сывороткой к ВИГС или монАТ к РКВС.

РТГА. ВИГС обладает ГА активностью в отношении эритроцитов цыплят, морских свинок и КРС, но не агглютинирует эритроциты гусей и мышей. Наиболее высокие титры ГА отмечены при 4°C. Поскольку специфическая антисыворотка к вирусу ингибирует ГА, то для серодиагностики ИГС можно использовать РТГА. Титры гемагглютининов в свиных сыворотках коррелируют с титрами ВНА. РТГА с культуральным вирусным АГ ставят на физиологическом р-ре (рН 7,2) с эритроцитами морской свинки в концентрации 0,6% при температуре смеси 4°C, учёт реакции проводят через 1,5-2 ч. Установлена зависимость ГА активности вируса от его инфекционной активности. Определены оптимальные условия постановки РТГА для обнаружения АТ к вирусу ИГС в сыворотках крови свиной. Показана пригодность ее для исследования полевых материалов - сывороток крови и молока свиноматок на наличие специфических к ВИГС АТ. Выявлена корреляция между уровнем АТ, выявляемых в РТГА, и иммуноферментным методом.

Дифференциальная диагностика. В полиэтиологической структуре вирусных гастроэнтеритов свиной доминируют прота - и коронавирусы,

вызывающие диарейный синдром. ИФА даёт возможность проведения широкого эпизоотологического анализа и дифференциации указанных болезней.

Лабораторная диагностика ротавирусной диареи свиней

Ротавирусы - важнейшие энтеропатогены неонатального периода животных многих видов, включая свиней. Энтеропатогенность ротавирусов свиней (РВС) подтверждается способностью вызывать тяжелые гастроэнтериты и атрофию ворсинок в экспериментальных условиях у поросят-гнотобиотов и поросят, не получавших молозива, в отсутствие других возбудителей. Ротавирусная инфекция свиней (РВИС) наблюдается во всех странах с развитым свиноводством.

Для диагностических исследований отбирают образцы кала или содержимого кишечника при остром заболевании. Наибольшая концентрация РВС отмечается в течение 12-24 ч после начала диареи.

Для выявления РВС используют ряд методов, включая ЭМ, ИЭМ, ИФА, изоляцию, реакцию латекс-агглютинации, дот-блот-гибридизации, РНК-электрофоретипирование.

Индикация вируса. ЭМ и ИЭМ. Это основной метод выявления вируса. Он позволяет обнаруживать различные группы РВ. Морфология и тип вирусных частиц, обнаруживаемые в негативно контрастированных препаратах, изменяются при окрашивании и зависят от серогрупп РВС. Негативное окрашивание фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК) при нейтральном рН выявляет предпочтительно 1-слойные капсиды, тогда как ФВК при рН 4,5 или уранилацетат выявляют 2-слойные частицы. Ядро частиц выявляется у РВС группы В. ИЭМ позволяет дифференцировать различные серогруппы РВС.

ИФА. Часто используется для выявления вирусспецифического АГ в фекалиях или содержимом кишечника и более чувствителен, чем латекс-агглютинация, но менее чувствителен чем ЭМ. Электрофоретипирование вирусной РНК часто используется для обнаружения и дифференциации серогрупп РВС, но эти результаты должны быть подтверждены серологически. Дот-блот-гибридизация используется как альтернатива для индикации и идентификации групп РВ и их серотипов.

Выделение вируса. У 90-100% поросят до 5-6-нед возраста можно обнаружить РВ в фекалиях. Продолжительность экскреции вируса, как правило, не превышает 1 нед. Изоляты получены из фекалий в клеточных культурах (клетки МА-104). На различном числе пассажей наблюдался типичный ЦПЭ, вирусный АГ обнаруживали в цитоплазме инфицирован-

ных клеток в ИФ. Адаптация РВ к клеточным культурам подтверждена также с помощью I методов ЭМ и ИФА.

Серологическая диагностика. Разработан метод гемагглютинации и РТГА с РВС I (шт. S-80). ГА вируса получают при репродукции его в клетках МА-104, предварительно обработанных трипсином. Вирус агглютинирует эритроциты человека типа А, В и О, морской свинки и свиней. Титр РГА с эритроцитами морской свинки равен 1:8 - 1:128. Максимальный титр ГА отмечен при инкубации вируса с эритроцитами в течение ночи при 4°C. Титр I АТ к РВ со шт. S-80 в РТГА достигает 1:320 и коррелирует с РН ($r=0,66$). Серологическая (ретроспективная) диагностика имеет небольшое значение в диагностике РВИС, поскольку АТ широко распространены в стаде. Однако титр АТ и серотип отражают иммунный статус животных. Помимо вышеописанной реакции АТ к РВС могут выявляться в непрямой ИФ. Для этого линию клеток МА-104 заражают одной из групп РВС (А, В или С). После культивирования клетки фиксируют в смеси ацетон-метанол и используют в качестве АГ в непрямой ИФ. С этой же целью можно использовать криосрезы слизистой оболочки кишечника больных поросят. В непрямой ИФА и РТГА обычно выявляют АТ к групповому АГ. ИФА, комбинированный с типоспецифическими монАТ, используют для определения классов АТ к РВС. ВНА выявляются в реакциях подавления бляшкообразования или подавления фокусов ИФ.

Лабораторная диагностика болезни Тешена

Болезнь Тешена - вирусная болезнь свиней, характеризующаяся развитием негнойного энцефаломиелита и появлением параличей. Болезнь проявляется клиническими признаками поражения центральной нервной системы (гиперстезия, мышечный тремор, нистагм, опистотонус, тонико-клонические судороги, "ходульная походка", параличи конечностей мышц шеи, глотки). Очень часто данную болезнь свиней описывали под различными самостоятельными названиями: полиомиелит лошадей, болезнь Талфана, энцефаломиелит поросят, болезнь Клобука и др. Болезнь Тешена регистрируется во всех странах с развитым свиноводством.

Для выделения вируса из ЦНС необходимо отбирать пробы тканей от свиней с нервным синдромом на ранней стадии его проявления. У животных с признаками параличей уже через несколько дней вирус не обнаруживается в ЦНС. Вирус может быть выделен в культурах клеток из спинного мозга, коры головного мозга или мозжечка.

Идентификацию вируса проводят на основе физико-химических характеристик, ИФ или ИФА. Для выявления АТ широко используется ЕЛІЗА. При дифференциальной диагностике следует исключить БА, бешенство, КЧС, отравления хлоридами и соланином. Диагноз на прошедшую инфекцию, а также латентное вирусоносительство ставят на основании определения титров АТ в сыворотках крови реконвалесцентов в РИ в культуре клеток почки свиньи с использованием лабораторных штаммов вирусов болезни Тешена, Талфана и Т-80.

Для ускоренной диагностики болезни, а также выявления концентрации вируса в органах и тканях используют ИФ. В первые 3 дня болезни наблюдают специфическое свечение цитоплазмы нейронов всех исследованных отделов ЦНС, клеток межпозвоночных узлов, отдельных клеточных элементов селезенки, мезентериальных лимфоузлов, слизистой толстого кишечника. Но начиная с 4 сут свечение в нервных элементах и других тканях резко снижается, а на 5-7-е сут энтеровирусный АГ выявляют лишь в эпителии слизистой кишечника. Вот почему для диагностики энзоотического энцефаломиелита свиней кроме тканей (мозжечок, продолговатый и спинной мозг), рекомендуемых инструкцией для ИФ, необходимо отбирать и кусочки слизистой ободочной кишки. При прижизненной диагностике и определении у животных вирусоносительства разработан и внедрен в производство прямой метод флюоресцирующих АТ в мазках - отпечатках со слизистой прямой кишки и фекалий. Положительную ИФ в мазках наблюдают в эпителиоцитах и их обломках в течение всей болезни, а у переболевших (вирусоносителей) - до 2 мес.

Лабораторная диагностика репродуктивного и респираторного синдрома свиней

Репродуктивный и респираторный синдром свиней (РРСС, "синее ухо, голубой аборт", эпизоотический поздний аборт свиней) - вирусное contagiousное заболевание главным образом свиноматок, характеризующееся абортами, наличием мертворожденных поросят, преждевременными опоросами или задержкой опороса, респираторными нарушениями, появлением окрашивания кожи ушей и других органов. Регистрируется во многих странах.

Диагноз на РРСС ставят на основании клинико-эпизоотологических данных и результатов лабораторных исследований. Лабораторная диагностика основана на выделении вируса, серологических исследованиях. Для выделения вируса используют сыворотку или плазму крови больных и павших поросят, пробы лёгких, селезёнки, плевральной и перикардиаль-

ной жидкости. Выделение вируса проводят в культурах альвеолярных макрофагов, полученных от молодых (6-8 нед) СПФ-поросят. Успех голландских учёных и объясняется прежде всего тем, что они использовали эту культуру, в то время как культуры клеток РК-2, РК-15 и К-6 оказались не чувствительными для выделения возбудителя. Идентификацию возбудителя проводят по физико-химическим и серологическим свойствам. Из серологических методов используют вначале непрямой метод ИФ и прямой метод ИФА. В США для идентификации возбудителя использовали РН, разработанную с этим вирусом в университете штата Миннесота, а также ИФ и ИФА, разработанные в национальной лаборатории Ames в шт. Айова. Во Франции разработан непрямой метод ИФА для обнаружения специфических АТ. Сероконверсия в диагностических титрах (1:20 и выше) развивается к 14-му дн после экспериментального инфицирования, а к 28-му дн титры антител накапливаются до 1:1280. Разработана методика очистки и концентрирования культурального вируса РРСС, репродуцированного в культуре клеток МАРС-145 и FL. Предварительно вирусодержащая суспензия очищается от балластных белков низкоскоростным центрифугированием, затем концентрируется 2-кратным осаждением ПЭГ мол.м. 6000 и очищается высокоскоростным центрифугированием (7000 мин⁻¹ в течение 6 ч). В градиенте плотности CsCl-сахарозы материал концентрировали в 100 раз. Очистка составляла 96,5%. Все этапы подготовки препаратов контролировали по активности в ИФА. Высокоспецифичные активные препараты АГ вируса РРСС используют для изготовления АТ диагностикумов для ИФА. Метод непрямой ИФА более простой и его можно использовать в полевых условиях. Достаточно исследовать из стада 10 проб сывороток, (лучше парных), чтобы с уверенностью поставить лабораторный диагноз.

В РФ разработан твердофазный ИФА, для проведения диагностики РРСС, составлены наборы диагностикумов для выявления РРСС и специфических АТ. МонАТ к вирусу РРСС могут быть использованы как для выявления АГ вируса РРСС в патологическом материале, так и для определения АТ в сыворотках крови свиней, так как они дают более специфическую реакцию по сравнению с полиАТ.

При дифференциальной диагностике необходимо исключить вирусные и бактериальные болезни, протекающие с нарушениями в репродуктивных системах, а также отравления. Исключают прежде всего АЧС, КЧС, БА, грипп свиней, ЭМК, парвовирусную болезнь, ТГЭ, лептоспироз и хламидиоз. Характерной особенностью этой болезни является обострение вторичных и хронически протекающих инфекций, возбудители которых мо-

гут скрытно циркулировать в пораженных стадах свиней. Это ещё более усложняет проведение лабораторной дифференциальной диагностики.

Лабораторная диагностика синдрома "голубой глаз" свиней

Синдром "голубой глаз" свиней (СГГС) болезнь, проявляющаяся кератоконъюнктивитом с голубой окраской роговицы, нарушением нервной системы, снижением репродуктивности, высокой гибелью поросят. Регистрируется во многих странах.

Диагностика основана на клинико-морфологических данных, гистологических исследованиях. Для изолирования вируса суспензию из головного мозга, лимфоузлов глотки и легких, подозреваемых особей, инокулируют в первичную культуру клеток почки поросенка (или, перевиваемую культуру клеток РК-15). Монослой каждые 24 ч просматривают для обнаружения синцития. Специфичность ЦПЭ подтверждают в РГА и гемадсорбции с эритроцитами разных животных, а также ЭМ и МФА (последний применяют также для прямого обнаружения вирусспецифического АГ вируса в клетках срезов органов, замороженных в криостате). Для определения вирусспецифических АТ используют РЗГА, РН и ИФА.

Известно, что у свиней помутнение роговицы встречается очень редко, его наблюдают у отдельных животных при травмах, авитаминозе А и экспериментальном заражении ВБА. БА имеет с СГГС сходные клинические признаки, при ней также поражаются ЦНС, легкие, репродуктивные органы, но ВБА индуцирует образование внутриклеточных включений, а главным признаком могут служить аборт. Следует помнить, что помутнение роговицы при естественном течении БА никогда не наблюдается. К тому же ВБА является ДНК-содержащим и имеет много отличий от возбудителя СГГС (например, при инокуляции кроликам вызывает энцефалит и гибель).

Синдром "голубой глаз" имеет также сходство с энцефалитом, вызываемым ГА вирусом, но помутнение роговицы при этом отсутствует. ГА-вирус, к тому же, не агглютинирует эритроциты лошади, с трудом культивируется в культурах клеток (за исключением первичной почки свиньи), величина его составляет 80-120 нм.

По некоторым признакам СГГС имеет сходство и с другими болезнями, парвовирусной инфекцией (поражаются генитальные органы самок); гриппом (респираторные органы); с болезнями, протекающими с нервным синдромом (классическая чума свиней, энтеровирусная инфекция,

колибактериоз и др.). Все эти патологии следует дифференцировать от синдрома "голубой глаз".

Лабораторная диагностика оспы свиней

Оспа свиней (ОС) - контагиозное заболевание, характеризующееся лихорадкой и пузырьково-пустулезной сыпью, появляющейся на коже и слизистых оболочках. Вызывается или оригинальным эпителиотропным вирусом оспы свиней (ВОС), или вирусами оспы коров и осповакцины. Регистрируется во всех странах.

Диагноз ставят на основании клинико-эпизоотологических и эпидемиологических данных, результатов лабораторных исследований, вирусоскопии, гистологического исследования, постановки биопробы на поросятах, кроликах и телятах (последние реагируют на введение вирусов коровьей оспы и осповакцины).

Выделение вируса

Подготовка материала. Очень важно правильно взять патологический материал для исследования. Его берут не менее чем с 5-10 участков пораженных тканей (везикул, папул и др.). Материал от больных животных, до этого обработанных моющими, дезинфицирующими р-рами, для исследования не пригоден. В лабораторию направляют мазки, сделанные из содержимого везикул больного животного, мазки-отпечатки оспенных поражений кожи, содержимое везикул, целые папулы и пустулы, иссеченные вместе с субэпидермальной тканью. Мазки высушивают на воздухе и упаковывают в целлофан. Везикулярную жидкость собирают в капилляры пастеровских пипеток, концы которых осторожно запаивают и помещают в пробирки с резиновыми пробками. Для гистологических исследований папулы и пустулы помещают во флаконы с 50%-ным р-ром глицерина и 10%-ным р-ром формалина. Не консервированный материал доставляют в термосе со льдом в тот же день. Необходимо помнить, что ВОС малоустойчив к теплу и кислой среде. Водный р-р глицерина (4-10%-ный) консервирует вирус в течение 4-5 лет. Лиофилизированный вирус сохраняется активным до 3 лет и более, особенно под вакуумом при низкой температуре. Для выделения вируса пробы взятого вируссодержащего материала растирают в ступке или готовят 10%-ную суспензию на физиологическом р-ре. Если материал консервировали глицерином, его предварительно отмывают физраствором. Суспензию центрифугируют 15 мин при 2000 мин⁻¹. Надосадочную жидкость отсасывают, добавляют к ней 500 ЕД/мл пенициллина, 250 мкг/мл стрептомицина и 50 ЕД/мл нистатина, встряхивают и выдерживают 12 ч при 4°C.

Заражение животных. Биопробу ставят на 2-3-мес поросятах. Надосадочную жидкость (0,6 мл) втирают в участки скарифицированной кожи живота. Биопробу считают положительной при образовании по ходу насечек через 6-8 дн характерной узелково-пустулезной сыпи и при обнаружении элементарных телец при микроскопии. Биопробу ставят при неясных симптомах болезни и отрицательных результатах вирусоскопических исследований.

Индикация и идентификация вируса

Вирусоскопия. Свежую папулу протирают ватой, смоченной спиртом, срезают (лучше бритвой) и поверхностью среза делают несколько тонких мазков на предметных стеклах. Мазки подсушивают на воздухе и окрашивают методом серебрения (по Морозову). При вирусоскопических исследованиях пораженных участков кожи обнаруживают характерное расположение вирионов в виде россыпи. Однако отсутствие вирусных частиц в препарате еще не исключает оспу.

ЭМ. ЭМ пораженных участков кожи больных оспой поросят и обнаружение характерных вирусных частиц - один из методов экспресс-диагностики оспы. Для этого требуется всего около 30 мин.

Обнаружение специфических телец-включений. Развитие оспенных поражений в коже больных хорошо прослежено гистологическими исследованиями, результаты которых приведены в табл. 108.

Таблица 108 – Результаты гистологических исследований кожи свиньи, больной оспой

День после заражения	Гидролитическая дистрофия	Гиперплазия	Внутриклеточные включения	Клеточная инфильтрация	Некрозы	Регенерация эпидермиса
3-й	+	+	+	-	-	-
5-й	++	++	++	-	-	-
7-й	+++	+++	+++	+	+	-
11-й	+	+	+	+++	+++	+
13-й	-	-	-	+	+	-
21-й	-	-	-	-	-	+

Обозначения: (+, ++, +++) - выраженность реакции
 (-) - отсутствие реакции или внутриклеточных включений

Диагноз на оспу считают положительным при наличии в гистологических препаратах ацидофильных включений и внутриядерных вакуолей в гиперплазированных кератиноцитах эпидермиса кожи. Цитоплазматические включения при ОС относятся к группе Б, т. е. к включениям, материал которых участвует в репродукции вируса.

Серологическая идентификация. Не разработана. Однако при необходимости возможна постановка РДП и более чувствительного теста - противоточного электрофореза.

Дифференциальная диагностика. Болезнь у свиней могут вызвать вирусы ОС, оспы коров, осповакцины и, по данным некоторых исследователей, оспы кур. Дифференциацию возбудителя, вызвавшего оспу у свиней, проводят на КЭ, культурах клеток органов и тканей кроликов или поросят. Для этого используют 2-х поросят, переболевших оспой (подопытные), и 2-х здоровых (контрольные). Им втирают в скарифицированную кожу по 2 капли растворенной сухой осповакцины. Развитие оспенных поражений у подопытных и контрольных животных через 5-8 дн после нанесения вируса осповакцины указывает на наличие в хозяйстве оспы, вызванной натуральным ВОС. Отсутствие их у подопытных животных при положительной поствакцинальной реакции у контрольных свидетельствует о наличии у свиней оспы коров или осповакцины.

Дифференциацию возбудителей, выделенных от больных свиней с клинической картиной оспы, проводят на основании данных, приведенных в табл. 109. Более простым способом дифференцирования этих болезней является заражение кролика путем введения исследуемого материала в скарифицированную кожу. ВОС не вызывает у этих животных кожной реакции, в то время как вирусы осповакцины и оспы коров ее вызывают. Оба последних вируса можно выделить также путем заражения КЭ и культур клеток. Наличие телец-включений вдоль центральной "просветленной" околядерной зоны в пораженных эпителиальных клетках является патогномичным для ВОС.

Оспу у свиней следует дифференцировать от экзантем, появляющихся при авитаминозах, аллергии и нарушении обмена веществ, энзоотической бронхопневмонии, стрептококковом сепсисе, паратифе, чесотке, лишае, ВБС и везикулярной экзантеме. При экзантемах незаразной этиологии обычно не бывает лихорадки и биопроба отрицательная. Экзантема при чесотке, паратифе и других болезнях протекает без стадийного развития, как при оспе, а из патологического материала выделяют соответствующие возбудители.

Таблица 109 – Дифференциальная диагностика оспы овец

Забеле-вание	Воспри-вимость	Зара-жение	ИН	Морфоло-гия оспин	Вто-ричн осп	Тече-ни в бол	ДБ	Срок появл имм	Х А О	Чувств культ
Посту-ралийск. осп.	Часто и легко заражаются	Внутри-кожно, в/к, в/в	4-7 10-14	Пятна, чешуйки, эритема, пузырьки, корочки	Через 15-20 дн	Медлен-но с лихорадкой	20-30	21-22	0	Только в культуре клеток
Оспенно-кожная оспа	Часто и легко заражаются	То же	2-3 4-5	Пупырышки, пузырьки, эритема, корочки, язвочки	В течение 10-15 дн	-	9-14	10-14	+	Иногда в культуре клеток
Оспа коров	Часто и легко заражаются	Внутри-кожно	4-5	Быстро развивающиеся эритемы, пузырьки, язвочки, корочки	Через 10-15 дн	Лихорадка, без симптомов	8	10-14	+	То же
Оспа свиней	Часто и легко заражаются	Внутри-кожно	4-5	Крупные эритемы, пузырьки, язвочки, корочки, язвочки, корочки	Через 10-15 дн	То же	6-8	12-15	+	То же

Обозначения: + наличие репродукции на ХАО; 0 - отсутствие таковой; ИН - инкубационный период; * - при отсутствии осложнений; ДБ - длительность болезни; в/к - внутрикожное заражение; в/в - внутривенное заражение

Примечание. Свиньи оспой от овец и коз обычно не заражаются. Среди указанных вирусов перекрестный иммунитет образуется только между вирусами оспы коров и осповакцины; ВН ОС - вирус натуральной оспы свиней.

Лабораторная диагностика реовирусная инфекция овец

Инфекционная катаральная лихорадка овец ("синий язык" КЛО) - вирусная трансмиссивная инфекция, передающаяся кровососущими насекомыми из рода *Culicoides*, характеризующаяся лихорадочным состоянием, воспалительно-некротическими поражениями ротовой полости, особенно языка, пищеварительного тракта, эпителия венчика и основы кожи копыт, а также дегенеративными изменениями скелетных мышц. Регистрируется во многих странах. В Российской Федерации с 1993 г. неблагоприятными являются некоторые районы Бурятии.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патоморфологических изменений и результатов лабораторных исследований. Для окончательного диагноза проводят выделение вируса, его идентификацию и ставят биопробу. Для выделения вируса более чувствительны 10-11-дн КЭ, заражаемые на ХАО или внутривенно пробками испытуемой крови, обработанной ультразвуком. Выделенный вирус идентифицируют в РН, применяя типоспецифические сыворотки. Для быстрого обнаружения вируса рекомендуется ИФ в культуре клеток. Показано, что РН по бляшкам более чувствительна, чем РСК и РДП. С помощью РСК удается выявлять АТ в сыворотке крови овец и КРС.

Для выделения вируса КЛЮ проводят иммобилизацию *Culicoides* триэтиламиноом, которым пропитывают специальные аппликаторы. Через 2-3 мин после воздействия паров препарата обездвиженных насекомых микроскопируют и отбирают самок, которых замораживают в жидком азоте. Перед началом проведения вирусологического исследования насекомых размораживают и помещают в среду Игла МЕМ с 10% фетальной сыворотки и антибиотиками, обрабатывают ультразвуком; суспензию осветляют центрифугированием. Для выделения вируса КЛЮ используют перевиваемую линию клеток С 6/36, полученную из личинки *Aedes albopictus*. Эта линия высоко чувствительна, пригодна для первичной изоляции вируса КЛЮ из патологического материала. Линию клеток выращивают при температуре 28°C, создавая оптимальные условия для функционирования РНК-полимеразы вируса. Поскольку в этих условиях ЦПД не проявляется, то его наличие в зараженной суспензии клеток насекомых определяют с помощью ИФ и ИФА. Разработан укороченный метод первичной обработки патологического материала (пулов насекомых). Исследование его в культуре клеток показало высокую чувствительность и пригодность для полевых обследований популяций насекомых на инфицированность вирусом КЛЮ.

Установлена высокая чувствительность метода выделения вируса в перевиваемой линии культуры клеток ПСКГ в сочетании с методом ИФА. Последний рекомендован для выявления АГ вируса блутанга в инфицированных культурах клеток и в суспензии инфицированных комаров *Culicoides variipennis*. Высокая чувствительность ИФА позволяет обнаружить одного инфицированного мокреца в смеси с 92 неинфицированными насекомыми. Разработан непрямой вариант ИФА для серологической диагностики блутанга. Окончательная диагностика КЛЮ, которая часто протекает субклинически у домашних и диких животных, может быть проведена только лабораторными методами выделения вируса, выявления АГ, нуклеиновых кислот вируса и АТ. Вирус выделяют из компонентов крови, в основном из эритроцитов, отобранных у животных во время лихорадочной реакции. Исследуемый материал вводят в КЭ и проводят пассаж в культуре клеток (ВНК -21, Vero).

Для идентификации вирусных АГ используют ИФ, РН, ИЭМ с применением монАТ и ИФА. Для выявления нуклеиновых кислот делают гибридационный анализ и ПЦР. АТ обнаруживают в РДП в агарозе и в конкурентном ИФА. Последняя реакция с использованием вирусспецифических монАТ является более чувствительным и специфичным методом обнаружения АТ к КЛЮ. РН в культуре клеток служит наиболее об-

щепринятым методом выявления типоспецифических АТ. Во ВНИИЗЖ также получены монАТ для постановки ингибирования ТФ ИФА.

КЛЮ необходимо дифференцировать от ящура, контагиозного пустулезного дерматита (эктимы), оспы, везикулярного стоматита, злокачественной катаральной лихорадки, сердечной водянки, болезни Найроби, лихорадки долины Рифт и некробактериоза.

Лабораторная диагностика оспы овец

Оспа овец - острая контагиозная болезнь, протекающая с характерными папулезно-улезными поражениями кожи морды и других мест со слабым волосяным покровом (экзантема) и слизистых оболочек. В 1964 г. на XII сессии Генерального Комитета МЭБ оспе овец внесли в список наиболее опасных (конвенционных) болезней животных. Она широко распространена в соседних странах, занимающихся овцеводством. Эпизодически в результате заноса из неблагополучных соседних стран бывают вспышки в южных регионах России.

Диагноз ставят с учетом эпизоотологических данных, результатов клинического обследования, биопробы и вирусоскопии мазков из свежеразвившихся первичных очагов поражения или мест инокуляции вируса при постановке биопробы. В этих случаях необходимо найти животных с характерными оспинами гнездно-сетчатого строения с кратерообразными углублениями, чего при других экземах, как правило, не бывает. При типичном течении диагностировать оспу не трудно. При тщательном обследовании овец пораженной отары всегда можно найти отдельных животных с типичными оспинами на разных стадиях формирования. У одного и того же животного оспины образуются не одновременно, одни находятся в стадии розеол, другие - в стадии папул.

Лабораторная диагностика оспы основана на выделении вируса, вирусоскопии мазков препаратов из срезанного эпителия розеолы, на присутствие элементарных телец, постановке биопробы, РИФ, РДП.

Выделение вируса. Для исследования берут содержимое везикул или пустул, поверхность которых предварительно очищают ватным тампоном, смоченным эфиром или спиртом. Для гистологического исследования вырезают измененные участки кожи на границе с неизмененными. Патологический материал для вирусологических исследований следует пересылать в замороженном или охлажденном (до 4-6°C) виде. Обычно при abortивном и неясном течении болезни ставят биопробу на наимунных молодых овцах. Испытуемую суспензию, приготовленную общепринятым методом в разведениях 1:20 и 1:200, инокулируют внутрикож-

но в бесшерстную поверхность хвоста в дозе 0,1-0,15 мл. Наблюдение ведут в течение 10 дн. В положительных случаях на месте инъекции развивается местный оспенный процесс (розеола, папула, везикула, пустула, некрот), специфичность которого подтверждают методом вирусоскопии мазков, приготовленных из срезанного эпителия розеолы, на присутствие элементарных частиц.

Серологическая идентификация

ИФ. Исследование (прямой метод) проводят общепринятым методом. При наличии ВОО в клетках инфицированной культуры с 6-8-го ч после заражения в отдельных участках цитоплазмы появляются светящиеся очаги. Позже начинают светиться обширные участки.

РДП. Для получения сыворотки, годной для использования в РДП, иммунизируют кроликов овиной, делают 2-4 внутривенные инъекции в объеме 2; 1; 0,5 и 0,25 мл с интервалом в 5 дн. Через 7 дн после последней инъекции у кроликов берут кровь для получения сыворотки. Полученные кроличьи сыворотки необходимо истощить культурой фибробластов эмбриона овцы. РДП ставят общепринятым методом.

Дифференциальная диагностика. Оспу овец и коз в стадии образования пустул и корок следует дифференцировать от чесотки, пустулезной экземы и контагиозного пустулезного дерматита (эктимы) овец и коз.

Список сокращений

- АЧС – африканская чума свиней
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- БН – болезнь Ньюкасла
- ВНА – вируснейтрализующие антитела
- ВИЭФ – встречный иммуноэлектрофорез
- ВД-БС – вирусная диарея – болезнь слизистых
- ВКЧС – вирус классической чумы свиней
- ВБА – вирус болезни Ауески

ВЧКРС – вирус чумы крупного рогатого скота
ВБ – вирус бешенства
ВГП – вирус гриппа птиц
ВГС – вирус гриппа свиней
ВЛКРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота
ВЯ – вирус ящура
ГАЕ – гемагглютинирующая единица
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИФ – иммунофлуоресценция
ИФА – иммуноферментный анализ
ИОЭФ – иммуноэлектроосмосфорез
ИГС – инфекционный гастроэнтерит свиней
ИРТ – инфекционный ринотрахеит
ИЛТ – инфекционный ларинготрахеит
КРС – крупный рогатый скот
КЭ – куриный эмбрион
КС – комплемент связывающий
КСА – комплемент связывающие антитела
КЧС – классическая чума свиней
ККРА – кровякапельная реакция агглютинации
КЧП – классическая чума птиц (грипп)
ЛД₅₀ – 50%-ная летальная доза
НРИФ – непрямая реакция иммунофлуоресценции
НИФ – непрямая флуоресценция
РН – реакция нейтрализации
РТГА – реакция торможения гемагглютинации
РП – реакция преципитации
РСК – реакция связывания комплемента
РЗГА – реакция задержки гемагглютинации
РГА – реакция гемагглютинации
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
РПГА – реакция пассивной гемагглютинации
РВИЭОФ – реакция встречного иммуноэлектроосмосфореза
РНИФ – реакция непрямой иммунофлуоресценции
РИФ – реакция иммунофлуоресценции
РРГ – реакция радиального гемолиза
РИД – реакция иммунодиффузии
РРСС – респираторный и репродуктивный синдром свиней

- СГГС – синдром «голубой глаз»
 ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза
 ТФИФА – твердофазный иммуноферментный анализ
 ТГС – трансмиссивный гастроэнтерит свиней
 ХАО – хориолантоисная оболочка
 ЦПД – цитопатическое действие
 ЦНС – центральная нервная система
 ЭФ – электрофорез
 ЭЛД₅₀ – 50%-ная эмбриональная летальная доза
 ЭМ – электронная микроскопия

Содержание

Общая часть.....	4
Особенности морфологии и строения микроорганизмов.....	4
Формы взаимодействия микро и макроорганизмов.....	16
Характерные особенности инфекционной болезни.....	18
Методы лабораторных исследований.....	23
Отбор, консервирование, транспортировка и хранение материала для лабораторного исследования.....	34

Специальная часть.....	38
Лабораторная диагностика стафилококкозов.....	38
Лабораторная диагностика стрептококкозов.....	51
Лабораторная диагностика энтеробактерий.....	70
Лабораторная диагностика колибактериоза.....	96
Лабораторная диагностика сальмонеллезов.....	108
Лабораторная диагностика иерсинеозов.....	129
Лабораторная диагностика морганелл.....	148
Лабораторная диагностика клебсиелл.....	156
Лабораторная диагностика протей.....	162
Лабораторная диагностика сибирской язвы.....	166
Лабораторная диагностика туберкулеза.....	178
Лабораторная диагностика паратуберкулеза.....	198
Лабораторная диагностика листериоза.....	201
Лабораторная диагностика рожи свиней.....	213
Лабораторная диагностика лептоспироза.....	217
Лабораторная диагностика клостридиозов.....	232
Лабораторная диагностика инфекционной энтеротоксемии животных.....	233
Лабораторная диагностика браздота овец.....	239
Лабораторная диагностика клостридиоза птиц.....	242
Лабораторная диагностика эмфизематозного карбункла.....	243
Лабораторная диагностика злокачественного отека.....	246
Лабораторная диагностика ботулизма.....	249
Лабораторная диагностика столбняка.....	252
Лабораторная диагностика коринобактериозов.....	260
Лабораторная диагностика актиномикоза.....	269
Лабораторная диагностика нокардиоза.....	275
Лабораторная диагностика бруцеллеза.....	278
Лабораторная диагностика туляремии.....	296
Лабораторная диагностика пастереллеза.....	302
Лабораторная диагностика гемофильного полисерозита поросят.....	309
Лабораторная диагностика гемофилеза кур.....	312
Лабораторная диагностика актинобациллезной пневмонии свиней.....	315
Лабораторная диагностика бортелиоза.....	321
Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота.....	326
Лабораторная диагностика инфекционного тромбозмболического менингоэнцефалита крупного рогатого скота.....	329
Лабораторная диагностика контагиозного метрита лошадей.....	333
Лабораторная диагностика сапа.....	338

Лабораторная диагностика мелиоидоза.....	342
Лабораторная диагностика псевдоманоза.....	346
Лабораторная диагностика некробактериоза.....	352
Лабораторная диагностика копытной гнили овец и коз.....	359
Лабораторная диагностика дизентерии свиней.....	364
Лабораторная диагностика кампилобактериозов.....	370
Лабораторная диагностика борррелиоза птиц.....	384
Лабораторная диагностика микоплазмозов.....	386
Лабораторная диагностика контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота.....	402
Лабораторная диагностика микоплазмозов крупного рогатого скота сопровождающиеся поражением респираторного, генетального тракта и молочной железы.....	405
Лабораторная диагностика микоплазмозов мелкого рогатого скота.....	407
Лабораторная диагностика микоплазмозов свиней.....	412
Лабораторная диагностика микоплазмозов птиц.....	417
Лабораторная диагностика риккетсиозов.....	423
Лабораторная диагностика Ку-лихорадки.....	423
Лабораторная диагностика инфекционного гидроперикардита животных.....	426
Лабораторная диагностика эрлихиозов.....	428
Лабораторная диагностика неореккетсиоза собак.....	430
Лабораторная диагностика анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота.....	431
Лабораторная диагностика эритрозоопоза.....	432
Лабораторная диагностика гемабартонеллеза кошек.....	433
Лабораторная диагностика хламидиозов.....	434
Лабораторная диагностика бешенства.....	447
Лабораторная диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.....	455
Лабораторная диагностика ротавирусной инфекции крупного рогатого скота.....	462
Лабораторная диагностика вирусной диареи крупного рогатого скота.....	469
Лабораторная диагностика парагриппа-3 крупного рогатого скота.....	477
Лабораторная диагностика лейкоза.....	481
Лабораторная диагностика ящура.....	493
Лабораторная диагностика чумы крупного рогатого скота и мелких жвачных.....	499
Лабораторная диагностика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота.....	506

Лабораторная диагностика ортомиксовирусных инфекций.....	508
Лабораторная диагностика гриппа птиц.....	512
Лабораторная диагностика гриппа свиней.....	518
Лабораторная диагностика болезни Ауески.....	523
Лабораторная диагностика инфекционного ларинготрахеита кур.....	534
Лабораторная диагностика ньюкаслской болезни.....	540
Лабораторная диагностика классической чумы свиней.....	547
Лабораторная диагностика инфекционного гастроэнтерита свиней.....	559
Лабораторная диагностика ротавирусной диареи свиней.....	567
Лабораторная диагностика болезни Тешена.....	569
Лабораторная диагностика репродуктивного и респираторного синдрома свиней.....	570
Лабораторная диагностика синдрома «голубой глаз» свиней.....	571
Лабораторная диагностика оспы свиней.....	572
Лабораторная диагностика реовирусной инфекции овец.....	575
Лабораторная диагностика оспы овец.....	577
Список сокращений.....	579
Содержание.....	581
Список используемой литературы.....	584

Использованная литература

1. Адамов А.К., Агафонов В.И. Суспензионные антигены, антитела и

иммуносорбенты. М., 1969.

2. Акатов А.К., Зуева В.К. Стафилококки. М.: «Медицина», 1983.

3. Альтон Д., Джонс А.М. Объединенный комитет ФАО/ВОЗ по бруцеллезу. Четвертый доклад. Женева, 1995.

4. Ананьин В.В. В кн. «Лептоспирозы людей и животных». М.: «Медицина», 1971.

5. Литвинов Б.И., Борисова В.В., Волкова П.М. и др. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986.

6. Ахметов А.М. Сальмонеллезы животных. М.: «Колос», 1983.

7. Ашмарин И.И. Практическая медицинская микробиология. М.: «Медицина», 1966.

8. Бабиц М.А. Физико-химические методы контроля ингредиентов питательных сред и биопрепаратов. Метод, пособие для биофабрик и вет. лабораторий. М., 1970.

9. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Косаченко Н. и др. Докл. РАСХН, 1997, № 2, с. 40-42.

10. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва. Владимир: «Посад», 2001.

11. Бакулов И.А., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. Особо опасные болезни животных. Покров.: ВНИИВВиМ, 1998.

12. Бектимиров М.А. Разработка методов диагностики копытной гнили овец, выделение и изучение биологии возбудителя. М., 1978.

13. Белая О.Ф., Черкасов В.Л., Белая Ю.А. и др. Реакция коагуляции при кишечных инфекционных заболеваниях.//Методические рекомендации. М., 1990.

14. Белоусов В.И., Каврук Л.С., Малахов Ю.А. и др. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. М., 2000.

15. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонады. М.: «Медицина», 1990.

16. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред. проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.

17. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.

18. Козловский Е. В, Емельяненко П.А. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник. - М. Агропромиздат 1989.

19. Колычев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.

20. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родичкина В.Б, Скородумов Д.И. М.: Колос, 2001.

21. Клиническая иммунология: Учебник /Под ред. А.В. Караулова. – М.: МИА, 1999.
22. Сидоров М.А, Скородумов Д.И, Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995.
23. Скородумов Д.И, В.В. Субботин, Сидоров М.А, Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.:ИзографЪ, 2005.
24. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Ветеринарная вирусология. – Изд.2-е. – М.: Агропромиздат, 1991.
25. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В.. Диагностика вирусных болезней животных. – М.: Агропромиздат, 1991.
26. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я.,Соловьев Б.В., Фомина Н.В.. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП,1998.
27. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Соловьев Б.В., Фомина Н.В.. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных. – М.: Агропромиздат, 1998.
28. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А.. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: Колос, 1999.