

**А. А. ШЕВЧЕНКО, Л. В. ШЕВЧЕНКО
О.Ю. ЧЕРНЫХ, В.Н. ШЕВКОПЛЯС**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ЖИВОТНЫХ**

**КРАСНОДАР
2009**

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**А. А. ШЕВЧЕНКО
Л. В. ШЕВЧЕНКО
О.Ю. ЧЕРНЫХ
В.Н. ШЕВКОПЛЯС**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ**

**КРАСНОДАР
2009**

616.9

Л 12

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования**

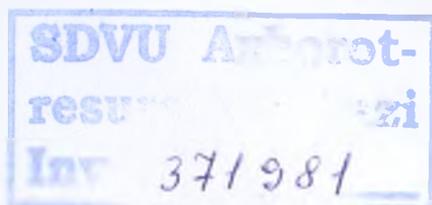
**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Александр Алексеевич Шевченко
Людмила Васильевна Шевченко
Олег Юрьевич Черных
Владимир Николаевич Шевконяц**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ**

Учебное пособие

**КРАСНОДАР
2009**



ББК 28.48

М 11

*При поддержке Российского фонда фундаментальных исследований
и Департамента науки и образования администрации
Краснодарского края*

Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н.

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ
БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ.** Краснодар: КубГАУ, 2009. 584с.

В руководстве изложены основные общие вопросы и методы лабораторной диагностики инфекционных болезней животных, вызываемых бактериями и вирусами.

Для студентов высших учебных заведений факультетов ветеринарной медицины и биологических специальностей.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

И.А. Болоцкий – доктор ветеринарных наук, зав. лабораторией Краснодарского НИВИ

Ю.Ф. Мишанин – доктор биологических наук, академик РАН, профессор Кубанского государственного технологического университета.

ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет»

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

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).

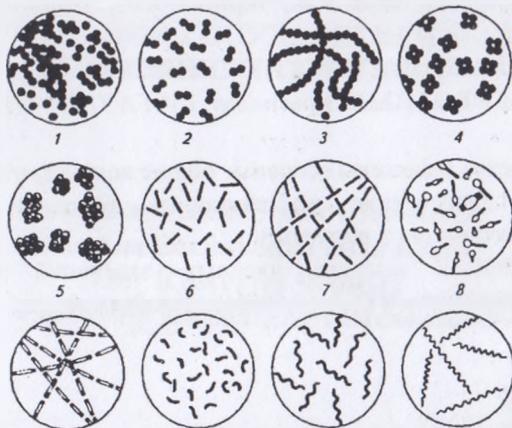


Рис. 1. Основные формы микроорганизмов (схема): шаровидные: 1 - стафилококки, 2 - диплококки, 3 - стрептококки, 4 - тетракокки, 5 - сарцины; палочковидные: 6 - бактерии, 7 - стрептобактерии, 8 - бациллы, 9 - стрептобациллы; извитые: 10 - вибрионы, 11 - спириллы, 12 - спирохеты.

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; по 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* — скользящие микробы, по форме напоминающие палочки или веретено. *Простекобактерии* могут быть треугольной или иной формы. У некоторых из них лучевая симметрия. Своё название такие организмы получили по наличию остrokонечных 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 образуют, но 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 нм = 10^{-9} м).

Примерные размеры некоторых микробов, мкм

| Микробы | Длина | Ширина |
|------------------------|----------|---------|
| Сибиряэвренная 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. Играют 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, стерины. 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 закругленными концами и кокков, размером 0,2-0,6×0,4-2 мкм и более. Клеточная стенка содержит пептидогликан, цитоплазматич-

ческая 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 персисгентным 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) Стэнли 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.

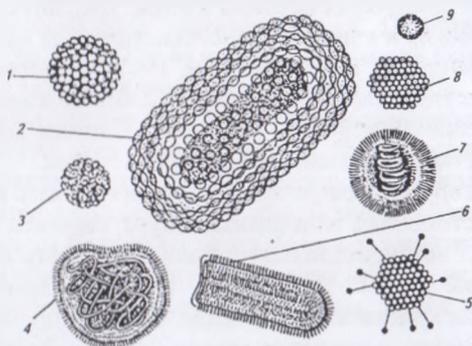


Рис. 2. Формы и относительные размеры некоторых вирусов:

1 - лейкемии кур; 2 - оспы; 3 - вызывающий бородавки; 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, выделенного 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: сибирязвенных, стафилококковых, рожистых, сальмонеллезных и др. Биологическая промышленность выпускает в жидком виде коли-гертнерфаг против сальмонеллеза и колибактериоза телят, сибирязвенные бактериофаги, фаг-иниВВиМ.

Грибы. **Плесневые и другие микромицеты.** Микромицеты (микрогрибы) — плесневые эвкариоты — представляют собой большую группу организ-

мов, 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 грибицы, 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 спорангиеспорами (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: бесполовое 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 Mucogaceae) 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, удлинённые 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, клавадин). Среди аспергилловых грибов имеются возбудители заразных болезней.

Род *пеницилл*, или кистевик (семейство *Moniliaceae*). 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 *Turberculariaceae*) поражает плоды, овощи и злаки. 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 зеараленонтоксикоз (фузариотоксикоз) (народное название «пьяный хлеб»).

Молочная плесень (*Endomyces lactis*) образует белые бархатистые плески 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. *Cyanos* — 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 мурсин, в цитоплазме — нуклеоид, 70 S-рибосомы и другие органеллы прокариот. Иногда образуют слизистую капсулу. Для них характерны движения амфицитарного 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 (CO_2), они предотвращают развитие парникового эффекта на планете.

Формы взаимодействия микро и макро организмов

Симбиоз – длительное сожительство, обычно приносящее взаимную пользу. Так, молочнокислые 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.

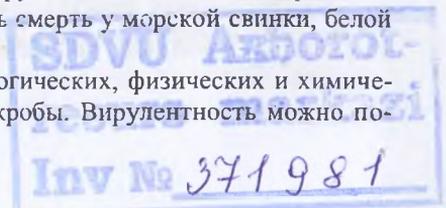
Паразитизм – особый и распространенный тип сожительства, при котором один хозяин (паразит) живет за счет другого (хозяина) и причиняет ему вред, вызывая инфекционную болезнь. Такие микробы называют патогенными (болезнетворными). Входят бактерии, вирусы, грибы, риккетсии, микоплазмы, хламидии. Все микробы – 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 + patto* 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 зависит 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. 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 бациллы, 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 по-



высвить 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 макро организм, 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 макро организма. 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 организме 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, сипе, 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 вирусоносительством (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 болезни 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 (зачастую бессимптомным) применением лекарственных средств и особенно антибиотиков.

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

ного 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 поливалентны - 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.

Имуногенность - 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 детерми-

нантой, 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 сенсибилизацию (сенсибилизация – 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, получил название «шлеппер» (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 антигены, 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 специфически 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 моле-

куды, 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: K (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.

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

Иммуноглобулины – это белки построенные из нескольких полипептидных цепей. Молекула каждого класса состоит из 4 полипептидных цепей – двух тяжелых и двух легких, которые связаны между со-

бой 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. Активный центр, куда входит детерминантная группа должен быть ей комплементарен, без этого не наступит феномен серологической специфичности. Молекулы антител различных классов 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 avidностью 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 avidность IgM больше, чем avidность IgG, поскольку IgM функционально пентавалентен, а IgG двухвалентен.

Антитела различных классов иммуноглобулинов обладают различными физическими, химическими, биологическими и антигенными свойствами. Иммуноглобулин M 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. Имму-

поглобулин не участвует в аллергических реакциях, не переходит через плаценту. К классу IgM относят антитела группы крови человека – А, В, О.

Иммуноглобулин 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 выраженными свойствами нейтрализации токсинов.

Иммуноглобулины 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 слизистых 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.

Иммуноглобулин 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.

Иммуноглобулин 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 эозинофагов.

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 анти-

тел – метод гибридом. С его помощью производят слияние плазмацитомы (опухоловой клетки, возникшей из антибелообразующих 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 иммунофлуоресценции (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 активности 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 гель-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, КЛО, 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 бараньих эритроцитов и антисыворотки к ним – гемолизина. Если исследуе-

мый 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 иммуноферментного анализа (ИФА). Для идентификации вирусспецифического антигена иммуноферментный тест применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазная реакция

Имунопероксидазная реакция аналогична методу иммунофлуоресценции, 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.

Имунопероксидазную реакцию ставят в прямом и непрямом вариантах.

Методы твердофазного иммуноферментного 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.

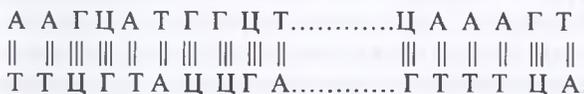
Метод ДНК-зондов позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты, в том числе и вирусные, в любом материале от больных животных: свежем (ткани, смывы, кровь), высушенном, мороженом и даже частично разложившемся. Метод ДНК-зондов основан на способности одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот соединяться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

3. Контакт образовавшихся одноцепочечных молекул ДНК (или РНК) с ДНК-зондом при 55°С, приводящий к образованию двухцепочечных молекул (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°С) 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°С.

2. Отжиг праймеров – гибридизация (комплементарное связывание) праймера с ДНК-матрицей (55-65°С).

3. Синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы – комплементарное достраивание нитей ДНК-матрицы с помощью ДНК-полимеразы из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (72°С).

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, радиоизотопным 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 материалы 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 инактивации 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 ди-

агностических 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 кокковидные, 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. urlettae* 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 постигнувшего материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Клетки стафилококков сферические, размером 0,5-1,0 мкм, грамположительные, располагаются одиночно, 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 (овечьей) агар, контаминированный — на молочнокислой 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 выделенного 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, серобелый 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 тинкториаль-

ных 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 выделенных 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 штатированная плазма кролика (1 объем 4%-ного раствора натрия цитрата + 9 объемов крови). При исследовании штаммов, выделенных от опреде-

ленных 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 |
| Гемолизин (эритроциты КРС) | + | - | - |
| Гиалуронидаза | + | - | + |
| Лецитиназа | + | Н.Д. | Варьирующий признак (чаще +) |
| Протеин «А» | + | Варьирующий признак | + |
| ДНК-аза | + | + | + |
| Ферментация маннита аэробно анаэробно | + | + | - |
| | + | - | - |
| Мальтоза | + | (±) | - |
| 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 скупивания (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 СФ-теста хорошо коррелируют с результатами пробирочной 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 дробно 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 центрифугированием и ресуспендируют в исходном объеме физиологического 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 | Маннит | Мальтоза | Гидролиз эскулина | Новобиоцин 5 мкг/диск | Полимиксин В 300 ед/диск |
| <i>S. aureus subsp. aureus</i> | + | + | + | + | + | d | + | + | - | Ч | Р |
| <i>S. aureus subsp. 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 гемолизин 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 |
| <p>Альфа-гемолизин (II)</p> <p>Субстрат для штаммов, выделенных от людей.</p> <p>Виды: утка, утка, лизис полный</p> | Овца, кролик, КРС | Лошадь, куры, человек |
| <p>Бета-гемолизин (II)</p> <p>Образует чаше у штаммов от КРС.</p> <p>Виды: утка, утка, лизис после инкубирования при 37° С, полный, полный в результате дополнительного выщелачивания посевов в течение 18 часов при 4-15° С</p> | Овца, КРС | Кролик, лошадь, куры |
| <p>Гамма-гемолизин (A)</p> <p>Виды: утка, утка, четко ограниченная, гемолиз полный</p> | Обладает широким спектром действия | Обладает широким спектром действия |
| <p>Дельта-гемолизин (γ)</p> | Овца, кролик, морская свинка, человек | |

Гиалуронидаза (фактор проникновения). Обнаружение этого фермента у стафилококков практически наиболее легко осуществимо в виде диффузии. Берут штаммы капсулообразующих видов бактерий, входящих в состав капсулы гиалуроновую кислоту (субстрат для гиалуронидазы) *St. equi*, *Pasterella multocida* (серовар А). На кровяной МПА в технике Петри крестообразно засевают штрихом *St. 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 капсулы ферментом, который диффундирует в толщу агара (результат положительный).

ДНК-аза. Нуклеаза обычно выявляется у *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. aureus*. 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 образуются зоны.

Виверин-тест. Проводят для выявления патогенных свойств штаммов по патологическому эффекту (биопроба на цыплятах), положительной дермопатологической реакции (некротоксин), а также на котятках для обнаруже-

ния способности продуцировать энтеротоксин. Известно шесть антигенно-различных 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 внутривожно 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 цыпленка на 3-5 сутки при выделении культуры стафилококков из паренхиматозных органов и костного мозга цыпленка.

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 котяткам. Положительный результат: через несколько минут котенок проявляет 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 сердечномозговом 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°С

МПА добавляют антиоксическую 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 часов 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, ксилоза, 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 (ацетоин), 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 уреазы, 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 РYR. 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

| Единица | Тест | Код | Результат (цветовая реакция) | |
|---------|----------------------|-----|---------------------------------------|---|
| | | | Положительный | Отрицательный |
| Ряд 1-й | | | | |
| U | Уреаза | URE | Красно-фиолетовый, оранжево-красный | Желтый, бледно-оранжевый |
| CI | Аргинин | ARG | Красно-фиолетовый, красный | Желтый, бледно-оранжевый |
| O | Орнитин | ORN | Красно-фиолетовый, красный | Желтый, бледно-оранжевый |
| B | Бета-галактозидаза | ONP | Желтый, бледно-желтый | Бесцветный |
| D | Бета-глюкуронидаза | GLR | Желтый, бледно-желтый | Бесцветный |
| C | Нитраты | NIT | Темно-красный, красный | Бесцветный, слабо-розовый |
| B | Фосфатаза | PHS | Красно-фиолетовый | Бесцветный, слабо-розовый |
| A | Пирролидо-ниламидаза | PYR | Красный, бледно-красный | Желтый, желто-оранжевый |
| Единица | Тест | Код | Результат (цветовая реакция) | |
| | | | Положительный | Отрицательный |
| Ряд 2-й | | | | |
| U | Эскулин | ESL | Черный, темно-коричневый, темно-серый | Бесцветный, бледно-коричневый, бледно-серый |

| | | | | |
|---------|----------------------|-----------|--------------------------|----------------------------------|
| G | Сахароза | SUC | Желтый, желто-коричневый | Фиолетовый, коричнево-фиолетовый |
| F | Трегалоза | TRE | Желтый, желто-коричневый | Фиолетовый, коричнево-фиолетовый |
| E | Маннитол | MAN | Желтый, желто-коричневый | Фиолетовый, коричнево-фиолетовый |
| D | Ксилоза | XYL | Желтый, желто-коричневый | Фиолетовый, коричнево-фиолетовый |
| C | Мальтоза | MLT | Желтый, желто-коричневый | Фиолетовый, коричнево-фиолетовый |
| B | Манноза | MNZ | Желтый, желто-коричневый | Фиолетовый, коричнево-фиолетовый |
| A | Глюкоза/ ново-биоцин | GLN | Желтый, желто-коричневый | Фиолетовый, коричнево-фиолетовый |
| Полоски | | | | |
| | Тест на оксидазу | окси-тест | Синий | Бесцветный |
| | Ацтоин | ВПтест | Красный, розовый | Бесцветный |

Примечание:

В лунки С с отрицательной реакцией на нитраты добавляют осторожно небольшое количество порошка цинка (приблизительно 5 мг) для подтверждения отрицательной реакции; при отрицательной реакции красный цвет появляется в течение 10 минут.

Чтение тестов бета-галактозидазы и бета-глюкуронидазы (ряд 1-й, лунки E и D) 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-теллурит-глицин-пируватная среда). К 90 мл основной среды с температурой 45° С добавляют 6,3 мл глицинового раствора, 1 мл раствора теллурита 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_2C1_2 . 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 теллурита натрия.* Теллурит 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 калий — 0,5%, агар-агар — 1,5%, устанавливают рН 7,0. Среду стерилизуют при 110° С в течение 1,5 часов, добавляют 10% стерилизованного обезжиренного молока.

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

Лабораторная диагностика стрептококкозов

Ранее в род *Streptococcus* включали пиогенные стрептококки, энтерокочки и молочнокислые стрептококки, которые в настоящее время отнесены соответственно в самостоятельные роды *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Lactococcus*. В данном разделе рассматриваются вопросы лабора-

торной 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> ¹ | 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> <i>sudsp. equi</i> | Миндалины лошадей | Лошади - маститы, мыт |
| <i>S. equi</i> <i>sudsp. equisimilis</i> | Вагина и кожа лошадей | Маститы, эндометриты лошадей |
| <i>S. equi</i> <i>zoocpidemicus</i> | Слизистые и кожа свинюматов, 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. porcicus</i> | Слизистые свиней | Свиньи - лимфадениты поросят |
| <i>S. suis</i> <i>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* 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 pH 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°С). 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 0,6-2,0х0,6-2,5 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 высевать 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-кровоном 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>equisimilis</i> , <i>S.equinus</i> , <i>S.bovis</i> , <i>S.suis</i> , <i>S.pneumoniae</i> |
| Серогрупповая принадлежность по Лансфилд | 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 краями колонии. Если культивирование проводится в аэробных условиях, обязателен α -гемолиз с зеленоватым оттенком, при анаэробной инкубации — β -гемолиз. По внешнему виду колонии похожи на колонии других зеленящих стрептококков. Могут встречаться мукоидные колонии — более крупные, с блестящей поверхностью, слизистой консистенции. В сыровоточно-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, просветляющиеся колонии с зоной β - или двойной α -гемолиза, часть штаммов не выделяет гемолизин. Для выявления скрытой гемолитической активности применяют САМР-тест. В сыровоточно-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 свежeweыделенных 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 сывороточно-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-позитивные штаммы выделяют диффундирующие метаболиты, которые полностью лизируют

палочки 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* испытываемые 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 Эдварда 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, CAMP-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 | Серологическая группа | Признаки | | | | | | | | | |
|--|-----------------------|---------------------|---------|--------|-----------|---------|--------|-----------|----------|-----------|---------------------------|
| | | Образование кислоты | | | | | | | Гидролиз | | Рост в средах с 6,5% NaCl |
| | | инулин | лактоза | маннит | раffinоза | салицин | сорбит | трегалоза | декстрин | гиалурата | |
| <i>S. pyogenes</i> | A | - | + | V | - | + | - | + | - | - | - |
| <i>S. agalactiae</i> | B | - | + | - | - | (+) | - | + | - | + | - |
| <i>S. dysagalactiae</i> | C | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| <i>S. dysagalactiae subsp. equisimilis</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 | | |
| | | | эскулина | гипурата | сорбита | маннита | |
| <i>S. agalactiae</i> | β | + | - | + | - | - | B |
| <i>S. dysgalactiae</i> | α | - | - | - | - | - | C |
| <i>S. pneumoniae</i> | α | - | (+) | - | - | - | - |
| <i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> | β | - | - | - | + | - | C |

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 (+) | - | + | + | + | E, P, U, V |
| <i>S. suis</i> | β (a) | + | - | - | + | D, R, S |
| <i>S. pneumoniae</i> | α | d | (-) | - | - | Her |
| <i>S. equi subsp. zooepidemicus</i> | β | - | - | + | + | C |

Таблица 11 - Дифференциация стрептококков, выделяемых от лошадей

| Вид стрептококка | Тип гемолиза | Признаки | | | Серологическая группа по Дансфилд |
|-------------------------------------|--------------|------------------------|---------|-----------|-----------------------------------|
| | | Образование кислоты из | | | |
| | | лактозы | сорбита | трегалозы | |
| <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. sectorum</i> | <i>E. dispar</i> | <i>E. durans</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecium</i> | <i>E. gallinarum</i> | <i>E. hirae</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 кислот из | Рамнозы | + | (+) | - | н. | - | d | - | - |
| | Сахарозы | + | + | + | + | - | d | + | + |
| | Рафинозы | - | + | + | + | - | - | + | d |
| | Сорбита | + | - | - | - | - | (+) | - | - |
| | Маннита | + | + | - | - | (-) | + | (+) | + |

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 желч-

ного бульона. Среда становится мутной и ее помещают на час в термостат.

Клетки *S. pneumoniae* растворяются, среда становится прозрачной, зеленившие 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 тауроcholата 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 HCl) используют для дифференциации от других зеленивших стрептококков. Для этого применяют коммерческие бумажные диски с оптохипом. Испытуемую культуру засевают на кровяной агар, помещают на поверхность среды диски с оптохипом 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-кровоной 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. В 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 системе Лансфилд. Иммуные серогрупповые стрептококковые сыворотки производит и высылает по заявкам ВГНКИ ветпрепаратов. За рубежом для этих целей имеются коммерческие препараты, позволяющие устанавли-

ливать серогрупп-повую 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 выдерживают 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 шпателей 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 мышках массой 14-16 г. Для заражения используют только свежее щеленство 18-20-часовые культуры стрептококков, выращенные на глюкозо-сывороточном 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. Па-

параллельно производят посевы на глюкозо-кровяной агар и глюкозо-сывороточный бульон.

В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике стрептококков» при диагностике мыта (*S. equisubsp. equi*) рекомендуется исследуемым материалом (гной, 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 (гной) 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, уреаза, маннитол, сорбитол, трегалоза, лактоза, раффиноза, инулин, мелибиоза и рибоза. Идентификацию допол-

няют тестами на диагностических полосках: ПИРАтест для выявления пирролидонилариламидазы и ВПтест для выявления образования ацетона. Набор содержит 10 пластинок и позволяет провести идентификацию 60 культур.

Методика проведения исследования

Пластинки СТРЕПТОтест 16 (один двухрядный стрип на одну культуру), рамка пластинки с крышкой, суспензионная среда для СТРЕПТОтест 16, физиологический раствор, парафиновое масло, реактивы для тестов гиппурат, фосфатаза, 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 ПИР 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 °C 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 °C в течение 30-40 минут, после чего учитывают результат ВПреакции.

После 24 часов инкубации добавляют реактивы в следующие лунки пластинки: ряд 1-й, лунка H (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 HIP 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 СТРЕПОтеста 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 | | | | |
| H | Гиппурат | HIP | Синяя | Бесцветная, голубоватая |
| G | Фосфатаза | PHS | Красно-фиолетовая | Бесцветная, розоватая |
| F | Лейцинаминопептидаза | LAP | Желтая | Бесцветный |
| E | Бета-глюкуронидаза | GLR | Желтая | Бесцветная |
| D | Альфа-галактозидаза | aGA | Желтая | Бесцветная |
| C | Эскулин | ESL | Черная, темно-коричневая | Бесцветная, светло-коричневая |
| B | 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 | | | | |
| H | Маннитол | MAN | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| C | Сорбитол | SOR | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| P | Трегалоза | TRE | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| F | Лактоза | LAC | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| I | Раффиноза | RAF | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| S | Инулин | INU | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| B | Мелибиоза | MIB | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |

| | | | | |
|---|--------|-----|--------------------------|---------------------------|
| А | Рибоза | R1B | 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 микротест-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

| Колонка | Тест | Код | Результат (цветовая реакция) | |
|---------|-----------|-----|------------------------------|---------------------------|
| | | | Положительный | Отрицательный |
| H | Аргинин | ARG | Красно-фиолетовая, красная | Желтая, светло-оранжевая |
| G | Сорбоза | SOE | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| F | Арабиноза | ARA | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| Колонка | Тест | Код | Результат (цветовая реакция) | |
| | | | Положительный | Отрицательный |
| E | Маннитол | MAN | Желтая, светло-оранжевый | Красная, оранжево-красная |
| D | Сорбитол | SOR | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| C | Мелибиоза | MLB | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| B | Раффиноза | RAF | Желтая, светло-оранжевая | Красная, оранжево-красная |
| A | Мелцитоза | 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 сывортки крови лошади.

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

Желчный бульон. К МПБ добавляют необходимое количество нативной желчи крупного рогатого скота (10-40%), устанавливают необхо-

данный 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.

Желтю-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 нолимиксина М. Колонии энтерококков на этой среде розово-красного цвета.

Желчно-кровяной агар Бельенского 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% дефибрировавшей 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 нолимиксина 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 двухосновного фосфата калия.

Смеси стерилизуют отдельно при 112°C 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, автоклавизируют при 121°C 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% дефибринированной 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 роение протея.

Если после засева материала на поверхность среды положить полоски фильтровальной бумаги (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°C , охлаждают и добавляют 10 мл 1%-ного стерилизованного фильтрованием солянокислого трифенилтетразолия.

Лабораторная диагностика энтеробактерий

Представители семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными, аэробными или факультативно анаэробными палочками. По-

движные 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., *Erwinia* и др.) известны как фитопатогены, причиняющие урон злакам и картофелю, другие (напр., *Shigella*) 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 Лезина, Энде). 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 отсаживания 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 посева 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 просматривают 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) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|-----------------------------|--------------------|--------|------|-----------|---------------------------|-----------|-------------|----------------------|--------|---------|--------------------|-------------------|-----|-----|------|---|
| | | Шоссе-Рева | Висмут-сульфит Лед | Левина | Эндо | Мак-Конки | Миника | Маттиевая | Селенитовая | Моллера или Кауфмана | Клиппа | Раппорт | Лькозинский бульон | Буферная (Ющенко) | К-1 | П-1 | ЭТ-1 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 |
| Щекотки, отрезок тонкого кишечника | <i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Yersinia</i> <i>Proteus</i> <i>Serratia</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>Proteus</i> <i>Yersinia</i> | ++ | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | + | | | | | | + | |
| Паренхиматозные органы, трупы, плоды | <i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Yersinia</i> | +++ | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | + | | | + | | | + | |
| Легкие | <i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> | + | + | + | + | | | + | + | + | + | | | | | | | |
| Молоко | <i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Serratia</i> | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | | | | | | | + | |

Таблица 16 – Характеристика колоний энтеробактерий на плотных дифференциальных средах

| Среда | Дифференцирующие компоненты | Индикатор | Цвет колоний в зависимости от ферментации углеводов | | | |
|----------------|-----------------------------|--------------------------|---|------------|--------------------------|------------|
| | | | ферментации углеводов | | образование сероводорода | |
| | | | + | - | + | - |
| Плаккисреда | Лактоза | Нейтральный красный | Розовый, красный | Бесцветный | | |
| Висмут-сульфат | Глюкоза, сульфит висмута | Сульфат железа | | | Черный, зеленый | Бесцветный |
| Девина | Лактоза | Эозин, метиленовый синий | Темно-синий, черный с металлическим блеском | Бесцветный | | |
| Тодо | Лактоза | Основной фуксин | Красный с металлическим блеском | Бесцветный | | |
| Мак-конки | Лактоза | Нейтральный красный | Розовый, красный | Бесцветный | | |

Дифференциация некоторых родов энтеробактерий

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, урсазы, 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 липополисахаридо-протеиновый комплекс. Липид связан с токсигенностью, протеин обуславливает иммуногенность, полисахарид является компонентом, определяющим антигенную специфичность.

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

| Признаки | <i>Escherichia</i> | <i>Salmonella</i> | <i>Yersinia</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Morganella</i> | <i>Proteus</i> | <i>Serratia marcescens</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 | + | + |

| | | | | | | | | |
|-------------------------|---|---|----|---|---|---|---|---|
| Устойчивость | + | + | +* | - | + | + | + | + |
| Образование кислоты из: | | | | | | | | |
| глюкозы | + | - | P | + | - | - | - | - |
| маннита | + | + | + | + | - | - | + | + |

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

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

K-антигены (оболочечные) являются кислыми полисахаридами. Расположены более поверхностно, чем O-антигены, вследствие чего иногда полностью их экранируют. Последнее может явиться причиной инагглютиняемости живых K+ (плюс) бактерий в O-сыворотках (например, эшерихий).

K-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 K-антигены обозначают как A-, B-, L-, M- 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 O-, K- 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 | Schigella | Klebsiella | Enterobacter | Hafnia | Serratia | Proteus |
| Лактоза | +/- | - | +/- | P | P | P | + | - | - | - |
| P-галактозидаза | + | - | + | P | P | + | + | + | + | - |
| Цитрат натрия | - | - | + | + | - | P | + | + | + | P |
| Малонат натрия | - | - | P | P | - | P | + | P | - | - |
| Мочевина | - | - | + | - | - | P | P | - | - | P |
| Фенил аланин | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Лизин | + | + | - | + | - | P | P | + | + | P |
| H ₂ S и подвижность | - | + | P | + | - | - | - | - | - | P |
| | +/- | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| Индол | + | + | P | + | P | P | - | - | - | P |

Обозначения: «+» — положительная реакция; «-» — отрицательная реакция; «х» — реакция с запозданием и не всегда положительная; «P» — 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-Рapid 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 целикомые 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 энтеробак-терий: наличие аргининдегидролазы, бета-галактозидазы, нитратре-дуктазы; утилизация инвитола, 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, нитраты, 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 (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 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, уреазы 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 |
| ММТ-Е1 | | | | |
| 1 | Образование сероводорода | H ₂ S | Черная, темно-серая | Бесцветная, светло-серая |
| 2 | Утилизация маннитола | МАН | Желтая, оранжевая | Красная |
| 3 | Наличие лизиндекарбоксилазы | ЛИЗ | Синяя, сине-зеленая | Желтая, зеленая |
| 4 | Образование индола | ИНД | Розовая, розовато-коричневая | Бесцветная |
| 5 | Наличие орнитиндекарбоксилазы | 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 | Угнетения раффинозы | РАФ | Желтая, оранжевая | Красная |
| 10 | Угнетения салицина | САЛ | Желтая, оранжевая | Красная |
| 11 | Угнетения 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 Салаханоса, малонат натрия, фе-нилаланин, бета-галактозидаза, инозитол, адонитол, целлобиоза, сахароза, трегалоза, маннитол, ацетоин (реакция Фогеса-Проскауэ-ра), эскулин, рамноза, сорбитол, мелибиоза, раффиноза, дурацитол, 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. Инокулируют 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 H, G, F, E, D и C

первого ряда стрипа (тесты: индол, сероводород, лизин, орнитин, уреазы, аргинин соответственно) добавляют по две капли парафинового масла. Инкубируют 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 | | | | |
| Н | 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 | Уреазы | URE | Красная, оранжево-красная | Желтая, бледно-оранжевая |

| Колонка | Тест | Код | Результат (цветовая реакция) | |
|---------|-----------------|-----|------------------------------|--------------------------|
| | | | Положительный | Отрицательный |
| Ряд 2-й | | | | |
| С | Аргинин | ARG | Синяя, сине-фиолетовая | Зеленая, зелено-синяя |
| В | Цитрат Симмонса | SCI | Синяя, сине-зеленая | Желтая, желто-зеленая |
| А | Малонат | MAL | Синяя, сине-зеленая | Желтая, желто-зеленая |
| Н | Фенил аланин | PHE | Темно-зеленая, зеленая | Желтая, желто-коричневая |

| | | | | |
|-------------------|--------------------|-----|------------------------------|-------------------------------|
| Q | Бета-галактозидаза | ONP | Желтая, бледно-желтая | Бесцветная |
| F | Инозитол | INO | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| I | Адонитол | ADO | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| D | Целлобиоза | CEL | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| S | Сахароза | SUC | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| T | Трегалоза | TRE | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| A | Миннитол | MAN | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| Ряд 4-й | | | | |
| H | Ацетин | VPT | Красная, розовая | Бесцветная, бледно-розовая |
| G | Жулин | ESL | Черная, темно-коричневая | Бесцветная, светло-коричневая |
| R | Сорбитол | SOR | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| E | Рамноза | RHA | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| M | Мелибиоза | MLB | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| Код результата | Тест | Код | Результат (цветовая реакция) | |
| | | | Положительный | Отрицательный |
| U | Раффиноза | RAF | Желтая, желто-зеленая | Зеленая |
| B | 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, O/F-тест, оксидационную 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 выпол-

нением и скоростью, с которой получают результаты реакции, позволяют применять САЛМтест для предварительной идентификации сальмонелл. Одна 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 флюоресценцию, 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 рН 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 1 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.

В 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 лактозы. Разливают во флаконы по 50 см³ и стерилизуют текучим паром 2 дня подряд по 30 мин или 30 мин при 112° С. При приготовлении раствора 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 × 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 × 7H₂O) и растворяют в дистиллированной воде до конечного объема 1000 см³. Стерилизуют 30 мин при 115° С.

Раствор 2. 10 г магния сульфата (MgSO₄ × 7H₂O), 1 г марганца хлорида (MnCl₂ × 4H₂O), 0,135 г железа хлорного (FeCl₃ × 6H₂O) и 0,4 г кальция хлорида (CaCl₂ × 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 Юценко-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 × 12H₂O) и 7 см³ 1/15 М раствора калия дигидрофосфата (KH₂PO₄). Устанавливают pH 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 (pH 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 кристалвиолета. 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 × 2H₂O), автоклавируют 1 ч при 100° С и оставляют на 11-18 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

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 лактозы. Разливают во флаконы по 50 см³ и стерилизуют текучим паром 2 дня подряд по 30 мин или 30 мин при 112° С. При приготовлении раствора 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 Юценко-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 × 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 × 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 гидроксиды (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 × 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 0,01%-ного водного раствора кристаллвиолета. Кипятят 15-20 мин на водяной 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 Н 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 (KH₂PO₄). 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,

3 г натрия хлорида, 2,5 г натрия таурохолат, 10 г лактозы, 0,1 г нейтрального красного, 20 г агар. Смесь стерилизуют 20 мин при 121° С.

Агар Плюскирева. Селективная среда для сальмонелл. Выпускается в сухом виде. Состоит из агара с желчными солями, натрия цитрата, натрия тисульфата, 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, лактозонегативные штаммы — бесцветные.

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

Среда Рапопорта. Селективная среда для сальмонелл. Состав: МПБ или бульон Хоттингера — 900 см³, желчь бычьего — 100 см³, глюкоза — 20 г, индикатор Андресе — 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 инкубулы 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.

Культур 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 сульфата (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 Биттера. Используют для дифференциации сальмонелл. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 0,05 г пептона, 0,5 г натрия цитрата, 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 сре-

дан с амминокислотами 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 (тартраты, мукаты, натрия цитрат). В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 10 г пептона, добавляют 8,5 см³ 0,1 Н раствора натрия гидроксиды, 12 см³ 0,25%-ного водного раствора бромтимолового синего, 10 г D-тартрата (или одну из следующих кислот: 5 г L-тартрата, 5 г мезо-тартрата, 10 г муката, 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 мукатурой 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 $\frac{2}{3}$ объема среды), при положительной — выпавший осадок незначителен.

Среда с триптофаном. Используют для определения у бактерий наличия триптофандезаминазы. 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 (Na₂HPO₄). 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 отрицательном результате среда остается абсолютно прозрачной, в то время как в контрольной пробирке заметно помутнение.

Среда Клизлер. 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 сернокислого, 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 (ацетонин). Для этого испытуемую 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 испытуемой культуры и инкубируют 2-5 сут при 25° С. Затем добавляют 3-6 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 (KH₂PO₄), 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 (защелачивание 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, K₂HPO₄ — 1 г, NH₄ x H₂PO₄ — 1 г, C₆H₅O₇Na₃ x 5H₂O — 3 г, бромтимоловый синий — 0,08 г, вода 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 цитрата штрифта 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 Андресе, углеводов 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 углеводов. 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-фенилаланин — 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 аргининдегидролазы. Состав: мясная вода — 400 см³, пептон — 5 г, глюкоза — 1 г, вода дистиллированная — 600 см³, 0,1%-ный 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 1 см⁴. 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 свине 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, пиразинкарбоксиамид — 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 1-2 капли эфира, тщательно ее встряхивают, оставляют в покое до отста-

ивания 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) — остропотекающая 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 септи-

мени, 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 — из 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) брыжеечных лимфатических узлов), относят к возбудителю отечной болезни (энтеротоксемии) поросят.

Морфология клеток эшерихий в культуре. В мазках, приготовленных из культур, эшерихий обнаруживают в виде грамтрикательных, 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 H₂S, дающие поло-

жительную реакцию с метиловым-красным (среда окрашивается в розово-красный цвет) и отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра (среда окрашивается 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: L-антиген термолabileный, инактивируется при 100° С в течение часа;

V-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; H-антиген термолabileный, инактивируется при 60° С в течение 1 часа, протеин, 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 инвазивно-агглютинабельными 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 очередь.

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, 987Р, 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, 987Р, 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, 987Р и А20 используют культуры эшерихий, выращенные на МПА или агаре Хоттингера, для обнаружения антигенов К99 и F41 — на среде Минка. В обоих случаях посеы 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. Реак-

цию 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 (колидиареи).

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 посева серовато-белых колоний со среды с сорбитом (не ферментирующие этот многоатомный спирт), исследуют с агглютинирующей коли-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-88 | Поросята | 08, 0141, 0147, 0149, 0157 |
| 987Р | Поросята | 09, 020, 0141 |
| К99 | Поросята, телята, ягнята | 08, 09, 020, 0101 |
| F41 | Телята | 09, 101 |
| 18 | Поросята | н.д. |
| A20 | 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 О-коли-сыворотками или изучают их патогенность в биопробе на бе-

лых 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 1 см³ 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 поливалентной сыворотки, а затем в пробирочной реакции агглютинации с каждой 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 к 2,4 см³ физиологического раствора добавляют 0,1 см³ сыворотки. Во 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 500 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 флоккуляции).

Штагив 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 установ-

лено, 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 мышах 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. Свины: | |
| диарея у поросят | 08, 09, 020, 045, O101, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149, 0157 |
| энтеротоксемия у поросят | 0138, 0139, 0140, 0141 |
| 3. Овцы: | |
| сепсис у ягнят | 078, 015, 020, 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 |
| 7. Птица: септицемия цыплят, сальпингит кур-несушек, колигранулематоз | 01, 02, 078, 015, O101, 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 энтероцитальных 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 Ent-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: ТС_а и ТС_в.

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, 0149, 0139 и 0157.

Энтеротоксигенные *E.coli* — возбудители колибактериоза новорожденных телят, ягнят и козлят, синтезируют в основном ТСа энтеротоксины: (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 _а 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. Метод 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 че-

го 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 диарею животных с признаками геморрагического гастроэнтерита, бактерии, 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 аборт.

Вторичные сальмонеллезы осложняют течение основного заболевания (чума свиней, пастереллез и др.), при этом характерные для сальмонеллез признаков 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 сальмонеллез 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*; *S. choleraesuis subsp. indica* и *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 осно-**

ван на результатах бактериологического и серологического исследования.

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 кровескапельной реакции агглютинации или кровескапельной реакции непрямой геммагглютинации для диагностики пуллороза-тифа.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из полученного материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Сальмонеллы являются грамтрицательными, 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 «Наставлением 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 броидильным 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 исследо-

вазии фекалий и при получении гемокультуры) в среды накопления. Из 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 граммотрицательных, 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; каталазоположительные; 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 H₂S; 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.

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

Таблица 24 - Биохимические свойства рода *Salmonella*

| Проба | % позитивных реакций |
|--------------------------------------|----------------------|
| Ферментация глюкозы | 100% |
| Сбраживание газа на среде с глюкозой | 91,9% |
| H ₂ S | 91,6% |
| Индол | 1,1% |
| Арабиноза | 89,2% |
| Сорбит | 94,1% |
| Дульцит | 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>Diari-zonae</i> | <i>Houtenae</i> | <i>Indica</i> |
| Гидролиз крахмала (IHC-test) | + | - | (-) | + | + | - | +/- |
| Провождение кислоты из лактозы | - | - | - | (-) | (+) | - | (-) |

| | | | | | | | |
|--|---|---|-----|---|-----|-----|------|
| дульцита | - | + | + | - | - | - | +/- |
| муката | + | + | + | + | +/- | - | + |
| галактоуроната | + | - | + | - | + | + | Н.Д. |
| Утилизация мальтозы | - | - | + | + | + | - | + |
| d-тартрата | - | + | +/- | - | (-) | +/- | + |
| Гидролиз желатини | - | - | + | + | + | + | + |
| Первоначальные источники выделения: теплокровные животные; | - | + | - | - | - | - | Н.Д. |
| холоднокровные и объекты внешней среды | + | - | + | + | + | + | Н.Д. |

Примечания: Данные по подвиду *Indica* приведены по *Bergey's 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 сальмонелл 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 O-антигена в серологических реакциях.

В соответствии с содержанием тех или иных O-антигенов сальмонеллы делят на серологические группы, обозначаемые заглавными буквами латинского алфавита. Отдельные антигенные факторы O-антигена обозначаются арабскими цифрами. Некоторые антигенные факторы O-антигена (далее просто O-антигены) называют главными O-антигенами, т.к. они встречаются только в одной из групп сальмонелл и именно они определяют групповую принадлежность бактерий. Другие O-антигены называют малями, 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-гексуроновой 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 термолabile. 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. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. anatum* и др. M-антиген — кислый полисахарид. Он нерастворим 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 K-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.

H-O-вариации — переход из жгутиковой HO-формы в безжгутиковую O-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).

H-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 Н). Этот принцип положен в основу диагностической антигенной схемы 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 (O) | Жутиковый антиген (H) | |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------|
| | | фаза 1 | фаза 2 |
| Группа А (O2) | | | |
| S. paratyphi A | 1,2, 12 | a | (1,5) |
| S. tyfi | 1,2, 12 | g, d | - |
| Группа В (O4) | | | |
| S. Visangani | 1,4, (5), 12 | a | 1,2 |
| S. hexalek | 4, 12, 27 | a | 1,5 |
| S. fulica | 4, (5), 12 | a | 1,5 |
| S. archavaleta | 4, (5), 12 | a | 1,7 |
| S. bispebjerg | 1,4, (5), 12 | a | e. n. x |
| S. abortus equi | 4, 12 | - | e. n. x |
| S. tinda | 1,4, 12, 27 | a | e. n. Z15 |
| S. paratyphi B | 1,4, (5), 12 | b | 1,2 |
| S. Java | 1,4, (5), 12 | b | (1,2) |
| S. linnete | 1,4, 12, 27 | b | 1,5 |
| S. Canada | 4, 12 | b | 1,6 |
| S. uppsala | 4, 12, 27 | b | 1,7 |
| S. sofia | 1,4, 12, 27 | b | (e. n. x) |
| S. abony | 1,4, (5), 12, 27 | b | e. n. x |
| S. abortus bovis | 1,4, 12, 27 | b | e. n. x |
| S. wazania | 1,4, 12, 27 | b | e. n. Zis |
| S. schleissheim | 4, 12, 27 | b | - |
| S. Wien | 1,4, 12, 27 | b | 1, w |
| S. legum | 1,4, 12, 27 | c | 1,5 |
| S. abortus ovis | 4, 12 | c | 1,6 |
| S. altendorf | 4, 12, 27 | c | 1,7 |
| S. bury | 4, 12, 27 | c | Z6 |
| S. stanley | 1,4, (5), 12, 27 | d | 1,2 |
| S. - | 1,4, 12, 27 | d | 1,7 |
| S. Duisburg | 1,4, 12, 27 | d | e. n. Z15 |
| S. salmatis | 4, 12 | d, e, h | d, e. n. Z15 |
| S. saint paul | 1,4, (5), 12 | e, h | 1,2 |
| S. Reading | 1,4, (5), 12 | e, h | 1,5 |
| S. Kaspatind | 4, 12 | e, h | 1,7 |
| S. chesler | 1,4, (5), 12 | e, h | e. n. x |
| S. San diego | 4, (5), 12 | e, h | e. n. Z15 |
| S. derby | 1,4, (5), 12 | f, g | (1,2) |
| S. gona | 1,4, 12 | f, g, s | - |
| S. exen | 4, 12 | v, m | - |
| S. caledon | 1,4, 12, 27 | g, m, (s), t | e. n. x |
| S. hato | 4, (5), 12 | g, m, s | - |
| S. california | 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. havana | 4, (5), 12 | m, t | 1,5 |
| S. carlsburium | 1,4, (5), 12 | i | 1,2 |
| S. hana | 1,4, (5), 12 | i | 1,5 |
| S. anima | 4, 12 | i | 1,6 |
| S. alton ester | 1,4, 12, 27 | i | 1, w |
| S. tyris | 4, (5), 12 | κ | e. n. Z11 |
| S. tyris | 4,5, 12 | l, v | 1,2 |
| S. orleava | 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 | e, Z ₁₁ , Z ₂₁ | 1, II, Z ₁₅ |
| S. kunduchi | 1,4(5), 12, 27 | e, Z ₁₁ , Z ₂₁ | 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 | 1, 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 | e, n, Z ₁₅ |
| S. shubra | 4(5), 12 | z | 1,2 |
| S. kiambu | 4,12 | z | 1,5 |
| S. indiana | 1,4,12 | z | 1,7 |
| S. preston | 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 ₂₃ | (1,2) |
| S. kalamu | 4,12 | Z ₄ , Z ₂₄ | (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 ₆ |
| S. brancaster | 1,4,12,27 | Z ₂₉ | - |
| Група C₁(O6, 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 |
| S. leopoldville | 6,7 | b | Z ₆ |
| S. paratvphi C | 6, 7(vi) | c | 1,5 |
| S. choleraesuis | 6,7 | (c) | 1,5 |
| S. typhisuis | 6,7 | c | 1,5 |
| S. birkenhead | 6,7 | c | 1,6 |
| S. isangi | 6,7 | d | 1,5 |
| S. araersfoort | 6,7 | d | e, n, x |
| S. gombe | 6,7 | d | e, n, Z ₁₅ |
| S. livingstone | 6,7 | d | 1, w |
| S. larochele | 6,7 | e, h | 1,2 |
| S. lomita | 6,7 | e, h | 1,5 |
| S. norwich | 6,7 | e, h | 1,6 |
| S. braenderup | 6,7 | e, h | e, n, Z ₁₅ |
| S. montevideo | 6,7 | g, m, (n), s | (1,2,7) |
| S. menston | 6,7 | g, s, t | (1,6) |
| S. haelsingborg | 6,7 | m, p, t, (u) | - |
| S. oranienburg | 6,7 | m, t | - |
| S. norton | 6,7 | i | 1, w |
| S. thompson | 6,7 | k | 1,5 |
| S. davtona | 6,7 | k | 1,6 |
| S. Singapore | 6,7 | k | e, n, x |
| S. concord | 6,7 | l, v | 1,2 |
| S. irumu | 6,7 | l, v | 1,5 |

| | | | |
|---------------------------------------|-----|----------------------------------|-----------------------|
| 5. henn | 6,7 | 1, v | e, n, x |
| 5. potsdam | 6,7 | 1, v | e, n, Z ₁₅ |
| 5. colorado | 6,7 | 1, w | 1,5 |
| 5. uesazona | 6,7 | 1, Zu | 1,5 |
| 5. kenya | 6,7 | 1, Z ₁₃ | e, n, x |
| 5. vichow | 6,7 | r | 1,2 |
| 5. infantis | 6,7 | r | 1,5 |
| 5. nigeria | 6,7 | r | 1,6 |
| 5. colindale | 6,7 | r | 1,7 |
| 5. papuana | 6,7 | r | e, n, Z ₁₅ |
| 5. richmond | 6,7 | y | 1,2 |
| 5. bareilly | 6,7 | y | 1,5 |
| 5. gatow | 6,7 | y | 1,7 |
| 5. mikawasima | 6,7 | y | e, n, Z ₁₅ |
| 5. tosamanga | 6,7 | z | 1,5 |
| 5. equatoria | 6,7 | Z ₄ , Z ₂₃ | e, n, Z ₁₅ |
| 5. inganda | 6,7 | Z ₁₀ | 1,5 |
| 5. eschweiler | 6,7 | Z ₁₀ | 1,6 |
| 5. djugu | 6,7 | Z ₁₀ | e, n, x |
| 5. tennessee | 6,7 | Z ₂₉ | - |
| 5. arizonae | 6,7 | - | 1,6 |
| I nympha C₁(06. II) | | | |
| 5. curacao | 6,8 | a | 1,6 |
| 5. nordufer | 6,8 | a | 1,7 |
| 5. narashino | 6,8 | a | e, n, x |
| 5. nazova | 6,8 | b | 1,5 |
| 5. gatum | 6,8 | b | e, n, x |
| 5. bandia | 6,8 | b | Z ₆ |
| 5. wingrove | 6,8 | c | 1,2 |
| 5. Utah | 6,8 | c | 1,5 |
| 5. bronx | 6,8 | c | 1,6 |
| 5. belem | 6,8 | c | e, n, x |
| 5. muenchen | 6,8 | d | 1,2 |
| 5. manhattan | 6,8 | d | 1,5 |
| 5. sterrenbos | 6,8 | d | e, n, x |
| 5. herston | 6,8 | d | e, n, Z ₁₅ |
| 5. newport | 6,8 | e, h | 1,2 |
| 5. kottbus | 6,8 | e, h | 1,5 |
| 5. tsirongwe | 6,8 | e, h | e, n, Z ₅ |
| 5. sandow | 6,8 | f, g | e, n, Z ₁₅ |
| 5. chincol | 6,8 | g, m, s | (e, n, x) |
| 5. bangwanath | 6,8 | m, t | 1,5 |
| 5. permiston | 6,8 | m, t | e, n, x |
| 5. ludenburg | 6,8 | i | 1,2 |
| 5. takoradi | 6,8 | i | 1,5 |
| 5. homariensis | 6,8 | i | e, n, x |
| 5. aba | 6,8 | i | e, n, Z ₁₅ |
| 5. blockley | 6,8 | k | 1,5 |
| 5. charlotten- | 6,8 | k | e, n, Z ₁₅ |
| 5. litchfield | 6,8 | l, v | 1,2 |
| 5. founda | 6,8 | l, v | 1,5 |
| 5. manchester | 6,8 | l, v | 1,7 |
| 5. edmonton | 6,8 | l, v | e, n, Z ₁₅ |
| 5. layed | 6,8 | l, w | 1,2 |

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|----------------------------------|--------------------------|
| S. bovismorbi- | 6,8 | r | 1,5 |
| S. hidaleo | 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 ₂₃ | e, n, Z ₁₅ |
| S. duesseldorf | 6,8 | Z ₄ , Z ₂₄ | - |
| S. tallahassee | 6,8 | Z ₄ , Z ₃₂ | - |
| S. mapo | 6,8 | Z ₄₀ | 1,5 |
| S. hadar | 6,8 | Z ₁₀ | e, n, x |
| S. glostrup | 6,8 | Z ₁₀ | e, n, z ₁₅ |
| Gynna C₂ (08) | | | |
| S. shipley | 8,20 | b | e, n, z ₁₅ |
| S. vireinia | 8 | d | 1,2 |
| S. labadi | 8,20 | d | Z ₆ |
| S. emck | 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. alaphon | 8 | y | 1,7 |
| S. corvallis | 8,20 | Z ₄ , Z ₂₁ | (Z ₄) |
| S. albany | 8,20 | Z ₄ , Z ₂₄ | - |
| S. molade | 8,20 | Z ₁₀ | Z ₆ |
| S. tamale | 8,20 | Z ₇₀ | (e, n, z ₁₅) |
| Gynna C₁ (06, 7,14) | | | |
| S. kaduna | 6, 7, 14 | c | (e, n, z ₁₅) |
| S. eimsbuettel | 6,7, 14 | d | 1, w |
| S. pelsenkir- | 6, 7, 14 | l, v | Z ₆ |
| Gynna D₁ (09,12) | | | |
| S. sendai | 1,9, 12 | a | 1,5 |
| S. miami | 1,9, 12 | a | 1,5 |
| S. onarimon | 1,9, 12 | b | 1,2 |
| S. frintrop | 1,9, 12 | b | 1,5 |
| S. alabama | 9, 12 | c | e, n, Z ₁₅ |
| S. typhi | 9, 12, (vi) | d | - |
| S. ndolo | 9, 12 | d | 1,5 |
| S. eastbourne | 1,9, 12 | e, h | 1,5 |
| S. berta | 1,9, 12 | f, g, t | - |
| S. entricitidis | 1,9, 12 | g, m | (1,7) |
| S. blecolam | 1,9, 12 | g, m, c | - |
| S. dublin | 1,9, 12, (vi) | g, P | - |
| S. rostock | 1,9, 12 | g, P, " | - |
| S. moscow | 9, 12 | g, q | - |
| S. pensacola | 1,9, 12 | m, t | - |
| S. seremban | 9, 12 | i | 1,5 |
| S. clabomei | 1,9, 12 | k | 1,5 |
| S. mcdoza | 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. iaviana | 1,9, 12 | l, Z ₇₈ | 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. wangata | 1,9, 12 | Z ₄ , Z ₂₃ | (1,7) |

| | | | |
|-------------------------------------|----------|----------------------------------|-----------------------|
| 1. portland | 9, 12 | Z ₁₀ | 1, 5 |
| 2. callinarum | 1, 9, 12 | - | - |
| Группа D₂ (09,46) | | | |
| 3. baldon | 9, 46 | a | e, n, x |
| 4. wormigerode | 9, 46 | Гг | - |
| 5. adabraka | 3, 10 | Z ₄ , Z ₂₃ | 1, 7 |
| 6. oberara | 3, 10 | Z ₁₀ | 1, 2 |
| 7. lexington | 3, 10 | Z ₁₀ | 1, 5 |
| 8. cosquilhatville | 3, 10 | Z ₁₀ | 1, 7 |
| 9. kristianstad | 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 сальмонеллезных 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 Номер О- комплексных сывороток | Рецепторный состав комплексных сывороток | Набор № 2 | | |
|---|--|---------------------------|--------|-----------|
| | | Монорецепторные сыворотки | | |
| | | О | Н | |
| | | | I фаза | II фаза |
| | 4,7,8,9,10,15,19 | 6 | i m | e, n, x |
| | 4,11,16,17,18,21,28 | 14 | c t | 2 |
| | 7,11,30,35,38,39,40 | 46 | r p | 5 |
| | 8,16,30,41,42,43,44 | 34 | e h | 6 |
| | 9,17,35,41,45,47,48 | 20 | l v | (1,2,5,6) |
| | 10,18,38,42,45,50,52 | | d | |
| | 15,21,39,43,47,50,53 | | b | |
| | 19,23,40,44,48,52,53 | | g | |

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

| | | |
|---|--------------|----------------------------|
| | | Трегалоза + |
| | | D-тарtrate - |
| <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. <i>jena</i> | 1,9,12: gm:- | Глицерин (бульон Штерна) + |
| <i>S. enteritidis</i> var. <i>ratin</i> | 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 иммунофлуоресценции 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

| Виды животных | Сероварианты сальмонелл |
|----------------------|---|
| Крупный рогатый скот | <i>S. dublin</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. abortus bovis</i> , <i>S. enteritidis</i> |
| Свиньи | <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. typhisuis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. brandenburg</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. muenster</i> |
| Мелкий рогатый скот | <i>S. abortus ovis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. dublin</i> |
| Лошади | <i>S. abortus equi</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. dublin</i> |

| | |
|---|---|
| Птица | <i>S. gallinarum</i> , <i>S. pullorum</i> , <i>S. typhimurium</i> |
| Любые теплокровные животные, в т.ч. грызуны; рептилии | <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> <i>S. arizonae</i> |
| Продукты животного прирождения | <i>S. typhimurium</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. pullorum</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. derby</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. agona</i> , <i>S. panama</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. heidelberg</i> |

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 рН — 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 покрывают покровным стеклом. Для иммерсии используют не флуоресцирующее масло или его заменитель, приготовленный из чистого диметилфталата (100 мл) и нафталина сублимированного (1,75 г) или тимола чистого (5 г). Мазки просматривают под люминесцентным микроскопом при увеличении 5x90 и силе тока 4,1 А.

Перишленные флуоресцирующей сывороткой сальмонеллы имеют светящийся периферический контур (ободок). Это характерное свечение контура визуально оценивается в крестах: (++++) — сияющее зеленоватое свечение; (++++) — яркое желтовато-зеленоватое свечение; (++) — слабее желтовато-зеленоватое или беловатое свечение отчетливо заметного контура; (+) — слабое беловатое свечение различимого контура;

(-) — клетки в виде сероватых теней, контур отсутствует или слабо замечен 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 гетерологичной 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 фиксирования 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, и 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 коагуляции. С этой целью используют набор сальмонеллезных диагностикумов серогрупп В, С₁, С₂, Д, Е для реакции коагуляции.

Для постановки реакции исследуемый материал подрачивают в жидкой питательной среде (селенитовый бульон, МПБ) в течение 12-18 часов при 37° С. После подрачивания 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 капель исследуемой пробы, затем в первые 5 капель добавляют по 1 каплю 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 слияния, стекло помещают во влажную камеру на 30 мин при комнатной температуре.

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

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

Интенсивность 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 агглютинат; + — 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

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-го 18-часовой бульонной культуры испытуемого штамма (можно использовать взвесь суточной агаровой культуры на физиологическом растворе) наносят тонко оттянутой пастеровской пипеткой на хорошо увлажненный 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 поливалентной 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 лизируются 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 D₁ для диагностики сальмонеллеза.

Сыворотки крови животных исследуют с различными антигенами в зависимости от вида животного, а именно: овец — с антигеном серогруппы В и, как исключение (при соответствующих бактериологических показаниях), с антигеном D крупного рогатого скота — с антигеном серогруппы D₁ и В; 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 см³ 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 см³ антигена в рабочем разведении, в первую пробирку — 0,5 см³ физиологического раствора.

Для контроля антигенов на самоагглютинацию к 0,5 см³ антигена в рабочем разведении добавляют 0,5 см³ физиологического раствора.

Штативы с пробирками тщательно встряхивают до получения равномерной взвеси, помещают в термостат при 37-38° С 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 ее 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 сальмонеллезных агглютининов, животных считают отрицательно реагирующими.

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

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

Возраст цыплят, в котором удается выявить наибольшее количество носителей 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

Род *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, остроо 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, ставший на диагностике иерсиниоза и псевдотуберкулеза.

Иерсиниоз — инфекционная болезнь многих видов животных и человека, характеризующаяся у молодняка животных гастроэнтероколитами с развитием диарей (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, синуса, 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 распространённости иерсиний способствуют их психрофильные свойства (способны 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, абсцессы и маститы. Абсцессы 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 дыхательным 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.

Иерсинии хорошо растут на дезоксихолатном агаре, средах МакКонки, Эндо, Серова, СБТС. Среда Плоскирева и висмут-сульфит агар обладают выраженным ингибирующим действием на иерсинии 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 холодного обогащения, основанный на способности иерсиний размножаться в питательных субстратах при низких температурных температурах. Большинство других микроорганизмов, включая и интеробактерии 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 холодного 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 идентифика-

ции чистой культуры *Y. enterocolitica* экспресс-методы, предусматривающие использование «холодового удара», «теплого 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 «теплого 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 персиний 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 0,1 мл диметил-парафенилендиамина, содержимое пробирок перемешивают. При наличии оксидазы в течение 30 сек происходит окрашивание бульона в фиолетовый цвет. Дальнейшему изучению подлежат только грамотриша-

тельные, не образующие оксидазу культуры (сем. *Enterobacteriaceae*). Такие культуры высевают на среду Клиглера и среду с мочевиной по Кристенсену. Для дальнейшего изучения отбирают культуры, не образующие сероводород (оранжево-красный цвет среды Клиглера не изменяется в черный после 24 час инкубирования посевов), обладающие уреазной активностью (красно-малиновое окрашивание среды Кристенсена в течение 1-й суток инкубирования посевов).

Характер роста иерсиний на питательных средах. На плотных питательных средах при 4-28° С оба возбудителя в аэробных условиях образуют 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 (МПБ, 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, кирпично-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 возбудителей 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* цепочками образует чаще, а также может окрашиваться биполярно.

Иерсиний обоих видов подвижны при температуре ниже 30° С (подвижность выражена максимально при 20-22° С) за счет перитрихально 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 манинит, 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, маинит 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*, *Y. ruckeri* 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 | | | | |
| Взятая 37° С | - | + | - | - | - | - | d | d | - | - |
| Мертвая 37° С | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Скарлатина 37° С | - | + | + | + | + | d | + | + | - | - |
| Туберкулез Проскауер | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Туберкулез Проскауер | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Рожистая 25° С | + | - | - | - | - | - | + | + | - | + |
| Цитрат лимонная 37° С | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Цитрат лимонная 25° С | - | - | - | - | - | - | d | - | - | d |
| Индол | - | - | + | - | - | - | + | + | d | - |
| Воспаления 37° С | + | + | + | + | - | - | + | + | d | d |
| Скарлатина 37° С | d | + | - | - | - | - | + | + | d | - |
| Скарлатина 37° С | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Скарлатина 37° С | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |

«+» — 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.

Иерсиний обоих видов подвижны при температуре ниже 30° С (подвижность выражена максимально при 20-22° С) за счет перитрихально 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, фенилаланиндеаминазу, подвижные при 4-28° С и неподвижные при 37-42° С, не ферментирующие лактозу и ферментирующие с образованием кислоты манинит, 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, маинит 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 фенилаланиндеаминазой, 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*, *Y. ruckeri* 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 | | | | |
| Воспаления 37° С | - | + | - | - | - | - | d | d | - | - |
| Воспаления 37° С | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Слизь при 37° С | - | + | + | + | + | d | + | + | - | - |
| Ферменты Проскауера 37° С | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ферменты Проскауера 25° С | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| Разноцветность 25° С | + | - | - | - | - | - | + | + | - | + |
| Цитрат по Льюису 37° С | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Цитрат по Льюису 25° С | - | - | - | - | - | - | d | - | - | d |
| Индол | - | - | + | - | - | - | + | + | d | - |
| Воспаления 37° С | + | + | + | + | - | - | + | + | d | d |
| Слизь при 37° С | d | + | - | - | - | - | + | + | d | - |
| Ферменты 37° С | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Воспаления 37° С | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - |

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

Патогенность псевдотуберкулеза по ряду свойств сходна с возбудителем чумы (*Y. pestis*) и в ряде случаев, главным образом при исследовании выделений 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* приведены 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 | - | + |
| Ферментация мслибиозы | - | + |
| Чувствительность к фагу при 37° С | + | d |
| Чувствительность к фагу при 25° С | + | - |
| Реакция с антисывороткой к фракции I <i>Y.pestis</i> | + | - |
| Продукция коагулазы | + | - |
| Продукция 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 мочеvine, 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 R-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 (O) и жгутиковый (H) антигены. У вирулентных штаммов обнаруживаются V- и W-антигены, расположенные в наружной мембране клетки. У отдельных штаммов имеется антиген K1, связанный с фимбриями и разрушающийся только автоклавированием при 120° С в течение час.

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

Наиболее распространенными среди животных и людей являются серовары: 01,2a,3; 02a, 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 O3 распространены на всех континентах. Частота их обнаружения на территории России составляет от 15 до 60% и более. 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 в наружной мембране и выраженные при температуре культивирования бактерий 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 H-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 сыроотками к некоторым представителям этого семейства. У *Y. pseudotuberculosis* установлены антигенные связи с сальмонеллами энтереллами и энтерихиями, у *Y. enterocolitica* — с сальмонеллами, протейями, серрациями, гафниями, клебселлами. 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 реак-

ций 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 диагностическими 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 агаровой культуры испытуемого штамма. После получения гомогенной суспензии стекло покачивают осторожными круговыми движениями. Положительная реакция (агглютинация) наступит 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 павших 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 эпи-

демонологических 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 копрофильтратов и в 21-38% проб мочи. Чувствительность метода $10^6\text{-}5 \times 10^5$ микробных клеток в 1 см^3 ;

ИФА-БНМ-П — тест-система для выявления антигенов возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в материалах от больных (копрофильтраты, 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 копрофильтратов 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 копрофильтраты, выпот брюшной полости вносят в фосфатно-буферную или буферно-казеиново-дрожжевую среду в количестве 1 г на 5 см^3 среды для опарашивания при температуре $3\text{-}7^\circ \text{C}$. Внутренние органы и ткани расщипывают 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 пропускания светового потока исследуемого образца достигает величины не менее 0,05.

ций 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 диагностическими 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 агаровой 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 павших 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 эпи-

демонологических 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-I — 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 копрофильтратов и в $21-38\%$ проб мочи. Чувствительность метода $10^5-5 \times 10^5$ микробных клеток в 1 см^3 ;

ИФА-БНМ-II — тест-система для выявления антигенов возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в материалах от больных (копрофильтраты, моча), павших и вынужденно убитых животных.

Для определения видовой принадлежности выявленных иерсиний (антигенов возбудителя) пробы, давшие положительную реакцию в тест-системе ИФА-БНМ-II, 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 копрофильтратов в первые 5 дней болезни. На пике инфекционного процесса данным методом выявляют до 70% инфицированных животных.

Для исследования материала в тест-системе ИФА-БНМ-II копрофильтраты, выпот брюшной полости вносят в фосфатно-буферную или буферно-казеиново-дрожжевую среду в количестве 1 г на 5 см^3 среды для подращивания 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 подращивания. 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 микробиологии 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 взвесь 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 (РИА). РИА 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 O1, O5, 30; O7,8.

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 О3; О9; О5, 27; О8; О6, 30. В Европе преобладают бактерии сероваров О3 и О9, в США — О8, на Дальнем Востоке — О6.

В многочисленных работах, посвященных изучению иерсиниозов у животных, сообщается, что практически на всех территориях от свиней выделывают *Y. enterocolitica* сероваров О3; О4, 32; О5; О5, 27; О6, 30; О7; О8; О9; О11; О12; О17 и О19, а иерсиний, выделенные от крупного рогатого скота, относятся к сероварам О3; О4; О5, 27; О7, 8; О12; О13 и О18.

Определение патогенности *Y. pseudotuberculosis* являются безусловно патогенными микроорганизмами. У них, в отличие от *Y. enterocolitica*, отсутствует зависимость вирулентности от наличия плазмиды, контролирующей синтез V- и W-антигенов и кальцийзависимость 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 определению 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 инкулируют 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, наблюдается 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 очаги, напоминающие туберкулезные бугорки, но в отличие от них, не подверженные обызвествлению. Аналогичные абсцессы или узелки обнаруживают и в легких.

К безусловно патогенным *Y. enterocolitica* относятся бактерии сероваров О3; О4, 32; О5; О5, 27; О6, 30; О7, 8; О8; О9 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 водно-электролитного баланса и энтеросорбции. В реализации действия энтеротоксина принимают участие и простоглаидины. 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 морских 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 устойчивы; у морских свинок конъюнктивит, а в ряде случаев абортивный кератит при введении патогенных иерсиний серовара 09 в конъюнктивальную

новость. При этом штаммы серовара ОЗ патологической реакции не вызывают.

Лучшими способами заражения являются внутрибрюшное и подкожное введение бактерий. При этих способах аппликации иерсиний в разных опытах и для различных сероваров (ОЗ; О8; О9; О6,30) 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 (бестимульные 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 биотуранных 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 пересевами 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 та-

ких 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 Ca ++, 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. Иног да 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, желтоватого 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 иерсиний, 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 пиразинкарбоксамидом. 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 иерсиний, продуцирующих пиразинамидазу, приобретают розовую окраску, патогенных — не изменяют своего цвета.

Серологическая идентификация вирулентных иерсиний 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 петле 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 энтеробактерий 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 к началу 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 диагностикумов используется для обнаружения иерсиниозных антигенов в патоло-

стекляном 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 многократном 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 проще это 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 и 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 реакции антиген разводят 1:10 (рабочая концентрация 1 млрд./мл) 0,9%-ным раствором натрия хлорида.

Методика приготовления компонентов реакции, техника постановки ИФА и ИФА изложены в инструкции по применению пероксидазных субстратов к иммуноглобулинам М и G, выпускаемым ТОО «Полигност» в г. 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, котяткам 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 симптомокомплексом диареи наряду с морганеллой выделяют других представителей энтеробактерий, корона-, ротавирусы, псевдомопасы, клостридии 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 10% -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 грамтрицательными, 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, рН 7,0-7,4. К питательным средам неприхотливы 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 посеvy просматривают, на каждой из чашек отбирают по 1-2 колонии, характерных для морганелл, и отсевают их на обогащенный МПА в пробирках. При наличии роста только в МПБ и обнаружении в культуре грамтрицательных с закругленными концами палочек, не образующих спор и капсул, культуру пересевают на упомянутые выше селективно-дифференциальные среды, с которых в дальнейшем проводят 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 с 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 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 висмут-сульфит агаре колонии морганелл округлые, с ровным краем, гладкие, блестящие, более плоские, чем на МПА, имеют зеленовато-оливковый цвет. При многократных посевах характерные S-формы колоний морганелл

нелл 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 грамотрицательных, прямых палочек с закругленными концами. Диаметр клеток 0,6-0,9 мкм, длина 1,5-3,0 мкм. Подвижны за счет перетрихально расположенных жгутиков. Спор и капсул не образуют. В поле зрения располагаются одиночно, реже — попарно.

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 аргининдигидролазе отрицательные, дезаминируют фенилаланин и триптофан, декарбоксилируют орнитин, гидролизуют мочевины. 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 толстого его отдела). Свойства образуемого морганеллами термолabileного экзотоксина изучены недостаточно. Большая часть патогенных штаммов морганелл продуцирует гемолизины, вызывающие лизис эритроцитов разных видов животных и человека. Проявлению патогенных свойств способствует и карбоксилазная активность этих бактерий.

Культуру выделенных морганелл относят к патогенной в случае установления ее принадлежности к одной из серогрупп, наиболее часто вызы-

связанных заболевание у молодняка животных, или при положительном результате биопробы.

Серологическая индикация и идентификация морганелл

Реакция агглютинации. Ускоренная индикация морганелл в реакции нейтрализации антител (РНАт). 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 агглютинативных 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. niorgoni*. Серогрупповую принадлежность морганелл устанавливают в реакции агглютинации со специфическими О-сыворотками. При этом допустимо 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 диарею у молодняка сельскохозяйственных животных. С этой целью используют набор сывороток нативных морганеллезных агглютинирующих серогрупповых к 8 серологическим группам: 01; 016; 026; 029; 033; 045; 049 и 013а.

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 см³ на 1 пробирку культуры на скошенном МПА). Суспензию прогревают при 100° С 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 см³) 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 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 см³ 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 см³ нативной сыворотки смешивают с 4,9 см³ карболинизированного физиологического раствора либо 0,5 см³ сыворотки, разведенной 1:10, смешивают с 2 см³ 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 см³ разведенных сывороток приносят по 0,5 см³ антигена.

Одновременно ставятся контроли на спонтанную агглютинацию антигена (0,5 см³ антигена + 0,5 см³ карболинизированного физиологического раствора) и флокуляцию сывороток (1 см³ сыворотки в разведении 1:100).

Опытные и контрольные пробирки встряхивают, помещают в термостат При 37-38° С 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 с 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 (минимальные 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 индикации эпизоотических штаммов морганелл в патологическом материале, кормах, объектах внешней среды. Она позволяет обнаружить искомые 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 мышках.

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 (агглютинации) эритроцитов, которые образуют на дне лунок по центру лодочной пластины осадок в форме диска или кольца (положительный результат РНАт). При отсутствии в исследуемом материале морганелл указанных 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 гематтлюминации (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 pH 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 pH 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 серогруппе агглютинирующей сыворотки.

Одновременно на отдельной полистироловой пластине ставят следующие контроли: 1) контроль сывороток для исключения неспецифической гемагглютинации (0,4 см³ сыворотки в разведении 1:100+0,05 см³ 3,5-4%-ной взвеси нормальных формализированных эритроцитов барана); 2) контроль эритроцитарных диагностикумов для исключения спонтанной агглютинации сенсibilизированных эритроцитов (0,4 см³ забуференного физраствора + 0,05 см³ 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 реакция 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 устанавливают 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 с гомологичными агглютинирующими сыворотками разных серий титр 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° С 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 отсевают с агара Плоскирева серовато-голубоватого цвета, а с висмут-сульфит агара зеленовато-оливкового цвета мелкие полупрозрачные колонии S-формы. Оставшийся материал снимают с чашки Петри 6-8 см³ стерильного забуференного физраствора. Полученную бактериальную суспензию прогревают в водяной бане при 100° С в течение 15-20 минут и используют для постановки РНАт.

Во все лунки полистироловых пластин наливают по 0,2 см³ забуференного физраствора. В первую лунку каждого ряда вносят 0,2 см³ суспензии, исследуемой на наличие морганелл, и готовят ее последовательные 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 см³ морганеллезной агглютинирующей сыворотки определенной серогруппы в разведении 4 ГЕ (например, если в РНГА 1 ГЕ соответствует 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 см³ вносят в две лунки с 0,2 см³ забуференного физиологического раствора на отдельной пластине. В результате получают разведение сыворотки, соответствующее 2 ГЕ.

Пластинки осторожно встряхивают для перемешивания компонентов реакции и помещают в термостат при 37-38° С на 1 час. Затем их извлекают из термостата и во все лунки одного ряда добавляют по 0,05 см³ 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 см³ + 0,05 см³ 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 см³ добавляют по 0,05 см³ 3,5-4%-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 контрольной 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 использованным эритроцитарным диагностикумам.

Критерием циркулирования на ферме эпизоотических штаммов морганелл 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. mitis*, *K. planticola*). *K. oxytosa* 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* подвид *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, выделение 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, брыжеечные 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 микрофотографируют. Клебсиеллы представляют собой грамотрицательные овальной формы 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 бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 36-37° С, рН 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 матки, которые окрашивают по Граму и по Гинсу (для выявления капсул).

При отсутствии роста на плотных питательных средах, но наличии его в МПБ и при обнаружении в нем небольших граммотрицательных колоний осуществляют пересев культур из МПБ на плотные питательные среды. Пересевы инкубируют при указанных выше условиях.

Характерные для клебсиелл колонии, состоящие из граммотрицательных, 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 пристеночного 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, непрозрачные с металлическим блеском (т.е. напоминающие лактозонезитивные энтерихии), 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, ровные края, 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 Гиссу, отчетливо выявляется капсула.

Поскольку характер роста на дифференциально-диагностических средах колониформативен для суждения о принадлежности выделяемых культур к клебсиеллам, выделение возбудителя из исследуемого материала для ускоренной дифференциации от эшерихии рекомендуют проводить на 48-часовой агаровой культуре.

Морфология клебсиелл в культуре. В мазках, приготовленных с питательных сред, клебсиеллы обнаруживают в виде неподвижных, овальной формы палочек размером 0,3-1,5x0,6-6,0 мкм. Грамотрицательны. 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 Фогеса-Проксауэра, способности расти на среде Симмонса с цитратом виды варьируют. Как правило, по лизиндекарбоксилазе положительные, по орнитиндекарбоксилазе и агрининдигидролазе отрицательные. Некоторые энзимурезоположительные. Сероводород не образуют. Способны расти в присутствии KCN. Желатину не разжижают. Большинство видов сбраживают все обычно тестируемые углеводы, за исключением дульцитыла и триглицерола 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* уреазоположительно) и орнитиндекарбоксилазу (*K. pneumoniae* подвида *pneumoniae* имеют отрицательный признак).

Таблица 35 - Дифференцирующие признаки видов рода *Klebsiella*

| Тест или субстрат | <i>K.pneumonia</i> | <i>K.oxytoca</i> | <i>K.terrigena</i> | <i>K.planticola</i> |
|--------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| Индол | - | + | - | X |
| Газ из лактозы: при 44,5° С | + | - | - | - |
| при 37° С | - | + | - | - |
| Рост при 10° С | - | + | + | + |
| Ферментация: инулина | - | + | X | X |
| D-мелезитозы | - | X | + | - |
| L-сорбозы | X | + | + | + |
| Утилизация: Гентизата | - | + | + | - |
| m-гидроксibenзоата | - | + | + | - |
| гидрокси-L-пролина | X | X | X | + |

Обозначения: «+» — 90% и более штаммов позитивны по данному признаку; «-» — 90% и более штаммов негативны по данному признаку; «X» — 11 - 89% штаммов имеют положительный признак.

У клебсиелл известно более 80 капсульных (К) антигенов, связанных с их 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 по отдельным из них у различных авторов нет) также являются полисахаридами.

В отличие от К-антигенов в их составе нет гексуриновых кислот, но 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 малоприспособно для повседневной лабораторной практики.

Таблица 16 - Дифференцирующие признаки подвидов *K. pneumoniae*

| Тест или субстрат | <i>Pneumoniae</i> | <i>Ozaenae</i> | <i>Rhinoscleromatis</i> |
|---|-------------------|----------------|-------------------------|
| Тест на гемолитичность | + | X | + |
| Способность к гемолиту | + | ср | - |
| Способность к гемолиту | X | | |
| Способность к метилловому красному | - | + | + |
| Способность Фогеса-Проксауэра | + | - | - |
| Тест на Симмонса | + | X | - |
| Способность к индолу | + | - | + |
| Способность к индолу | + | X | - |
| Способность к органическим кислотам (методом Петерсона): | | | |
| Цитрат | X | X | - |
| Уксусная кислота | X | X | - |
| Мочевина | + | X | - |
| Способность к арбовиндла | + | X | - |
| Способность к гидролизату | - | X | - |

Обозначения: оооо — слабая реакция.

В силу вышеперечисленного методы серотипизации клебсиелл для лабораторной диагностики к настоящему времени отсутствуют. Мало изученным остается и вопрос фаготипирования клебсиелл.

Определение патогенности. Патогенность клебсиелл обусловлена главным образом 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 свежeweделенных 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 тромбоцитарной агрегации тромбоцитов.

Для определения патогенных свойств *K. pneumoniae* готовят суточные паровые культуры из штаммов, выделенных из двух внутренних органов и тканей погибших или фекалий больных животных. Каждую из двух культур смешивают стерильным физиологическим раствором, готовя 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). Выживших 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 серого костного мозга, головного мозга (не менее чем из двух перечисленных органов и тканей) патогенные свойства этих культур в биопробе на белых мышках 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. m. mucrofaciens* — 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 протей как 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 навших 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.

Микробиологическое исследование исходного материала

Частицы из исследуемого материала окрашивают по Граму и дифференцируют. Протеи имеют форму палочек размером 1-3x0,4-0,5 мкм. Встречаются нитевидные формы. Грамотрицательные.

Выделение и идентификация культур протей

Культивирование. Протеи — факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, 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 во всех общих питательных средах, их рост сопровождается неприятным специфичным запахом.

Пробы фекалий, содержимое тонкого отдела кишечника или соскоб с его слизистой оболочки в количестве не более 0,5 г суспендируют в 10 мл стерильного физиологического раствора, выдерживают для осаждения крупных частиц при комнатной температуре 10-15 мин и надосаживают в чашку, используют для посевов. Фекалии, консервированные консервом, тщательно в нем размешивают, полученную суспензию разводят стерильным физиологическим раствором в 5-10 раз и высевают в стерильную жидкость после осаждения крупных частиц.

Исследуемый материал высевают в пробирки с МПБ, на чашки с плотным дифференциально-диагностическими средами Эндо, Плоскирева или С висмут-сульфит агаром. Чистая культура роящихся форм протеев может быть получена посевом по Шукевичу (в конденсационную жидкость свежекопченного 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 - 40° 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 отсутствия роста. При этом наблюдают образование тонкого сплошного кулеобразного 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, 4-7% агара, а также хорошо просушенные среды.

На среде Плоскирева протеи образуют 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 протея имеют грязно-коричневый цвет, а после их снятия на среде остается темнокоричневая редукционная зона.

Нероящиеся формы протея на МПА образуют мелкие (диаметром около 1 мм), круглые колонии S-формы сероватого цвета. Аналогичные колонии, но бесцветные или слабо-розового цвета образуются на среде Эндо.

На кровяном агаре отдельные штаммы могут вызывать гемолиз. На МПБ вначале образуется равномерное помутнение, а затем осадок.

Морфология клеток протея в культуре. мазках из культур протеи 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 — сфероиды. 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 Д-глюкозу с образованием кислоты и газа, оксидазоотрицательные, каталазоположительные, дают положительную реакцию с метиловым красным, не образуют лизиндекарбоксилазу и аргининдигидролазу. Одним из основных признаков протеев и близких к ним фенотипически разновидностей 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*

| Узнак | <i>Proteus</i> | <i>Providencia</i> | <i>Morganella</i> |
|------------------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| Способ окисления | P | + | - |
| Аккумуляция H ₂ S | + | - | - |
| Уреаза/ацетилфосфатаза | P | - | + |
| Способ ферментации | + | - | - |
| Способ брожения | + | - | - |
| Уреаза/ацетилфосфатаза | | | |
| Симптомы | - | + | + |
| Симптомы | P | - | - |
| Симптомы | - | + | - |
| Симптомы | - | + | - |
| Симптомы | - | + | - |

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 бляшки мышах. 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*

| Тесты | <i>P. vulgaris</i> | <i>P. mirabilis</i> | <i>P. mixofaciens</i> |
|--------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| Образование индола | + | - | - |
| Реакция Фогеса-Проскауера | - | X | - |
| Цитрат Симмонса | X | X | + |
| Орнитиндекарбоксилаза | - | + | - |
| Образование кислоты из: | | | |
| мальтозы | + | - | + |
| ксилозы | X | + | - |
| α-метилглюкозида | X | - | + |
| Просветление среды с тирозином | + | + | - |
| Образование вязкой пленки | - | - | + |

Приготовленной суспензией заражают внутрибрюшинно трехмесячных мышей 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 спички. От трупа животного берут ухо или мазок крови из сосудов уха. От трупов свиней — участки отечной соединительной ткани, заглочные, 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 (кроме трупов свиней), вскрытие прекращают, для исследования берут кусочки

печени, измененные лимфатические узлы. Материал помещают в стерильную посуду (банки, пробирки). Мазки после высушивания кладут в чашки Петри, последние заворачивают в бумагу, на ней делают надпись «Мазок нефиксирован!». Посуду с материалом помещают во влагонепроницаемую тару, опечатывают и нарочным с соответствующим сопроводительным документом направляют в лабораторию. Для обнаружения возбудителя сибирской язвы в сырье животного происхождения и объектах внешней среды отбор материала и ход бактериологического исследования регламентированы 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 (овальные 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 от одной 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 гонению 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 *S. 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 сибирезвездных 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 35-36° С, оптимум pH 7,4. К питательным средам непритворлив. Исследуемый материал высевает 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% CO₂. Одновременно можно делать посев из свежего материала (с минимальным количеством крови) в систему для диск-прицепитации. Контаминированный материал засевают на дифференциально-диагностические среды с фенолфталеинфосфатом натрия, среду Kinsley. Посевы инкубируют при 36° С 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 может быть затемнен, периферия с локонообразными отростками, иногда наличие 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 промежуточной O-формы, редко колонии с незначительной узорчатостью — эрозивная форма.

При росте *B. anthracis* в МПБ среда остается прозрачной, на дне осадок 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%-ного водного раствора аммиака. Закрытую чашку (крышкой вниз) выдерживают 1 минуту при комнатной температуре, затем просматривают под малым 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, однородной 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 бактерии (*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 воднопитательных колоний, бульонных культур, систем для диск-преципитации (при наличии преципитации) делают мазки и окрашивают по Граму люминисцирующими 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 люминисцентной 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 пробой рассевают на МПА в чашках Петри или заражают белых мышей для получения чистой культуры возбудителя.

B. anthracis образует споры в питательных средах, бедных белковым сыном, углеводами; быстрее на плотных, чем жидких средах. При 37° С спора 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.

Посевы. 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 животных, зараженных исследуемым материалом, то, не дожидаясь результатов биопробы, проверяют патогенность выделенной бактерии путем заражения двух белых мышей суточной 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 Бакулову 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 фенотипические признаки *B. anthracis*, обуславливаемые плазмидами: наличие капсулы, токсина, патогенность для животных и форма колоний. С целью установления типа штамма испытываемую культуру засевают на плотную и жидкую питательные среды с 50% сыворотки крови барана или кролика и 0,9% NaHCO_3 . Посевы инкубируют при 37° С в атмосфере 10-12% CO_2 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 может 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 или морским свинкам вызывает образование отека) выявляется в РДП, культура патогенна для животных. Такие свойства обусловлены наличием плазмид px01 и px02 .

2-й тип. Вакцинный штамм. Колонии R-формы, капсулы нет, токсин есть, культура не патогенна для животных. Имеется плазида px01 .

3-й тип. Авирулентный штамм. Колонии М-формы, есть капсула, токсина нет, культура патогенна для животных. Присутствует плаزمида рх02.

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 ввиду ее считанной установленным.

При отсутствии четких результатов микроскопического исследования исследуемого материала и характерных для возбудителя культуральных признаков, не дожидаясь результатов биопробы, исследуют чувствительность выделенной культуры к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья») и дифтерийному фагу.

При необходимости дифференциации выделенной культуры от сапрофитных бацилл также дополнительно определяют у нее способность к спорообразованию в опытах *in vitro*, *in vivo*, рост в аэробных, анаэробных условиях, наличие жгутиков, гемолитическую активность, синтез лецитиназы, уреазы, реакцию Фогес-Проскауера, образование кислоты из глюкозы, ксилитозы, гидролиз желатина, крахмала. Самыми надежными методами идентификации *B. anthracis* считаются тест на фагочувствительность, обнаружение в ПЦР-генов, 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 МПА (24 часа), затем засевают на МПА, агар Хоттингера, культивируют 1-4 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.

1) 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 внутривентриально 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 *B. cereus*, не дает гемолиза.

Определение чувствительности к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья»). В чашки Петри разливают обычный МПА и с содержанием 0,5 и 0,05 ЕД пеницилина 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 препарат изучают в микроскопе с сухой (объектив х 40) и иммерсионной системами. Чувствительные к пенициллину клетки *B. 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 *B. anthracis* имеют обычную форму. При отрицательном результате инкубирование продолжают до 24 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 локоообразными отростками. Под малым увеличением микроскопа края колоний 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 |
| Цвет и рост на МПБ | Среда прозрачна, хлопьевидный ваткообразный осадок, легко смывающееся 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 |
| Цвет и рост на МПФ | Рост в виде «перевернутой елочки», медленное разжижение | Вдоль укола горизонтальные отростки, быстрое разжижение | Разжижение, на поверхности пленка | Разжижение в виде воронки | Разжижение кратерообразной формы |
| Цвет и рост на селективных средах в виде фермента и окислительном индикаторе | 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 и индикаторной колонии | растет | растет | Варьирующие данные, большинство штаммов растут | не растет | растет |
| Рост в индикаторной среде | растет | растет | не растет | не растет | растет |
| Способность расти на среде индикатора при наличии индикатора CO ₂ | + | - | - | - | - |
| Рост в индикаторной среде | - | + | + | + | - |

| | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|
| тиков | | | | | |
| Образование лецитиназы | + | + | - | - | + |
| 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.вснпо) | + | + | - | - | - |
| Чувствительность к фагу | + | - | - | - | лизирующие и некоторые штаммы |
| Чувствительность к пенициллину (тест «жемчужного ожерелья») | + | - | - | - | - |

Виды *B. megaterium* и *B. mesentericus* объединены в один вид — *B. megaterium*; *B. anthracoides* и *B. pseudoanthracis* отнесены к *B. cereus*.

Идентификация *B. anthracis* при помощи сибиреязвенного биккетриофага (К-ВИЭВ, Гамма МВ А, Фаг - 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 по одной капле неразведенного фага и ставят их в штатив до стекания в пель. 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

на подают исследуемую культуру (материал) бактериологической петлей, соскребаяют 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 аполо-говым способом на МПА засевают исследуемый материал и далее по-строят, как описано выше.

Учет результатов проводят через 6-8 и 12-18 часов. В контроле дол-жен быть сплошной рост культуры по всей поверхности среды. Положи-тельным 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 загнив-ший материал. Если доставленное ухо обескровленно, исследуют и све-жий материал.

Свежий тканевый материал перед исследованием выдерживают 18-24 часов в термостате, несвежий исследуют сразу.

Способы экстрагирования растворимых антигенов *B. anthracis*.

Термический способ. 1-2 грамма ткани заливают в соотношении 1:10 0,9%-ным раствором натрия хлорида и кипятят в водяной бане 30-40 минут.

Алкогольный 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. Экст-ракты фильтруют через асбестовую вату и исследуют как антиген в реак-ции коагипреципитации методом наслаивания или подслаивания.

Метод наслаивания. В уленгутовскую пробирку вносят 0,2-0,3 мл пре-ципитирующей сибирезязвенной сыворотки, затем осторожно наслаивают экстракт, чтобы оба компонента не перемешались.

Метод подслаивания. В уленгутовскую пробирку вносят 0,2-0,3 мл ис-следуемого экстракта. Под него при помощи пастеровской пипетки под-слаивают равный объем иммунной сыворотки. Контроль: аналогичным образом ставят РП с преципитирующей сывороткой и стандартном сибир-езязвенным антигеном. Положительный результат — наличие беловатого кольца 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 сибир-езязву.

Обнаружение антигенов *B. anthracis* в кожевенно-меховом сырье про-водят 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 из 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 полимик-

сия М сульфата, 0,5 мл невидграмона, 10 мл гризеофульвина, 10 мл моющего средства «Прогресс», 0,1 мл натрия фенолфталейнфосфата. 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, невидграмон 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 фенолфталейнфосфат (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 пенициллина (ЕД) | Количество добавляемого МПБ | Полученная концентрация пенициллина (ЕД) | Количество среды | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | | | 100 мл | | 10 мл | |
| | | | Вносят раствор пенициллина (мл) | Концентрация пенициллина (ЕД/мл) | Вносят раствор пенициллина (мл) | Концентрация пенициллина (ЕД/мл) |
| 10000 ЕД | 10 | 10000 | | | | |
| мл раствор № 1 | 9 | 1000 | | | | |
| мл раствор № 2 | 9 | 100 | | 0,5 | | |
| мл раствор № 3 | 9 | 10 | 0,5 | 0,05 | 0,5 | 0,5 |
| мл раствор № 4 | 9 | 1 | | | 0,5 | 0,05 |

Среда Буза. К 3%-ному голодному (без пептона) агару (рН 7,2-7,4) добавляют 15% дефибринированной крови барана. Используют для культивирования возбудителя сибирской язвы.

Приготовление системы для диск-преципитации. Стандартную антициркулирующую сыворотку разливают по 0,5- 1 мл в стерильные бак-

териологические 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 агар-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 агар 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 и 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 бронхоальвеолярную слизь, молоко; посмертно - бронхиальные, заглоченные, средостенные, предопаточные, надвьянные 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 (медленно растущие) | | |
| <i>M. tuberculosis</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>M. fortuitum</i> | | |
| (ускоренный рост - свыше 7 суток инкубации; сапрофиты, однако отрезка обуславливают патологию у животных) | | |
| <i>M. fortuitum</i> | Олени, свиньи, крупный рогатый скот | Туберкулезоподобные болезни; изолируют из легких и лимфатических узлов |
| <i>M. fortuitum</i> | Человек | Легочная патология человека |
| <i>M. fortuitum</i> | Морская рыба, водные млекопитающие и амфибии | Туберкулез рыб: гранулематозные и диссеминированные поражения |
| <i>M. fortuitum</i> | Сапрофит | Не патогенен |

| | | |
|--|--|---|
| 2. Скотохромогенные (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 |
| 3. Нехромогенные (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 |

Таблица 41 (продолжение)

| 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 кожи |
| <i>M. xenopi</i> | Кошки | Нодуло-ульцеративные повреждения кожи |
| | Свиньи | Туберкулезные повреждения в лимфатических узлах кишечного тракта |
| 4. Быстрорастущие (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 повреждения |
| | Черепahi | Туберкулезоподобные повреждения в легких |
| | Крупный рогатый скот | Туберкулезоподобные повреждения в легких |
| | Кошки и свиньи | Абсцессы и нодуло-ульцеральные повреждения в различных тканях |
| | Обезьяны | Абсцессы в лимфатических узлах или диссеминированные поражения |
| <i>M. fortuitum</i> | Крупный рогатый скот | Гранулематозные повреждения в лимфатических узлах |
| | Кошки | Ульцеративные и негранулематозные поражения кожи |
| | Собаки | Гранулематозные поражения кожи и легких |
| | Свиньи | Грануломы в лимфатических узлах, суставах и легких |
| <i>M. phlei</i> | Кошки | Нодуло-ульцеративные повреждения кожи (редко) |

| | | |
|----------|----------------------|--------------------------------|
| Синонимы | Крупный рогатый скот | Грануломатозный мастит |
| | Кошки | Ульцеративные повреждения кожи |

1) Немецкое издание данных Bispring W., Amtsberg G (1998); Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (1994); Kawanishi A.D., Koneman E.W., Kim Y.K (1995); Runyon E.H. (1959), 1987).

2) В настоящее время по последним данным род *Mycobacterium* подразделяется на три группы: 1 — медленнорастущие; 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 раздавливания 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 3000-3000 об/мин в течение 15-25 минут. Из верхнего слоя готовят мазки.

С целью концентрирования клосток 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 30 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 отсаживают пипеткой и готовят из этого материала мазки.

Способ Гопа. Исследуемый материал растирают в стерильной ступке, смешивают 1:4 с 3-6%-ным водным раствором H_2SO_4 и центрифуги-

руют в течение 10-15 минут. Осадок 2-3 раза отмывают физиологическим раствором. Из осадка готовят мазки.

Способ Алкасовой. 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 5-8 минут физиологический раствор удаляют, кусочки ткани заливают небольшим количеством 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 HCl в 70%-ном этаноле 15-30 с и промывают; обрабатывают раствором, содержащим 1 г кислого фуксина, 1 г ледяной 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 мембранного фильтра № 3, опустив ее конец в конденсационную жидкость и засыпают материалом.

Через три дня инкубации полоску бумаги помещают на предметное стекло, фиксируют на пламени, окрашивают, как описано выше. Микроскопируют в сине-фиолетовом свете с увеличением 7x40. 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

Культирование. 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 $0,5 \text{ см}^3$ на границе здоровой и измененной ткани. Общая масса ткани лимфатических узлов должна быть 6-10 г. Лимфатические узлы из области абдоминального соединения и подвздошной кишки обрабатывают и высевают отдельно.

Исследуемый материал перед посевом на питательные среды подвергают обработке с целью подавления роста сопутствующей не кислотоустойчивой микрофлоры, освобождения микобактерий от муцина (в образцах трахеобронхальной слизи), концентрирования клеток возбудителя. Для достижения перечисленных целей применяют методы, указанные ранее, а также следующие.

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 непрерывно периодически встряхивают в течение 15-20 минут. Далее щелочь нейтрализуют 50%-ной H_2SO_4 , содержащей настойку лакмуса. Кислоту вносят по каплям до момента розово-фиолетового окрашивания жидкости. После нейтрализации взвесь центрифугируют при 2000 об/мин в течение 9-10 минут. Осадок высевают на плотные яичные среды.

Обработка материала трехзамещенным фосфатом натрия. Данная соль угнетает рост не кислотоустойчивой микрофлоры и почти не действует на микобактерии. Исследуемый материал и 10%-ный раствор трехзамещенного фосфата натрия смешивают в соотношении 1:1, выдерживают в термостате при 37°C 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 (1,7%-ный), встряхивают в течение 30 минут, центрифугируют и осадок ресуспендируют в 20 мл буферного раствора (37,5 мл 0,067 N двузамещенного фосфата и 62,5 мл 0,067 N калия фосфата (конечный pH 6,6),

нейтрализующего цефтриаксона и вновь центрифугируют 20 минут. Осадок высевает на питательные среды.

Плотные образцы материала (лимфатические узлы). Материал (неизмельченные образцы) выдерживают 4-16 часов в растворе гипохлорита (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 высевает на питательные среды, готовят окрашенные препараты для микроскопии.

Согласно ГОСТ 26072-89 рекомендуется материал обрабатывать по Гону или Аликаевой.

Для культивирования микобактерий используют различные питательные среды. Наиболее подходят для первичной изоляции среды Лесенштейна-Иенсена, Гельберга, Петраньяни, а также среда Stonebrinks для *Mycobacterium bovis*. Селективные свойства средам придает добавка малахитового 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 линкомицина (2 мкг/мл), циклогексимида (400 мкг/мл). *M. bovis* при выделении из материала проявляет микроаэрофильные свойства, не требует глицерина, температурный оптимум 38-40° С, *M. avium* — температурный оптимум 38-41° С, рН 6,8-7,3. *M. tuberculosis* — в первичных посевах рост стимулируется наличием в атмосфере 10-15% CO₂, температурный оптимум 37-38° С, рН 6,4-7,0.

Подготовленный тем или иным способом материал засевают в 5-10 пробирок с плотными средами. Посевы инкубируют при 37-38° С в 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 мази 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 сложную гемолизированную кровь в разведении 1:4-1:6, инкубируют в тем-

две недели. Один из мазков вынимают, промывают и окрашивают по Цилю-Нильсену или люминесцирующими красителями.

Вирусентные штаммы образуют на стеклах микроколонии в виде кос, струн (наличие корд-фактора) или звездчатых образований.

Сапрофитные и атипичные микобактерии 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 в пробирку с МПБ.

Особенности роста микобактерий на питательных средах. По скорости роста на питательных средах различают медленнорастущие микобактерии туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*), микобактерии 1,2,3 группы по классификации Ранион, а также быстрорастущие микобактерии. Деление микобактерий на медленно- и быстрорастущие достаточно условно. К медленнорастущим принято относить виды, дающие микроскопически 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 микобактерии объединены под общим названием «атипичные микобактерии». Патогенные свойства некоторых из них представлены в таблице 41.

Ранней по скорости роста и пигментообразованию подразделил атипичные микобактерии на следующие группы:

Аэрохромогенные — колонии формируются через 2 недели при 37° С и через 3 недели — при комнатной температуре. Образуют желто-оранжевый пигмент, при культивировании на свету дают более интенсивное окрашивание колоний. Типовой вид — *M. kansasii*. Пигмент образуется 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* — S/SR, *M. neoaurum* — S.

Гипохромогенные. У пигментнообразующих штаммов колонии окрашены в желто-оранжевый цвет независимо от культивирования на свету или в темноте. *M. scrofulaceum* образует колонии S-формы через две недели культивирования.

Нефотокхромогенные бактерии. Колонии формируются через 5-10 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). Дифференцировать от других микобактерий по признаку пигментообразования согласно Ранион их не удастся, так как на это сходство оказывают влияние многие 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 содержащие сапрофитные быстрорастущие микобактерий.

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 — **эгоинический 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 расветленные шпиги, 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 |
| Устойчивость к кислотности | Обычно в высокой степени кислотоустойчивы | Иногда слабо кислотоустойчивы | Часто частично кислотоустойчивы | Часто частично кислотоустойчивы |
| Устойчивость к окислительно-восстановительным процессам | По крайней мере, некоторые клетки в молодых культурах кислото- и спиртоустойчивы | Отрицательные | Отрицательные | Отрицательные |
| Устойчивость к окислению азота | Слабая | Выраженная | Обычно выраженная | Обычно выраженная |

(Таблица 42 продолжение)

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---------------------------------|---------------|-----------|---------------|
| Скорость роста при температуре 37°C (сут) | 2-60 | 1-2 | 1-5 | 1-3 |
| Рост на окислении | Обычно устойчивы | Чувствительны | Устойчивы | Чувствительны |
| Устойчивость к окислению азота | 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 10-20 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 макро-

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 лабораториях РФ культуры 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 две 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. Остальные культуры 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%) имеют формамидазу (формамидазный метод). В случае использования гипохлоритного метода мазки, углекислого калия. Через 6-8 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, верхний 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 5 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, pH

2) 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) этилендиамин дигидрохлорида. Положительный результат — окрашивание от розового до красного цвета.

Таблица 43 - Дифференциация основных патогенных видов микобактерий по культурально-биохимическим свойствам

| Свойства | <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 глицерино-содержащих средах | Эутонический, колонии R-типа | Дистонический, колонии R-типа | Эутонический, колонии R-типа |
| Окрашивание пингента | - | - | - |
| Оптимальный температурный режим роста | 42° С | 42° С | 44° С |
| Устойчивость в глицерине | + | | + |
| Устойчивость роста от натрия хлорида (0,4%) | - | + | - |
| Уксусный тест | + | - | - |
| УН-ингибирование (4 мг/куб.см) | - | + | - |
| Устойчивость к толуидиновым краскам | + | + | - |
| Устойчивость к нитратам | + | - | - |
| Уксус | + | + | - |
| Каротиноиды | + | - | + |

Тест на уреазу. Смешивают 1 часть агара с мочевиной и 9 частей стерильной воды, 4 кубических см наливают в пробирку. Затем в субстрат вносят петлей молодой культуры микобактерий. Инкубируют при 37° С до 4 суток. Положительный результат — окрашивание от розового до красного.

Тесты ингибирования. Проводят в отношении пиромидин гидразида (PMH), 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 до концентрации 0,023%.

Тест на деаминирование пиразинамида. Базовая среда бульон сифово, содержащая 0,1 г пиразинамида, 2,0 г пировиноградной кислоты в 1 л агара на 1000 мл. Среду разливают по 15 мл в пробирки, автоклавуют при 121° С в течение 15 минут, охлаждают в вертикальном положении. Агар инокулируют молодой культурой микробактерий и инкуби-

Используют кроликов массой 2 кг, морских свинок — 300-350 г. Биопробы на туберкулез производят следующим образом. При заражении животных тванесным 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 мл взвешенной 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 растерта до получения гомогенной суспензии.

С целью обнаружения микобактерий в исследуемом материале последний вводят в дозе 1-2 мл двум морским свинкам подкожно в область паха, курам — в подкрыльцовую вену. Через 30 суток зараженных животных исследуют туберкулиновой пробой. У морских свинок удаляют на боку шерсть и вводят интраникожно ППД — туберкулин для млекопитающих в дозе 0,1 ПД в объеме 0,1 мл. Курам вводят 0,1 мл ППД туберкулина — для птиц интраникожно в бороздку. У морских свинок реакцию учитывают через 24 и 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. | | Абсцесс на месте инъекции и увеличение регионарного лимфатического узла. Изменений в других органах нет. |
| 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 удается при следующих способах и дозах заражения культурами микобактерий (табл. 46).

Таблица 46 - Дифференциация возбудителей туберкулеза в опыте на животных

| Вид животных, доза микобактерий для заражения ¹⁾ | Вид микобактерий | | |
|---|------------------------|-----------------|-----------------|
| | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. avium</i> |
| Морская свинка (0,01 мг/подкожно) | ++ | ++ | + |
| Кролик (0,01 мг/внутривенно) | + ²⁾ | ++ | ++ |
| Куры (0,1 мг/внутривенно) | - | - | ++ |

«-» — нет туберкулеза; «++» — генерализованный туберкулез; «+» — локальный туберкулез;

¹⁾ достоверные результаты возможны только при точном соблюдении дозы культуры для заражения, только легочный 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 выделенных 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 послеплодного 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 тиосульфат — 5 г, KH_2PO_4 — 2 г, дистиллированная вода — 300 мл.

Смесь красителей: кристаллвиолет — 100 мг, малахитовый зеленый — 100 мг, дистиллированная вода — 100 мл; 20 свежих куриных яиц.

Приготовление среды: устанавливают рН солевого раствора добавляя раствор Na_2HPO_4 на уровне 6,5. Раствор разливают в емкости по 100 мл. Оба раствора стерилизуют при 121 °С в течение 15 минут. Яйца моют, высушивают и помещают на 30 минут в 75%-ный изопропиловый спирт. Подсушивают яйца на воздухе под ультрафиолетовыми лучами, взбивают, содержимое помещают в емкость с раствором и гомогенизируют. Полученную смесь разливают по 12 мл в пробирки, которые в переворочном положении выдерживают 40-60 минут в водяной бане при 60 °С. Остужают 30 минут и инкубируют при 37 °С 24-48 часов для впитывания влаги в среду.

Малфицированная среда Дюбо-Смита. Компоненты: K_2HPO_4 — 1 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, аспаргин — 1 г, гидролизат казеина — 80 мл, спиртовой экстракт *M. phlei* — 20 мл, сыворотка крови крупного рогатого скота — до 20%, пенициллин — 50 ЕД/мл, агар Дифко — 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 пентона, 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. В 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 магнезии, 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 8 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 200 мл стерильного 2%-ного раствора малахитового зеленого и перемешивают. К 1 л яичной смеси с малахитовым зеленым добавляют 600 мл солевого 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 солевого 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 аппа-

роте 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 в колбы 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 тем же паром. Раствор малахитового зеленого (2%-ный) стерилизуют при 105° 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 лимоннокислого — 1 г, магнелии сернокислой — 1 г, пептона — 2,6 г, глицерина химически чистого — 30 мл, воды дистиллированной — до 1000 мл. Каждый компонент растворяют в небольшом количестве воды, потом вносят в раствор и добавляют дистиллированную воду до 1000 мл. Смесь слегка перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы по 110 мл и стерилизуют 20 минут при 105° С.

Картофель Павловского. Белый картофель тщательно моют с мылом, насухо вытирают, очищают, прокаленным ножом срезают оба полюса картофелины. 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 последние в 10%-ную стерильную глицириновую воду на 1-2 часа.

Далее клинья подсушивают при помощи стерильной фильтровальной бумаги и пинцетом опускают в пробирки Р_у с перетяжкой, содержащие в нижней части 5%-ную стерильную глицириновую воду (рН 7,0-7,2), с расчетом, чтобы нижняя часть картофельного клина касалась жидкости. Пробирки стерилизуют при 110° С 10 минут. Сразу после стерилизации пробирки размещают в наклонном положении поверхностью посевов вниз, что позволяет сохранить их влажными. Стерильность контролируют термостатированием.

Грибы Петрова. Смешивают 500 г мясного говяжьего фарша с 500 мл 10%-ной глицириновой воды и выдерживают на холоде 24 часа. Перед употреблением фильтруют. Асептически извлекают содержимое куриных яиц, 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 яичной смеси и 1 мл раствора генцианвиолета на каждые 100 мл среды. Ком-

поненты тщательно перемешивают, разливают по пробиркам и прогревают первый день при 85° С, а два последующих дня — при 75° С по 40-60 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 картофельного отвара и повторно стерилизуют при 100° С два дня по 45 минут.

Среда Дорсе. Вымытые куриные яйца помещают на 10-15 минут в сосуд с этиловым спиртом, затем обжигают на пламени горелки, содержащее асептично 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 Левинштейна-Иенсена без крахмала. Пробки в пробирках герметизируют парафином, хранят при 4° С. Среда пригодна для использования в течение полугода.

Кислотная яичная среда № 1а. В 600 мл дистиллированной воды растворяют 6,3 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4$, 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 сернокислого магния, 0,05 г сернокислого 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 4%-ном глицериновом бульоне выращивают 10-15 суток культуру *M. phlei*. 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 надосажденную жидкость сливают в мерный сосуд, добавляют содержимое трех куриных яиц. Перемешивают и вносят 2,5% (объем/объем) 1%-ного спиртового 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 два дня подряд по 60 минут при 80° С.

Печеночный экстракт по Дедляу. В 1000 мл воды вносят 400 г говяжьей 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 Рейжара. 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 *M. phlei*, стерилизуют при 115° С 20 минут. Среду охлаждают до 55° С. Добавляют 1 часть сыворотки крови крупного рогатого скота, прогретой при 56-58° С, разливают по пробиркам и скашивают.

Приготовление вытяжки из *M. phlei*. Бактериальную массу из *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 110-120° С 1,5 часа. Центрифугированием отделяют жидкую часть, которую и используют для приготовления среды.

Приготовление спиртового экстракта из *M. phlei* (микобактин). Культуру микобактерий Тимофеевой травы выращивают в МПБ (4% пептона, 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 CaCl_2 или в термостате при 45° С и растирают в порошок. 10 г порошка вносят в 150 мл этанола и трехкратно экстрагируют кипячением в колбе с обратным холодильником. Все порции экстракта объединяют и оставляют на ночь.

Надосажденную жидкость фильтруют через бумажный фильтр, сливают в пробирку, ступицают при пониженном давлении до формирования вязкой красновато-оранжевой жидкости, которую смешивают с 80 мл 50%-ного раствора глицерина на дистиллированной воде. Устанавливают рН 7,6, про-

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят мазки из слизистой кишечника и лимфатических узлов путем растирания материала между двумя предметными стеклами. Препараты окрашивают методом Циля-Нильсена. Исследуют 50 и более полей зрения в нескольких препаратах. В окрашенных мазках клетки возбудителя видны как кофейно-красного цвета палочковидные бактерии, размером 0,6-2,0 x 0,2-0,4 мкм, располагающиеся единично, парами, в виде «палисады». При субклиническом течении болезни только приблизительно в 25-30% случаев возможно выявление возбудителя в препаратах фекалий.

Интерпретация факта обнаружения кислотоустойчивых бактерий в мазке должна быть достаточно осторожной, т.к. это могут быть и сапрофитные микобактерии. Поскольку выделение возбудителя с фекалиями происходит периодически, бактериоскопическое исследование при отрицательном результате необходимо повторять.

Выделение и идентификация культур *M. paratuberculosis*

Культирование. Обработка исследуемого материала перед посевом. В качестве исследуемого материала наиболее подходят мезентериальные лимфатические узлы и илеоцекальный клапан, так же исследуют свищи.

Кусочки (10 см³) растирают в ступке, смешивают 1:10 с 5%-ным раствором павелевой кислоты, встряхивают во флаконе, ставят на 30 минут в водяную баню (37° С), центрифугируют (2500-3000 об/мин) в течение 10 минут. Осадок отмывают стерильным физиологическим раствором. Материал бактериологической петлей высевают в 5-6 пробирках с питательной средой, содержащей микобактин, а также в среду Левенштейна-Яна. Кусочки лимфатических узлов и отдельно соскобы слизистой и поверхностного слоя измельчают ножницами в ступках. Материал из лимфатических узлов заливают 3%-ным раствором H₂SO₄ в соотношении слизистая — 6%-ным H₂SO₄ и выдерживают 10-15 минут. Затем жидкость сливают, материал на 5-10 минут заливают стерильным физиологическим раствором, удаляют жидкость, ткань растирают в небольшом количестве физиологического раствора и высевают на питательную среду, как описано выше.

В США принята следующая схема обработки материала перед посевом. Лимфатические узлы, илеоцекальный клапан. Ткань лимфатических узлов и мукозу (4 г) заливают 40 мл 0,1% цефирана и встряхивают в течение 10 минут. Взвесь фильтруют через марлю, центрифугируют. Седимент суспендируют в 40 мл 0,15%-ного цефирана, отстаивают 20 минут, аккуратно удаляют супернатант. В каждую пробирку с выбранной пита-

гревают 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 жвачных, 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 (доклиническая 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 с комочками слизи (не менее 10 см³) и полосками крови.

Для посмертного бактериологического и гистологического исследований отбирают 305 различных участков тонкого отдела кишечника и 20 брыжеечных 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 слегка промывают кипяченой водой, накладывают на один конец этикетку, наполняют раствором глицерина, затем завязывают второй конец и помещают в банку с глицерином.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят мазки 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 нескольких препаратах. В окрашенных мазках клетки возбудителя видны как короткие, красного цвета палочковидные бактерии, размером 0,6-2,0 x 0,2-0,3 мкм, располагающиеся единично, парами, в виде «палисада». При субклиническом 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 сапрофитные микобактерии. Поскольку выделение возбудителя с фекалиями происходит периодически, бактериоскопическое исследование при отрицательном результате необходимо повторять.

Выделение и идентификация культур *M. paratuberculosis*

Культирование. Обработка исследуемого материала перед посевом. В качестве исследуемого материала наиболее подходят мезентериальные лимфатические узлы и илеоцекальный клапан, так же исследуют фекалии.

Фекалии (10 см³) растирают в ступке, смешивают 1:10с 5%-ным раствором пантотеновой кислоты, встряхивают во флаконе, ставят на 30 минут на водяную баню (37° С), центрифугируют (2500-3000 об/мин) в течение 10 минут. Осадок отмывают стерильным физиологическим раствором. Материал бактериологической петлей высевают в 5-6 пробирках с питательной средой, содержащей микобактин, а также в среду Левенштейна-Нильсена. Кусочки лимфатических узлов и отдельно соскобы слизистой и фибриозного 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. Затем жидкость сливают, материал на 5-10 минут заливают стерильным физиологическим раствором, удаляют жидкость, ткань растирают в небольшом количестве физиологического раствора и высевают на питательную среду, как описано выше.

В США принята следующая схема обработки материала перед посевом. Лимфатические узлы, илеоцекальный клапан. Ткань лимфатических узлов или мукозу (4 г) заливают 40 мл 0,1% цефирана и встряхивают в течение 10 минут. Взвесь фильтруют через марлю, центрифугируют. Седимент ресуспендируют в 40 мл 0,15%-ного цефирана, отстаивают 20 минут, осторожно удаляют супернатант. В каждую пробирку с выбранной пита-

тельной 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 30 мл дистиллированной воды, содержащей 0,3% цефирана. Смесь выдерживают 24-36 часов при комнатной температуре. Супернатант удаляют, седимент 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 микобактерии (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 накапливает нитраты, не образует уреазу, синтезирует никотинамидазу, прозинамидазу, 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, заболевание не вызывает.

Серологическая диагностика

Применяют РСК с метаноловым экстрактом из *M. paratuberculosis* в качестве антигена. Сыворотки крови инактивируют при 61- 62° С в течение 30 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 38° С в водяной бане. Задержку гемолиза на два и более креста оценивают

положительный, на один крест — сомнительный результат. В положительном случае сыворотку исследуют повторно через 15-20 дней.

Испытаны 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 (аборты, метриты), 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, неспорообразующая, 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 пробы вымени маститов в лабораторию направляют 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, почки, пораженные участки легких. В случае необходимости материал консервируют 10%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 проб при температуре 37° С в течение 5-6 часов. Мазки из исследуемого материала окрашивают по Граму. В препаратах листерий видны как полиморфные, как 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 в полимеразной цепной реакции

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 цианида калия и 0,02% азиды 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 температурах посевы 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 теллуридом калия и флоримицином или полимиксином, среды с теллуридом калия, МПБ с 10% натрия хлорида. Кроме того, может быть использована среда с ацетатом таллия и налидиксовой кислотой, среда с налидиксовой кислотой, тиоцинатом 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 косопроходящем пучке света характер выросших колоний. Образец, инкубируемый при 4° С, исследуют аналогичным образом через

7 дней в течение 2 месяцев. При посеве на агар с трипафлавином и налидиксовой кислотой инкубирование проводят при 37° С в течение 48 часов.

Для исследования контаминированного материала (слизь влагалища, из матки, фекалии и др.) помещают в пробирки с 5 мл бульона для листерий, из тканей и фекалий готовят в бульоне 10%-ную суспензию. Пробирки 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 посевы бактериологической петлей из верхней части суспензии на селективные плотные среды для листерий.

Рекомендуют высевать контаминированный материал на МПБ с 0,01% теллуриата калия и 15 ЕД/мл флоримицина с последующей отливкой культуры на МПА с 0,004% налидиксовой кислоты или первоначально посевы производить на обычный МПБ и затем отливать культуру на МПА с 3,75% роданида калия или МПА с 0,01% теллуриата калия и флоримицином. Пробирки 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. Широко применение для изоляции листерий получили Оксфорд-агар и САМ-агар.

Следует отметить, что метод холодого обогащения при 4° С из-за 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 24-48 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. В МПБ индуктора в первые сутки сопровождается легким равномерным помутнением среды. Через 4-7 суток на дне пробирки образуется слизистый осадок. Диссоциированные культуры могут вызывать образование на поверхности среды пленки, хлопьевидный или крошковидный осадок на дне пробирки.

На плотных средах первичные посевы обязательно просматривают с увеличением и несколько дней в косопроходящем пучке света. Колонии мелкие, розинчатые, круглые, выпуклые, прозрачные, диаметром 0,2-3 мм, с голубоватым оттенком и мелкозернистой структурой (рис. 1), в проходящем свете имеют сине-зеленый цвет. На кровяном агаре образуется узкая зона гемолиза. Могут наблюдаться R- и

SR-формы. Колонии R-формы нередко состоят из нитевидных клеток, гемолитическая активность выражена слабо. На Оксфорд-агаре колонии 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*; каталазопозитивные факультативные анаэробы — виды родов *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*. Для дифференциации листерий от лактобацилл дополнительную культуру можно высеять на МРС-среду, на которой в отличие от многих окислительных бактерий листерий не растут или растут очень плохо.

В качестве дополнительных тестов для дифференциации листерий от эризипелотриксос рекомендуется посев испытуемой культуры (бульонная, смыв агаровой) в количестве 2-4 капель в индикаторные среды с лакмусом, нейтральротом в смеси с метиленовым синим, метилротом, конгоротом амидочерным. Пробирки после встряхивания инкубируют вместе с незасеянными контрольными пробирками при 37° С. Результаты учитывают через 3, 6, 24 и 48 часов. Листерий через 3-6 часов обеспечи-

ной среде с нейтральным и метиленовым синим, лакмусом. Встряхивать пробирки нельзя, так как цвет может частично восстановиться. Среда с индикатором обесцвечивается через 3-6 часов, но восстановления среды не наблюдается. Среда с конгоротом и амидочерным обесцвечивается позднее (6-48 часов), и цвет среды не восстанавливается. Эризидиформные указанные среды не обесцвечивают.

Так же исследуют способность культуры расщеплять салицил и эскулин. Листерии разлагают с образованием кислоты оба субстрата. В свою очередь 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, биохимическими свойствами, являющиеся подвижными при 20-25° С, индолоположительными.

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 посева на кровяной агар, скрытую гемолитическую активность в CAMP-тесте на *S. aureus* или *R. equi*, гидролиз гиппурата, восстановление нитрата, образование кислоты из маннита, L-метил-D-маннозида, L-рамнозы, инулина и патогенность для белых мышей.

Предпочтительно использование микротеста системы API *Listeria* (Bio-Mérieux) и ее аналогов. Рекомендуется для изучения ферментативных свойств делать посев бульонной культуры на среды с глюкозой, маль толом, инулином, салицином, трегалазой, дульцитом, инулином, раффина-

зой. Посевы инкубируют при 37°С 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 подращивают 4 часа при 37° С, высевая газонем 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. ivanovi</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>L. murrayi</i> | <i>L. seeligeri</i> | <i>L. wells-himeri</i> |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| Гемолизин | - | - | + ¹⁾ | + ²⁾ | - | + | - |
| САМР-тест (<i>S. aureus</i>) | - | - | - | + | - | + | - |
| САМР-тест (<i>R. equi</i>) | - | - | + | - | - | - | - |
| Образование кислоты из маннита | + | - | - | - | + | - | - |
| L-метил-маннозида | | + | - | + | | - | + |
| L-рамнозы | - | | - | + | d | - | D |
| D-ксилозы | - | - | + | - | - | + | + |
| Гидролиз гиппурата | - | + | + | + | - | | |
| Восстановление нитрата | - | - | - | - | + | | |
| Патогенность для мышей | - | - | + | + | - | - | - |

Примечание к таблице 47

Пробел означает, что признак не исследован. Вид *L. denitrificans* перенесен в отдельный род *Denitrosia*. ¹⁾ Обычно широкая зона или многочисленные зоны. ²⁾ Некоторые штаммы отрицательные. Обозначения: «d» — 11-80% штаммов положительные.

Далее на газон с культурой бактериологической петлей наносят равномерно 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

зоне образуется прозрачная зона лизиса. Допускается наличие единичных колоний или сплошного нежного роста (вторичная культура) при интенсивном росте культуры на остальной площади питательной среды. Для достоверности результатов целесообразно проводить 2-3 параллельных исследований. Нелизируемые культуры идентифицируют по общим критериям.

Для обнаружения *L. monocytogenes* также рекомендуется реакция на растении 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 48, 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, 4D, 4F, 4Г; *L. ivanovii*-5; *L. innocua*-4АВ, 6А, 6В; *L. weishimeri*-6А, 6В; *L. seeligeri*-1/2В, 4С, 4D, 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 — II, и 3-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, выращивают при 18-20° С в течение 24-30 часов, смывают стерильным физиологическим раствором и устанавливают концентрацию приблизительно 10-12 млрд микробных клеток в 1 мл.

На первом этапе приготовленный антиген исследуют в РА на стекле с 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-часовой взвешенной культуры, выращенной при комнатной температуре. Для дальнейшего исследования берут культуры, давшие положительную РА, идентифицированные как листерии.

Таблица 48 - Антигенная структура *L. monocytogenes*,
L. greyi, *L. murrayi*

| ОБОЗНАЧЕНИЕ | | О-АНТИГЕНЫ | | | | | | H-АНТИГЕН | | |
|-------------------|---------------------|------------|-----|-----|------|-----|------|-----------|-----|-----|
| PATERSON | SEELIGER-DUNKERVOGT | I | II | III | IV | V | VI | A | B | |
| 1 | 1/2 a | I | II | III | | | | A | B | |
| | 1/2 b | I | II | III | | | | A | B | |
| 2 | 1/2 c | I | II | III | | | | B | B' | |
| 3 | 3 a | | II | III | IV | | | A | B | |
| | 3 b | | II | III | IV | XII | XIII | A | B C | |
| | 3 c | | II | III | IV | XII | XIII | B | D | |
| 4 | 4 a | | III | V | VII | IX | | A | B C | |
| | 4 ab | | III | VVI | VII | IX | X | A | B C | |
| | 4 b | | III | VVI | | | | A | B C | |
| | 4 c | | III | V | VII | | | A | B C | |
| | 4 d | | III | VVI | VIII | | | A | B C | |
| | 4 e | | III | VVI | VIII | IX | | A | B C | |
| | 5 | | III | VVI | VIII | X | | A | B C | |
| | 7 | | III | | | XII | XIII | A | B C | |
| | 6 a (4d) | | III | VVI | VII | IX | | A | B C | |
| | 6 b (4g) | | III | VVI | VII | IX | X | XI | A | B C |
| <i>L. grayi</i> | | | III | | | XII | XIII | | B | |
| <i>L. murrayi</i> | | | III | | | XII | XIV | | I | |

На втором этапе определяют серогруппу (серотип) культуры при помощи серогрупповых (типовых) сывороток 1-го и 2-го серотипов (серогрупп). Исследование проводят, как описано выше. По данным отчетов 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 частиц из нее готовят мазки. Мазки из головного мозга, помимо фиксации спиртом, дополнительно обрабатывают ацетоном (2-3 раза по 5 минут) для удаления жировых компонентов, дающих неспецифическое свечение. Культуры листерии исследуют в 18-24-часовом возрасте.

Идентификация листерии также может быть проведена непрямим иммунопероксидазным методом. Антитела из диагностических сывороток в этом случае метят пероксидазой. Мазки готовят из головного мозга, паренхиматозных органов, фиксируют в химически чистом ацетоне, в качестве субстрата используют 0,05%-ный раствор 3,3'-diaminобензидина 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 с целью 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 внутривентрально. Внутримышечная инъекция кортизона (5 мг) повышает чувствительность животных. Наблюдение ведут в течение 10 суток. При положительных результатах гибели, 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 старых 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 опыта. Количество моноцитов в положительных случаях увеличивается в несколько раз. Кроликов заражают внутривенно в дозе 0,5–1 млрд м.к. Срок наблюдения — 14 суток. Для дифференциации патогенных культур листерии от возбудителя рожи также проводят конъюнктивальную пробу на морских свинках или кроликах (Anton's-тест). На конъюнктиву глаза морской свинки или кролика наносят две капли бульонной культуры. В положительном случае через 24–96 часов развивается гнойный конъюнктивит. *L. monocytogenes* такую патологию не вызывает.

Серологическая диагностика. Исследуют животных, подозреваемых в заболевании листериозом, а также животных из групп, где диагноз на листериоз уже установлен. Применяют пробирочную РА, РНГА и РСК. Серологические исследования дополняют другие методы диагностики листериоза и позволяют обнаружить переболевших, скрытых больных, бактерионосителей. Особенностью отечественной серологической диагностики является то, что серовары с 1/2a по 3c, используемые в междуна-

родной классификации, объединены в первую серогруппу, а остальные — во вторую.

В РА используют антигены 1-го и 2-го сероваров в соответствии с наставлением 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 рекомендуют исследовать дополнительно после обработки 2-меркаптоэтанолом (2-МЭ) или солянокислым цистеином. После такой обработки ставят РА по вышеизложенной 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 0,1 М NaOH. Сыворотки крови крупного рогатого скота и лошадей разводят физиологическим раствором 1:10; овец, коз, свиней — 1:5; кроликов — 1:2,5. 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 используют листериозный антиген для РСК, реакцию ставят в объеме 1 мл. Для контроля используют позитивные листериозные сыворотки и негативные исследуемого вида животного. Комплемент в бактериологической системе титруют в присутствии инактивированных сывороток (1:10) того вида животных, который исследуют. Режим инактивации сывороток

от 15 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 1 кресте. Сыворотки крови от сомнительно реагирующих животных исследуют повторно через 2-3 недели.

Реакция связывания комплемента. Используют листериозный антиген ИНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии для исследования сыворотки крови всех видов животных. РСК ставят в объеме 2,5 мл по стандартной 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 пробирки из водяной бани и окончательно через 14-18 часов выдерживания пробирки при комнатной температуре. За положительный результат принимают задержку гемолиза на три-четыре креста, сомнительный — задержку гемолиза на один-два креста. Сыворотки крови животных, давших сомнительную РСК, исследуют повторно через 2-3 недели и при получении задержки гемолиза не менее чем на два креста результат оценивается положительно.

При постановке РНГА используют диагностикум Омского НИИ паразитарных болезней.

Питательные среды. Оптимальными питательными средами для выделения листерий считаются МПА или печеночный агар и МПБ с 1% глюкозы и 2-3% глицерина (рН 7,2-7,4), а также кровяной агар. В случае 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) добавляют 10 мл 2%-ного водно-глицеринового раствора теллурида калия и 30-100 мл стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота. Компоненты перемешивают и среду сливают в чашки Петри. Питательная среда обладает элективными свойствами по отношению к *L. monocytogenes*.

Среда с теллуридом калия, полимиксином, флоримицином. 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 флоримицина 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

родной классификации, объединены в первую серогруппу, а остальные — во вторую.

В РА используют антигены 1-го и 2-го сероваров в соответствии с наставлением 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 рекомендуют исследовать дополнительно после обработки 2-меркаптоэтанолом (2-МЭ) или солянокислым цистеином. После такой обработки ставят РА по вышеизложенной 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 — 1:2,5. 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 используют листериозный антиген для РСК, реакцию ставят в объеме 1 мл. Для контроля используют позитивные листериозные сыворотки и негативные исследуемого вида животного. Комплемент в бактериологической системе титруют в присутствии инактивированных сывороток (1:10) того вида животных, который исследуют. Режим инактивации сывороток

10 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 ДННВ ветеринарной вирусологии и микробиологии для исследования сыворотки крови всех видов животных. РСК ставят в объеме 2,5 мл по стандартной 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 выдерживания проб при комнатной температуре. За положительный результат принимают задержку гемолиза на три-четыре креста, сомнительный — задержку гемолиза на один-два креста. Сыворотки крови животных, давших сомнительную РСК, исследуют повторно через 2-3 недели и при получении задержки гемолиза не менее чем на два креста результат оценивается положительно.

При постановке РНГА используют диагностикум Омского НИИ при-одноочаговых болезней.

Питательные среды. Оптимальными питательными средами для выделения листерий считаются МПА или печеночный агар и МПБ с 1% сахарами и 2-3% глицерина (рН 7,2-7,4), а также кровяной агар. В случае 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) добавляют 10 мл 2%-ного водно-глицеринового раствора теллурита калия и 30-100 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, флоримицином. В 1000 мл расплавленного МПА (рН 7,2-7,4) добавляют 10 см 2%-ного водно-глицеринового раствора теллурита калия, 0,3-0,5 мл раствора флоримицина 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%; таллия ацетат — 0,2%; налидиксовая кислота — 40 мкг/мл. Кристаллическую налидиксовую кислоту (0,05 г) растворяют в 0,5 мл 1N NaOH, после растворения добавляют 4,5 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) — 2 г, NaCl — 5 г, Na₂HPO₄ — 2,5 г, дистиллированная вода — 1000 мл, pH — 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-сосновый бульон с дрожжевым экстрактом, селективными факторами являются солянокислый 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, цитрат железистого аммония — 0,5, хлорид лития — 15,0, циклогексимид — 0,4, колистин — 0,02, акрифлавин — 0,005, цефотстан — 0,002, фенитоин — 0,01.

PALCAM-агар. В питательный агар вносят (г/л) эскулин — 0,8; цитрат железистого аммония — 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. Среда

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 (рН 7,3-7,5) 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 см стерильного 0,1%-ного водного раствора метилроta. 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 0,3 мл стерильного 0,1%-ного водного раствора конгроса. 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 иметиленовым синим. В 100 мл бульона Хоттингера или МПБ вносят по 1 мл 0,1%-ных водных стерильных растворов нейтральротa и метиленовой сини. Цвет среды зеленый или зеленовато-голубоватый. При учете результатов (через 3-6 часов) пробирки не встряхивать.

Лабораторная диагностика рожи свиней

Рожа свиней — инфекционная болезнь, характеризующаяся при остром течении септициемией 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 артритях 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 рожистыми 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, которые под углом друг к другу.

В препаратах из пораженных клапанов сердца свиней (хроническое течение) возбудитель имеет нитевидную форму с тенденцией клеток к обочечиванию.

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, МПЦ, 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 ESB, среда MBA, среды, содержащие 0,1% азиды натрия и 0,001% кристалвиолета. Рекомендуется в этом случае делать посев на среду ESB с последующей пересевом на среду MBA. Жидкий материал рекомендуется центрифугировать, а осадок ресуспендировать в среде ESB. Если время не является лимитирующим фактором, рекомендуется инкубировать образцы тканей в флаконах с бульоном при 4-5° С в течение 4-5 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 мм)

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 МПЖ 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 МПЖ 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 облачка. На среде ESB посевы 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, а также цепочки из клеток и нити, которые могут достигать 4-15 мкм. Для выделения жгутиков культуру высевают уколом в полужидкий агар и инкубируют посевы 24 часа при 37° С. При обнаружении в первичных посевах культур с типичными для эризипелотриксиков культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами их отвивают для дальнейшего изучения.

Ферментативные свойства эризипелотриксиков. Род *Erysipelothrix* включает два вида: *E. rhusiopathiae* и *E. tonsillarum*, однако по фенотипическим свойствам эти виды неразличимы и могут быть дифференцированы только путем изучения гомологии ДНК. Пока единственным выявляемым фенотипическим отличием *E. tonsillarum* является принадлежность всех известных штаммов этого вида к седьмому серовару. Следовательно, идентификация на родовом и видовом уровне представляет собственно родовую идентификацию *E. rhusiopathiae*. Некоторые критерии дифференциации эризипелотриксиков от сходных групп бактерий представлены в разделе «Истериоз».

У выделенных культур определяют способность образовывать каталазу, оксидазу, сероводород, уреазу, гидролизовать эскулин, ферментировать углеводы. Для выяснения сахаролитической активности применяют 1%-ную белковую воду с добавлением 5-10% стерильной сыворотки крови лошади или кролика. Образование сероводорода целесообразно прово-

ные бактерии размером 0,1x6-12 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. fainet*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. wolbachii*, *L. alexanderi*, *L. biflexa* и 5 геномовидов, обозначаемых цифрами. По антигенной структуре лептоспиры подразделяют на 230 серовариантов, объединенных в 25 серогрупп.

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 1%-ного 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°C в течение 3 часов, 25-30°C — 4-5 часов, 20-25°C — 6-8 часов, 16-20°C — 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 предназначена для получения культур возбудителя и должна быть транспортирована, то рекомендуется разводить ее 1:10 1%-ным сывороточным альбумином крупного рогатого скота.

Для посмертной диагностики берут трупы мелких животных, сердце, кусочки паренхиматозных органов, почку, транссудат из грудной и брюшной полостей. Перикардальную жидкость, мочевой пузырь с содержимым, спинномозговую жидкость. Если наблюдаются аборт, берут абортированный плод или желудок плода с содержимым и паренхиматозные органы.

Воду из источника для обнаружения лептоспир берут в объеме 1,5-2,0 л в стерильные колбы с ватно-марлевыми пробками.

Патологический материал должен быть взят и исследован в течение 6 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</i> , <i>Grippotyphosa</i> , <i>Hebdomadis</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Pomona</i> , <i>Sejroe</i> , <i>Tarassovi</i> . |
| Мелкий рогатый скот | <i>Grippotyphosa</i> , <i>Hebdomadis</i> , <i>Pomona</i> , <i>Sejroe</i> , <i>Tarassovi</i> <i>Grippotyphosa</i> , <i>Pomona</i> , <i>Tarassovi</i> |
| Лошадь | <i>Canicola</i> , <i>Hebdomadis</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Sejroe</i> , <i>Pomona</i> , <i>Tarassovi</i> |
| Свиньи | <i>Canicola</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Pomona</i> |
| Собаки | <i>Canicola</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Pomona</i> |

Таблица 50 - Лептоспиры, поражающие животных в России

| Лептоспиры | Вид животных | | |
|------------------------|--|---|---|
| | Свиньи | Крупный рогатый скот | Мелкий рогатый скот |
| Основные | <i>Pomona</i> , <i>Tarassovi</i> | <i>Hebdomadis</i> , <i>Pomona</i> , <i>Tarassovi</i> , <i>Grippotyphosa</i> | <i>Grippotyphosa</i> , <i>Pomona</i> , <i>Tarassovi</i> |
| Редкие и встречающиеся | <i>Hebdomadis</i> , <i>Canicola</i> , <i>Grippotyphosa</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i> | <i>Canicola</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i> | <i>Canicola</i> , <i>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 «разъединенная капля». Толщина предметных стекол не должна быть больше 1,2 мм, покровных — 0,2 мм, в противном случае препарат не оказывается в фокусе конденсора. Стекла должны быть без царапин, чистые, обезжиренные. На верхнюю линзу конденсора помещают каплю дистиллированной воды, конденсор поднимают до уровня поверхности пред-

метного столика, чтобы вода контактировала с предметным стеклом. И капли исследуют не менее 50 полей зрения.

При оптимальной настройке микроскопа лептоспиры в препарате видны на темном фоне как спиралеобразные, тонкие серебристо-белые нити с Первичными завитками в виде тесно примыкающих друг к другу зерен. Концы лептоспир утолщены и оба или один загнуты, размер клеток 0,1 x 6-25 мкм. В жидкой среде лептоспиры движутся, вращаясь то в одну, то в другую сторону вокруг длинной оси, поступательно перемещаясь незагнутым 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 5 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 красителем (0,5 мл краски и 10 мл нейтральной дистиллированной воды). Лептоспиры в препарате имеют светло-розовый цвет.

Окрашивание риванолом или аураминол 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. Лептоспиры приобретают 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

прогревают 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 йода до исчезновения первоначально выпавшего осадка и просветления раствора. Раствор хранят в склянке темного стекла.

Прогрессия лептоспир серебром в гистологических срезах по Леванову. Кусочки органов (корковый слой почек, печень) толщиной 0,2-0,5 мм фиксируют 24-48 часов в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина, затем переносят в 96%-ный этанол на 24 часа, выдерживают 3 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 далее в основной редуцирующий раствор (пирогаллоловая 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. Длительность 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°С, далее в парафин на 60 минут при 57°С и в свежий парафин при 57°С на 60 минут.

Парафин быстро остужают, вырезают блок с кусочком органа и насаживают на деревянный кубик. На сапном микротоме готовят тонкие срезы, наклеивают на предметное стекло, депарафинируют в трех бюксах с этиловым спиртом по 10-15 минут и заключают под покровное стекло в бальзам. Готовые препараты хранят в темноте.

Микроскопическая картина: лептоспиры — черные, ткань — беловато-желтая. После импрегнации серебром лептоспиры обычно имеют S-образную с 1-2 изгибами или змеевидную форму.

Индикацию лептоспир в исследуемом материале можно проводить методом флуоресцирующих антител.

Выделение и идентификация лептоспир. Культивирование. Лептоспиры — 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 содержимого желудка. Рекомендуется 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 3-4 пробирок.

При поддержании лептоспир в лаборатории культуры пересевают пастеровскими пипетками, причем объем исходной культуры должен составлять приблизительно 0,1 объема свежей среды, так как при малой посевной дозе рост бывает замедленным и скудным. Интервал пересева 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 размножении в жидких питательных средах лептоспиры практически не изменяют внешнего вида среды, поэтому наличие роста устанавливают при помощи исследования среды из всех засеянных пробирок в препарате «раздавленная капля» методом темнопольной микроскопии через каждые 3-5 дней на протяжении трех месяцев.

В полужидких питательных средах рост в виде интенсивно окрашивающего кольца обнаруживается невооруженным глазом на расстоянии

1-2 см ниже поверхности среды. Культуры на полужидких средах выращивают 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: розинчатыми, круглыми диаметром 2-4 мм, кольцевидными, астровидными, с сосочковидным центром, неправильной формы. Различают три фазы развития колоний: период поверхностного роста, период внедрения в агар, период глубокого прорастания. В конечной фазе могут формироваться крупные до 1-1,5 см в диаметре колонии. Колонии патогенных лептоспир вырастают за 6-20-е сутки, чаще на 7-8-й день, сапрофитные — 3-6-й день. Колонии S-формы — круглые, прозрачные, дисковидные, с тонкой периферийной каймой. Колонии R-формы имеют неправильную хлопьевидную конфигурацию.

Для очистки загрязненных культур рекомендуется осуществлять фильтрацию через пластины марки «СФ» с последующим засевом фильтра в жидких питательных средах.

Также может быть использован дробный рассев на поверхность плотных питательных сред в чашках Петри. Субкультуры из колоний отбирают на жидкие среды.

Селекционированные 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 температуре 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 | - | + |
| Игибиция роста 8-азагуанином (225 мкг/мл) | + | - |
| Превращение 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 в поле при увеличении 20х10х1,5.

В России применяют групповые агглютинирующие лептоспирозные сыворотки в виде двух наборов (1-й: серогруппы Гриппотифоза, Помона, Иктерогеморрагия, Каникола, Тарассови, Батавия, Гебдомадис, Сейро, Минн, Пирогенес, Лутумпалис, Баллум, Аустралис, Яваника, Циноптери; 2-й: вышеперечисленные сыворотки, а также Целледони, Панама, Андамана, Семаранга, Шсрмани).

На физиологическом растворе готовят разведения диагностической сыворотки 1:50, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16 000, 1:32 000. К 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°С в течение часа.

Результат учитывают путем темнопольной микроскопии препаратов «раздавленная капля». Оценку проводят в крестах: + + + + — агглютинированы 100% клеток, + + + — агглютинированы 75% клеток, + + — агглютинированы 50% клеток, + — агглютинированы 25% клеток, (+) — агглютинация отсутствует. Исследуемую культуру относят к серовару

гической группе лептоспир, с сывороткой против которой она дает реакцию на два-четыре креста до 50-100% ее титра.

После установления серогрупповой принадлежности штамма проводят дополнительное 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 иммуную сыворотку на изучаемый штамм. С этой целью проводят гипериммунизацию кроликов внутривенно изучаемой культурой лептоспир, содержащей 70-100 клеток в поле зрения (х 400) по схеме 1,2 и 2 мл с интервалом в трие суток и 3 мл с интервалом в пять суток. На девятые сутки после заключительной инъекции пробы сыворотки крови исследуют в РМА, титры обычно составляют 1:30 000 и более. Для стандартизации условий опыта иммунные сыворотки разводят до получения единого титра — 1:3000 (в РМА с формализированным антигеном) при интенсивности реакции в этом титре не более чем два креста.

При получении антигенов лептоспир культурыруют во флаконах емкостью 100-250 мл со средой Ферворта-Вольфа при 30° С в течение 4-7 суток до накопления 80-150 микробных клеток в поле зрения (х 400). Лептоспир инактивируют формалином (0,5%), осаждают центрифугированием (10 000 об/мин, 20 минут), затем осадок из флаконов объединяют и 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°С или при 2-3°С в течение 24 часов. Далее смесь центрифугируют (10 000 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость осторожно (без вымучивать!) отсасывают. Она представляет из себя адсорбированную сыворотку. Эту сыворотку в разведении 1:30 проверяют в РМА с формализированной культурой-адсорбентом на наличие остаточных антител (антител не должно быть!). В случае необходимости адсорбцию повторяют. При отсутствии антител к лептоспире-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 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 освобождения ее от посторонней микрофлоры.

Для заражения используют суспензию паренхиматозных органов (почки, 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 морских 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 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, начиная 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 высокоинфулентные, 1,0 — слабовирулентные.

Серологическая диагностика. Серологическую диагностику в основном осуществляют при помощи реакций микроагглютинации (РМА), иммуноадсорбции (РИА), ELISA.

Реакция микроагглютинации. В качестве антигенов используют 5-15-дневные живые культуры в жидкой питательной среде с накоплением 70-100 клеток в поле зрения при увеличении микроскопа 20x10x15, более старые — 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 | Percepelicin (Mitis Jhson) |
| Grippityphosa | grippityphosa | Moskva V (Valbuzzi) |
| Hebdomadis | kabura (borincana, hebdomadis) | Kabura (IIS-22, hebdomadis) |
| Polonica | polonica (sejroe, wolffi, hardjo) | 493 Poland (M-84, 3705, hardjoprajitno) |
| Szwajizak | szwajizak | Szwajizak |
| Copenhageni (icterohaemorrhagiae) | copenhageni (icterohaemorrhagiae) | M-20, Wajjnberg (RgA) |
| Hond Utrecht IV | canicola | Hond Utrecht IV |
| HS-26 (Van Tienen) | djatzi (bativiac) | HS-26 (Van Tienen) |
| Poi (Veldrat Bataviac 46) | poi (javanica) | Poi (Veldrat Bataviac 46) |
| Ballico (lez Bratislava) | australis (brtislava) | Ballico (lez Bratislava) |
| Akijami A (Rachmat) | autumnalis (rachmat) | Akijami A (Rachmat) |
| Mus 127(CaseteUon3) | balum (castellonis) | Mus 127(CaseteUon3) |
| Salinem | pyrodenes | Salinem |
| Vleermuis 3568 (3522C) | cynopteri | Vleermuis 3568 (3522C) |
| CZ-214-K | panama | CZ-214-K |
| Celledoni | celledoni | Celledoni |
| LT-821 | shermani | LT-821 |
| Djasiman | djasiman | Djasiman |
| Sarmin | sarmin | Sarmin |
| LSU-1945 | louisiana | LSU-1945 |
| ISF | ranarum | ISF |
| L105 | manhoa | L105 |

Культуры лептоспир, используемые в качестве антигенов при определении этнологической структуры и обследовании импортируемого скота

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 моноспецифические 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 и освобождения ее от посторонней микрофлоры.

Для заражения используют суспензию паренхиматозных органов (почки, 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 морских свинок (масса не более 200 г), золотистых хомячков (20-30-дневный возраст), сусликов, белых и серых мышей. Крольчатам материал вводят подкожно или внутривентриально 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 немедленно 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, начиная 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 внутривентриально крольчат и золотистых хомячков (0,1-1,0 мл). Штаммы, вызывающие гибель животных от дозы 0,1 мл, оценивают как высокопатогентные, 1,0 — слабопатогентные.

Гистологическая диагностика. Серологическую диагностику в основном осуществляют при помощи реакций микроагглютинации (РМА), иммуноэлектрофореза (ИЭФ), ELISA.

Реакция микроагглютинации. В качестве антигенов используют 5-15-дневные живые культуры в жидкой питательной среде с накоплением 70-100 клеток в поле зрения при увеличении микроскопа 20x10x15, более точно — разводит питательной средой до указанной концентрации. Культуры определенных серогрупп лептоспир диагностическим лабораториям предоставляет Всероссийский научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.

Таблица 81 - Штаммы лептоспир, используемые

для постановки РМА

| Серогруппа | Серовар | Рекомендуемые штаммы |
|---------------|------------------------------------|---|
| Pomona | Pomona | Pomona |
| Parceps | Parceps | Parceps (Mitis Jjhsen) |
| Grippityphosa | Grippityphosa | Moskva V (Valbuzzi) |
| Hebdomadis | Hebdomadis (horreana, hebdomadis) | Kabura (IS-22, hebdomadis) |
| Polonica | Polonica (sejtoc, wolffii, hardjo) | 493 Poland (M-84, 3705, hardjoprajitno) |
| Szwajczak | Szwajczak | Szwajczak |
| Wajjnberg | Copenhagen (heterohaemorrhagiae) | M-20, Wajjnberg (RgA) |
| Hond Utrecht | Hond Utrecht | Hond Utrecht IV |
| Van Tienen | Van Tienen (bataviae) | HS-26 (Van Tienen) |
| Batavia | Batavia (javanic) | Poi (Veldrat Bataviac 46) |
| Bratislava | Bratislava (australis) | Ballico (Iez Bratislava) |
| Rachmat | Rachmat (autumnalis) | Akijami A (Rachmat) |
| Casete Uon3 | Casete Uon3 (halum) | Mus 127 (Casete Uon3) |
| Salinem | Salinem (pyrodenes) | Salinem |
| 3522C | 3522C (cynopteri) | Vleermuis 3568 (3522C) |
| CZ-214-K | CZ-214-K (panama) | CZ-214-K |
| Celledoni | Celledoni (celledoni) | Celledoni |
| LT-821 | LT-821 (sheimani) | LT-821 |
| Djasiman | Djasiman (djasiman) | Djasiman |
| Sarmin | Sarmin (sarmin) | Sarmin |
| LSU-1945 | LSU-1945 (louisiana) | LSU-1945 |
| ISF | ISF (ganatum) | ISF |
| L105 | L105 (manhoa) | L105 |

Культуры лептоспир, используемые в качестве антигенов при определении генологической структуры и обследовании импортируемого скота

приведены в таблице 52. В хозяйствах с установленной этиологией и при транспортировке животных в пределах страны используют культуры серогрупп *Pomona*, *Tarassovi*, *Canicola*, *Hebdomadis*, *Sejoroe*, *Grippoturfina* и *Icterohaemorrhagiae*.

Сыворотки 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 числа 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 20x10. Капли 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 лептоспир при возможном лизисе кисток 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 лептоспирноносителей. Если в РМА при однократном исследовании реагирует положительно более чем 20% обследованных животных, то хозяйство признают неблагополучным по лептоспирозу. Положительные реакции с антителами *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 серогруппы, в которой антитела выявлены в большем титре. При положительной РМА с 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 как

использовали 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 10-12 часов, осажденные центрифугированием в течение 30 минут при 10000 оборотов. Осадок ресуспендируют в 0,9 мл физиологического раствора, смешивают с 0,1 мл исследуемой сыворотки, выдерживают 48 часов при 4-8°C, центрифугируют, надосадочную жидкость (адсорбированную сыворотку) исследуют на наличие антител к штамму-сорбенту, а далее исследуют со всеми штаммами в РМА, с которыми сыворотка реагировала на адсорбции. Антитела к возбудителю из сыворотки при абсорбции герпетическими 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). $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 11,876 г растворяют в 1000 мл дистиллированной воды. Растворы хранят при 2 - 4°C до 30 суток. Рабочий буферный раствор готовят следующим образом: 70 мл раствора б смешивают с 21 мл раствора а и 900 мл дистиллированной воды. Контролируют рН буфера и в случае необходимости подкисляют монозамещенным фосфорнокислым калием или подщелачивают дивалентным 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 5 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°С.

Среда Кортхофа. Бидистиллированной воды — 500 мл, пептона Питт — 400 мг, натрия Хлорида — 700 мг, NaHCO_3 — 10 мг, калия хлорида — 20 мг, кальция хлорида — 20 мг, KH_2PO_4 — 90 мг, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 400 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. Прогревают 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 добавляют 5- 10% стерильной кроличьей сыворотки. Разливают асептично в пробирки по 4-5 мл в каждую и прогревают в водяной бане при 60°C в течение 1 часа.

Цветная нитательная среда для определения ферментации углеводов по А.С. Самедову. К 100 мл дистиллированной воды добавляют 0,1 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 реактива Андреде. Готовую среду разливают в стерильные бактериологические пробирки по 3-5 мл и вторично стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 минут. Перед посевом лептоспир в эту среду добавляют инактивированную кроличью сыворотку из расчета 5% к объему среды (рН среды 7,4-7,6). Посевы заливают вазелиновым маслом. В случае ферментации углеводов среда окрашивается в светло-малиновый цвет.

Плотная среда Коке. В 90 мл дистиллированной воды растворяют 1 г агара Дифко, 0,2 г трипозофосфатного бульона Дифко, автоклавируют, охлаждают до 50°C, добавляют 10 мл стерильной сыворотки крови кролика 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 устанавлива-

до pH 7,5; прогревают в водяной бане при 56°C 30 минут, разливают ее в банки Петри.

Среда Кипарейкиной С.К. и Черкулан П. В 90 мл дистиллированной воды растворяют 50 мл натрия хлорида, 1 г агара Дифко, 2,4 мл триглицевого перевара Хоттингера. Смесь кипятят 3-5 минут, добавляют 10 мл фосфатной смеси (см. выше), вновь кипятят, устанавливают pH, автоклавизируют при 120°C в течение 15 минут. Далее смесь охлаждают до 80°C, добавляют 10 мл инактивированной кроличьей сыворотки и 5-10% гемоглобина (см. выше).

Среда Еллингаузена и Куллода. Раствор «а»: H_4Cl — 5,35 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 3,72 г, NaCl — 38,50 г, дистиллированная вода — 1л; 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 40 мл раствора «б». Затем добавляют L-цистин — 180 мг, ZnSO_4 — 3,2 мг, $\text{CaSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ — 2,4 мг, $\text{FeSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ — 40 мг. Смесь встряхивают и фильтруют. Вносят витамин B_{12} — 160 гамм и тиамин- HCl — 160 гамм. Добавляют дистиллированной воды до окончательного объема среды (1 л). Затем раствор стерилизуют при 121°C 15 минут. После охлаждения добавляют 20%-ный олеино-альбуминовый комплекс (ОАК) — 1% к объему среды. Он может быть заменен V фракцией бычьего альбумина (1%) и витамином B₁₂ (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 плазмолиза; диализированный раствор альбумина фильтруют через пластырь «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 пидолонуксусной 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%.

Твои-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, глюкозы — 1 мл; растворяют компоненты, устанавливают pH 7,4, удаляют 140 мл среды, вносят 1,5 г очищенного агара, стерилизуют (121° С, 15 мин), охлаждают до 50° С, добавляют 140 мл основной среды, филь-

труют 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 $ZnSO_4 \times 7H_2O$ — 0,4 г, $CaCl_2 \times 2H_2O$ — 1,0 г, глицерина — 10,0 мл, NH_4Cl — 25 г, витамин B_{12} — 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 растворяют $FeSO_4 \times 7H_2O$ — 0,5 г/100 мл H_2O , твин-80 — 20 мл/180 мл H_2O , твин-40 — 20 мл/180 мл H_2O , 5-флюорацил — 1,0 г/100 мл H_2O , налидиксовая кислота — 1,0 г/100 мл H_2O , $MgCl_2 \times 6H_2O$ — 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 гидролизата, затем вносят растворы тиамина — 1 мл, $CaCl_2 \times 2H_2O$ — 1 мл, $MgSO_4$ — 1 мл, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ — 1 мл, $MgCl_2 \times 6H_2O$ — 1 мл, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ — 1 мл, $FeSO_4 \times 7H_2O$ — 10 мл, витамина B_{12} — 1 мл, твина-80 —

9 мл, твина-40 — 3-5 мл. После растворения компонентов устанавливают pH 7,4, вносят дистиллированную воду до 96 мл и 4 мл кроличьей сыворотки, инактивированной при 56° С (30 минут), флюорацила — 20 мл, налидиксовой кислоты — 20 мл.

Среда с 5-флюорацилом. В питательную среду (жидкую, полужидкую, плотную) вносят 100 - 400 мкг/мл 5-флюорацила.

Лабораторная диагностика клостридозов

В род *Clostridium* относят палочковидные микроорганизмы (ш. 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 у человека и животных; некротизирующий мастит КРС; энтерит собак, некротизирующий энтерит кур. |
| <i>C. perfringens</i> тип В | Дизентерия ягнят, жеребят; энтеротоксемия молодняка различных видов животных. |
| <i>C. perfringens</i> тип С | Геморрагическая энтеротоксемия овец, поросят. Телят, 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. botulinum</i> | Эмфизематозный карбункул КРС, реже буйволов, овец и коз. |
| <i>C. perfringens</i> тип А | Злокачественный отек КРС, овец, свиней; браздот овец. |
| <i>C. perfringens</i> тип В | Злокачественный отек КРС, овец. |
| <i>C. perfringens</i> тип С | Некротический гепатит овец. |
| <i>C. perfringens</i> тип D | Хронический остосмиелит буйволов. |
| <i>C. perfringens</i> тип D | Бациллярная гемоглобинурия КРС. |
| <i>C. haemolyticum</i> | |
| <i>C. parvelli</i> | Газовая гангрена КРС, овец, лошадей. |
| <i>C. colinum</i> | Язвенный энтерит молодняка птицы (цыплята, индышата). |
| <i>C. botulinum</i> | Столбняк животных, человека. |
| <i>C. botulinum</i> (типы А-Е) | 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, коз, 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 (0,6-0,8-1,2-4 мкм) со слегка закругленными концами, грамположительные, палочковидные клетки, имеющие капсулу. Необходимо принимать во внимание наличие *S. 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 *S. perfringens* представлены 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 дизентерии ягнят» (1984) содержимое кишечника после разведения физиологическим раствором рекомендуется выщерживать при 20-22° С 1 час, фильтровать через ватно-марлевый фильтр и центрифугировать при 3-5 тыс. 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 пяти 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 кролику массой 1,8-2,0 кг с наблюдением за животными в течение 12 часов. При более поздней гибели, особенно если материал не подвергали стерилизации, необходимо бактериологически исследовать трупы животных, чтобы исключить сопутствующую инфекцию. Экспресс-индикацию токсина в фекалиях проводят в ИФА РНГА, латекс-агглютинацию, но в РФ чаще используют РН.

Токсигенные субстанции (α , β , ϵ , i) *C. perfringens* различных типов (A, B, C, D, E)

| Тип <i>C. perfringens</i> | A | B | C | D | E |
|---------------------------|----------|---------------------------|-----------------|--------------------|-------------|
| Содержит токсин | α | α, β, ϵ | α, β | α, ϵ | α, i |

| | |
|-----------------------|--|
| Токсин (стабильность) | • денитригеназа (фосфолипаза), разрушает мембрану клеток, вызывает на кровяном агаре зону неполного гемолиза |
| Токсин (стабильность) | • обладает летальным и некротизирующим действием, легко разрушается |
| Токсин (стабильность) | • выделяется как протоксин, активизируется в кишечнике под влиянием протеаз |
| Токсин (стабильность) | • выделяется как протоксин, активизируется трипсином, обладает летальным и некротизирующим действием |

Идентификация токсинов *C. 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 токсигенного 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 с трипсинолизированным фильтратом: в фильтрат добавляют 1% трипсина (Дифко 1:250) и выдерживают один час при 37° С. Трипсин активирует протоксин 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 выздоровлению 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 антитоксических сывороток | | Тип токсина | | | | |
|---|---|-------------|-------|------|-------|---|
| | | A | B | C | D | E |
| Необработанный | Бульон | + | + | + | ± | + |
| фильтрат | Сыворотка типа А (анти-альфа) | - | + | + | (-)* | + |
| | Сыворотка типа А + С (антиальфа и анти-бета) | - | (-)*± | - | (-)*± | + |
| | Сыворотка типа А + С + D (анти-альфа, анти-бета, анти-эпсилон) | - | - | - | - | + |
| Трипсинизированный фильтрат | Бульон | ± | + | (-)± | + | + |
| | Сыворотки типа А (анти-альфа) | - | + | (+)± | + | + |
| | Сыворотки типа А + D (анти-альфа, анти-эпсилон) | - | (-)± | (-)± | - | + |
| | Сыворотки типа А + С + D (анти-альфа, анти-бета, анти-эпсилон). | - | - | - | - | + |
| | Сыворотка типа А + E (анти-альфа, анти-йота). Обычно не ставят из-за редкого присутствия йота-токсина | - | + | (-)± | + | + |
| Идентифицируемый токсин | | α | β+ | β | ε | ι |

(-) * — 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 мышах и интерпретация его результатов

| Испытуемая жидкость (мл) | Типовая антисыворотка (мл) | Объем смеси, вводимый мышам (мл) | Количество мышей |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------|
| 0,9 | 0,3 А | 0,4 | 2 |
| 0,9 | 0,3 В | 0,4 | 2 |
| 0,9 | 0,3 С | 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 А нейтрализует только гемологический токсин.
2. Антитоксин В нейтрализует токсины А, В, С и D.
3. Антитоксин С нейтрализует токсины А и С.
4. Антитоксин D нейтрализует токсины А и D.
5. Антитоксин E нейтрализует токсины А и E. Эти данные представлены в таблице 56.

Таблица 56 - Идентификация токсинов *C. perfringens* в реакции нейтрализации

| Антитоксическая сыворотка | Тип токсина | | | | |
|---------------------------|-------------|--------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | А (альфа) | В (альфа, бета, эpsilon) | С (альфа, бета) | Д (альфа, эpsilon) | Е (альфа, йота) |
| Альфа | - | + | + | + | + |
| Альфа, бета, эpsilon | - | - | - | - | + |
| Альфа, бета | - | + | - | + | + |
| Альфа, эpsilon | - | + | + | - | + |
| Альфа, йота | - | + | + | + | - |

Таблица 56 продолжена отсутствует

В соответствии с «Методическими указаниями...» в лабораториях РФ для реакции 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 концентрат и физиологический раствор. Компоненты инкубируют 30 минут при 37°С и по 0,5 мл смеси вводят двум белым мышам внутривенно (дистрибуцинно) 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 токсина | Токсин в исследуемом материале | Антитоксическая сыворотка | | | | Контроль |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|---|---|---|----------|
| | | А | С | Д | Е | |
| С.р. | альфа | - | х | х | х | + |
| | бета | + | - | + | + | + |
| | эpsilon | + | + | - | + | + |
| | йота | + | + | + | - | + |

Примечание к таблице 57

- х - у морских свинок и кроликов некроз на месте введения ;
- о - у морских свинок и кроликов некроз отсутствует;
- 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 В составляет 45° С, В и С — 37-45° С.

Согласно «Методическим указаниям...» в лабораториях РФ рекомендуется посев из содержимого кишечника и паренхиматозных органов животных 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 застывшие пробирки прогревают при 65° С в течение 10 минут и затем культивируют 18 часов при 38° С. Рост *C. perfringens* в среде Кита-Тароцци — быстрый (3-8 часов), характеризуется помутнением, бурным газообразованием, образованием гомогенного или слизистого осадка. Из 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 или субтерминальные споры. При незначительной контаминации культуры посторонней микрофлорой производят дробный высеv на глюкознокровяной агар Цейсслера. Посевы инкубируют при 37-38° С в течение суток.

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 круглая, 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 на воздухе колонии всех типов приобретают зеленоватый оттенок, что является характерным признаком. Колонии окружены зоной гемолиза, полного или частичного. Зона гемолиза может быть двойной: вокруг колоний полный гемолиз (действие гемолизина), на отдалении — неполный (действие лецитиназы). Среда в процессе роста *C. perfringens* становится буро-коричневой.

Из типичных колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении характерных для *C. perfringens* по морфологии и тинкториальным свойствам клеток культуру отбирают на среду Кита-Тароцци, выращивают 8-16 часов при 37-38° С и определяют в биопробе на мышцах наличие токсина (методику см. выше).

Если предполагается наличие *C. perfringens* типов E и D, токсин перед постановкой опыта на животных переводят из состояния протоксина в токсин. Предварительно культуру подщелачивают до pH 8,0-8,2, инкубируют

0,1% трипсина или 0,5% панкреатина и выдерживают, встряхивая, 2 часа при 37-38° С. При наличии токсина типа С токсичность снижается, В — сохраняется, D и E — увеличивается. Тип токсина устаивают в реакции нейтрализации, как указано выше. В настоящее время фирма Techlab Inc выпускает диагностический набор для иммуноферментного выявления токсинов возбудителя в содержимом кишечника. Перспективно применение для идентификации токсичных штаммов *C. perfringens* ПЦР-диагностики.

С целью идентификации выделенных культур на видовом уровне изучают их ферментативные свойства. Для *C. perfringens* характерно наличие лецитиназы, желатиназы, кazeиназы, способности расщеплять с образованием кислоты глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, свертывать молоко за 8-10 часов, при этом образуются прозрачная сыворотка и рыхлый коагулат датенина. Принимают во внимание, что штаммы типа А расщепляют инулин, но инертны по отношению к глицерину, типа D 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 — остропотекающая неконтагиозная болезнь овец, характеризующаяся геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычужника, двенадцатиперстной кишки, перерождением паренхиматозных органов, гнилостным 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 гемоглобинурии крупного рогатого скота в Америке и Австралии, *C. novyi* типа С — как возбудитель остеомиелита буйволов, *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 кишку, экссудат грудной и брюшной полостей, инфильтрат подкожной клетчатки, 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. novyi* видны в препарате как крупные грамположительные палочки (0,8-1,0x3-10 мкм) с закругленными концами, располагающиеся одиночно, парами, иногда в виде коротких цепочек. Клетки *C. septicum* имеют форму грамположительных палочек размером 0,6-0,8x3-8 мкм, характерным признаком считается наличие нитевидных форм в мазках-отпечатках с серых 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, температуры — 37-38° С.

Посевы производят из отечной подкожной клетчатки, подслизистой сычуга, паренхиматозных органов, экссудата грудной и брюшной полостей в среду Кита-Тароцци, глюкозо-кровяной агар в чашках Петри.

Учитывая, что возбудители строгие анаэробы, целесообразно, по возможности, применять среды, содержащие цистеин, натрия тиогликолат для создания оптимального окислительно-восстановительного потенциала сред. Чашки с посевами инкубируют в анаэрокате. Время инкубирования 24-48 часов.

Характер роста возбудителей на питательных средах. Рост *C.septicum* на среде Кита-Тароцци характеризуется интенсивным равномерным помутнением и образованием газа. На глюкозо-кровяном агаре возбудитель образует кружевные сплетения в виде «нитей-арабески» и зоны гемолиза. В агаре столбиком (1%-ный) формирует колонии диаметром 1-2 мм с уплотненным центром и радиально отходящими нитевидными перепутанными отростками. В глубине более плотного агара

(14 мм) колонии чечевицеобразной формы, иногда с отростками, коричнево-желтоватого цвета. При росте в мозговой среде образует газ.

S. novyi в жидкой питательной среде растет с ее помутнением, образованием однородного или хлопьевидного осадка, газообразование слабое. *S. novyi* тип В (*S. gigas*) на глюкозо-красном агаре формирует плоские шероховатые колонии с неправильными бахромчатыми краями и отростками, образующими на периферии параллельные петли. Внутренняя структура колоний обычно неоднородна (мозаичность, кристаллы). Колонии *S. novyi* типов А, В, С нередко проявляют тенденцию к образованию зонной структуры колоний. Колонии окружены зоной гемолиза. Колонии *S. novyi* типа В чаще мелкие, рассыпчатые. В агаре высоким столбиком с глюкозой колонии *S. novyi* напоминают кусочки ваты с уплотненным, более темным (коричневым, 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 редкие, центральные или субтерминальные, лучше образуются на средах, бедных утилизируемыми углеводами и другими питательными веществами. В старых культурах клетки возбудителя окрашиваются грамтрицательно.

S. septicum — полиморфная, грамположительная палочковидная бактерия размером 0,6-0,8x2-35 мкм, располагается единично или парами. В старых культурах окрашивается грамтрицательно, 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*

| Идентификация | Признаки | | | | | | | | |
|----------------------|------------|--------|------------|----------|-------|---------|---------|----------|----------|
| | Лецитиназа | Липаза | Желатиназа | Казеиназ | Индол | Глюкоза | Лактоза | Сахароза | Мальтоза |
| <i>S. novyi</i> | - | - | + | + | - | + | + | - | + |
| <i>S. novyi</i> А | + | + | + | - | - | + | - | - | + |
| <i>S. septicum</i> | + | - | + | + | V | + | - | - | + |
| <i>S. septicum</i> А | - | - | + | - | + | + | - | - | н.д. |

| | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| тип D (<i>C. haemolyticum</i>) | + | - | + | + | + | + | - | - | + |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

V — варьирующий признак; нд — нет данных.

Дополнительными характеристиками *C. novyi* являются токсигенные свойства. *C. novyi* типов А и В синтезируют токсин «альфа», который обладает летальным и некротизирующим действием. *C. novyi* типов В и D (*C. haemolyticum*) продуцируют бета-токсин, причем тип D в большом количестве, а тип В — в меньшем. *C. novyi* типа С указанные токсины не образует. В реакции нейтрализации *C. novyi* типов А и В за счет отсутствия альфа-токсина неразличимы. В рутинной диагностической практике реакцию нейтрализации не используют.

Биопроба. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике браздзота овец» (1984) биопробу проводят одновременно с посевом исследуемого материала на питательные среды для выделения культуры возбудителя или проверки вирулентности выделенной культуры. Для заражения используют морских свинок массой 300–400 г. Патологический материал измельчают в стерильной ступке в МПВ. Двум морским свинкам вводят подкожно в область брюшных мышц 0,5–1,0 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, в подкожной клетчатке пузырьки газа, кишечник вздут, в сердечной сорочке и грудной полости значительный объем трансудата. Заражение морских свинок *C. novyi* дает следующие патологоанатомические изменения на месте инъекции студенистый отек соединительной ткани, мышцы бледные. *C. sordellii* вызывает сходную картину изменений.

Павших животных подвергают бактериологическому исследованию. Обязательно делают мазки-отпечатки с серозных покровов печени. Капсулы *C. septicum* в таких препаратах имеют форму длинных нитей.

Лабораторная диагностика клостридиоза птиц

C. colinum вызывает у цыплят, индюшат язвенный энтерит, поражение почек, селезенки.

Лабораторная диагностика основана на выделении и идентификации культуры возбудителя.

Бактериологическое исследование. В качестве материала берут содержимое кишечника с изъязвлениями, пораженные участки печени, селезенки, в которых наблюдают диффузные некротические очаги.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят микропрепараты, 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, тиоглицериновый бульон с 8-10% сыворотки крови овцы, заражают 5-8-дневные куриные эмбрионы. На этих средах возбудитель необходимо инкубировать несколько раз, прежде чем производить высев на глюкозо-аревинный агар. Контаминированный материал высевают на среды с добавлением 25 мг/см³ полимиксина В. У выделенных культур *S. colinum* исследуют ферментативные характеристики.

Для вида характерно отсутствие лецитиназы, липазы, желатиназы, казеиназы, образование индола, кислоты из глюкозы, сахарозы, мальтозы, инулина, лактозы.

Лабораторная диагностика эмфизематозого карбункула

Эмфизематозный карбункул — остропротекающая неконтагиозная инфекционная болезнь крупного и мелкого рогатого скота, характеризующаяся повышением в мускулатуре крепитирующих отеков.

Возбудитель. — *S. chauvoei*. Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Для исследования из пораженных участков стерильным инструментом берут кусочки ткани 3х3х3 см³, при вскрытии трупа также берут кусочки печени, селезенки, кровь сердца. Материал должен быть взят не ранее 4 часов после гибели животного. В теплое время года материал консервируют 30%-ным раствором глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят микропрепараты, окрашивают по Граму, Муромцеву. В окрашенных пре-

паратах возбудитель виден как грамположительные палочковидные бактерии размером 0,5-1,6х1,5-9,6 мкм, с закругленными концами, тенденцией к полиморфизму (грушевидные, веретенообразные, шаровидные формы), с центральными и субтерминальными спорами. Иногда возбудитель образует цепочки из 3-5 клеток, но, в отличие от *C.septicum*, в массах серозных оболочек не имеет форму нитей.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *C. chauvoei* — строгий анаэроб, требует разрежения до 5-10 мм ртутного столба. Температурный оптимум 36-38° С. Посевы на питательные среды производят предварительно профламбированными кусочками тканей, жидкий материал высевают пастеровскими пипетками. В качестве питательных сред используют среду Кита-Тароцци, кровяной агар (кровь овцы) с печеночным экстрактом глюкозо-красный агар Петри-Слера. Для получения изолированных колоний посев материала желательно производить на 3-4 чашки Петри.

Параллельно производят посеvy 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 препаратах 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 сывнроточного агара в ходный материал (0,5 мл) засевают в пробирку с расплавленным и остуженным агаром, затем этой же пипеткой производят последовательный перенос материала из этой пробирки еще в четыре пробирки с агаровой средой. Содержимое 4 и 5 пробирок переливают в трубки Виньял-Нейбю. Выросшие колонии отвивают на среду Кита-Тароцци и глюкозо-красный агар. Посевы в чашках инкубируют в строго анаэробных условиях в анаэротатах, 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 предотвращения 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 и формируется рыхлый беловатый осадок. Старые культуры имеют

прогорклого масла. Гнилостный запах и потемнение среды указывают на загрязнение. Скорость спорообразования зависит от ряда факторов и может варьировать от 24 до 72 часов. При получении смешанной культуры проводят дробный посев на глюкозо-кровоный агар в чашках Петри. В толще сыровоточного агара возбудитель образует чечевицеобразные или круглые колонии с нежными отростками.

На кровяном агаре возбудитель формирует округлые колонии диаметром 0,3-3 мм в большинстве случаев с небольшой зоной (β -гемолиза в виде «стерлядиной пуговицы» (S-форма) или плоские с изрезанными краями в виде виноградного листа (R-форма). При посеве в мозговую среду колонии заплесневаются, 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 желатины, расщепление перечисленных углеводов с образованием кислот, отсутствие утилизации салицина, образование лецитиназы, липазы, эстеразы, индола. При исследовании ферментативных свойств, кроме стандартных сред и тестов, может быть использована система API20A для анаэробов (Analytab Products).

Биопробы. Проводят с целью выделения возбудителя из исследуемого материала или определения патогенных свойств выделенной культуры. Для исследования загрязненного материала 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 инъекцией в область брюшных мышц морским свинкам массой 350-400 г. В большинстве случаев наблюдают в течение 8 суток. Гибель обычно наступает на 14-16 сутки. При наличии в материале возбудителя на месте инъекции в дальнейшем обнаруживают кровоизлияния, геморрагический выпот. Кожа от пораженных мышц отделяется с трудом. Мышцы темно-красного цвета, в

клетчатке немного газа, кишечник не вздут, желчный пузырь переполнен содержимым. Возможно наличие слабовирулентных штаммов, поэтому целесообразно внутримышечное введение материала с 1-2 каплями 20% -ого раствора молочной кислоты, подавляющей фагоцитоз. При каждом заражении кролик не погибает (дифференцирующий признак).

Путем микроскопии мазков-отпечатков из тканей на месте инъекции отличить *C. chauvoei* от других возбудителей злокачественного отека достаточно сложно, за исключением *C. septicum*, который образует на разных покровках длинные нити.

Лабораторная диагностика злокачественного отека

Злокачественный отек (газовая гангрена) — остропротекающая и контагиозная раневая инфекционная болезнь всех видов животных, проявляющаяся воспалительным отеком, некрозом пораженных тканей и интоксикацией. 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 мышц, тканевый экссудат и паренхиматозные органы.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму, Муромскому, микроскопируют. Морфология *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. chauvoei* в тонком 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 препарате возбудитель споры не образует.

Клетки *C. sordellii* полиморфные, палочковидные с закругленными концами, размером 1,2-1,5 x 3,8 мкм, располагаются изолированно, по 1-2 клетки, 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.

Исходный материал засевают в среду Кита-Тароцци, глюкозо-кровяной агар, МПБ, МПА. Чашки Петри с посевами инкубируют в анаэробе. 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 помутнением, последующим просветлением среды и образованием осадка, газообразования нет. На глюкозо-кровяном агаре формирует мелкие, розоватые, полусферические с ровным краем, блестящей поверхностью колонии диаметром 0,5-1 мм. С возрастом колонии становятся непрозрачными, серыми или белыми, с изрезанными краями. В толще сахарно-кровяного 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 аммиачный запах. По мере старения в среде появляется слизистый осадок. На глюкозо-кровяном агаре через 24-48 часов формирует слабовискозные, серо-белые колонии неправильной формы, с шероховатой поверхностью, изрезанными краями. Обычно колонии окружены узкой зоной гемолиза. В агаре столбиком формирует чечевицеобразные колонии.

Морфология клеток возбудителей в культуре. *C. histolyticum* в старых культурах формирует овальные споры, располагающиеся центрально или субтерминально («игольное ушко»), перитрих.

C. sordellii в культуре образует овальные центральные или субтерминальные споры. В молодых культурах активно подвижен (перитрих).

Идентификация возбудителей по ферментативным свойствам. При обнаружении в первичных посевах на среде Кита-Тароцци бактериальных клеток с типичными для возбудителей злокачественного отека морфологическими и тинкториальными свойствами из культур делают дробный посев на глюкозо-кровяной агар Цейсслера. В случае выявления типичных клеток возбудителя в колониях на глюкозо-кровяном агаре, в первичных или последующих посевах, из подозрительных колоний отбирают первую культуру и у субкультур проверяют ферментативные свойства. Биохимические свойства *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. chauvoei* изложены ранее в соответствующих разделах. Для *C. histolyticum* и *C. sordellii* характерны ферментативные свойства, представленные в таблице 91. Вирулентные штаммы *C. sordellii* продуцируют летальный токсин типа А-токсина *C. botulinum*. Многие штаммы выделяют кислородо-лабильный гемолизин, неидентифицированные протеазы. *C. histolyticum* на казеиновых средах выра-

батывает летальный и некротический токсин, высокоактивную коллагеназу и протеиназу, а также чувствительный к кислороду гемолизин. Для определения ферментативных свойств и типа токсина используют методы, 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 | Мальтоза |
| <i>C.sordellii</i> | + | - | + | + | + | + | - | - | + |
| <i>C.histolyticum</i> | - | - | + | + | - | - | - | - | - |

Биопроба. Проводят для обнаружения возбудителей непосредственно в исследуемом материале, а также для определения патогенных свойств изолированных 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 животными 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, которая имеет серовато-грязный цвет, кишечник вздут, сосуды кровенаполнены. В случае заражения *C. perfringens* типов В и С кожа легко отделяется, но мышцы красного цвета, сухие. Кишечник геморрагически воспален, вздут. Заражение *C. sordellii* приводит к образованию на месте инъекции студенистого 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 длинных мышц. Возбудитель — *Clostridium botulinum*, производит несколько типов токсинов. К токсинам отдельных типов наиболее чувствительны: А — человек, куры; В — человек, КРС, куры; С_a — канюшная 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 внутривенно (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 дезинфицируют 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 внутривенно 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 (госпная талия) и гибель на 2-5-е сутки животных, которым ввели гретый фильтрат, и отсутствие клинических симптомов у животных с сырым материалом («Методические указания по лабораторной диагностике ботулизма»).

Обнаружение токсина может быть проведено несколько иным способом. Приготовленную взвесь центрифугируют, фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Поскольку токсин может присутствовать в форме протоксина (Е), то для его активации девять частей 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 в реакции нейтрализации с антитоксическими сыворотками типов А, В, С, D, E. С этой целью 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 внутривенно по 0,8 мл смеси. Двум контрольным животным инъецируют исследуемый фильтрат, разведенный 1:1 стерильным физиологическим раствором. Учет результатов проводят, как описано выше. При нейтрализации токсина смесью антисывороток и титры белых 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 внутривенно двум белым мышам в дозе 0,8-1 мл. Результат учитывают в течение четырех 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 кишечном тракте здоровых животных, после их смерти способны размножиться в кишечнике 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 Кювара-Тароцци с 0,5% глюкозы в два флакона емкостью 100-200 мл. Оптимальный 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 инку-

в интервале один флакон прогревают при 80° С в течение часа, другой не подвергают термической обработке. Прогревание уничтожает большую часть сопутствующей неспорообразующей микрофлоры и инициирует прорывание спор возбудителя. Споры возбудителя типа Е требуют обработки паром. Параллельно, с целью выделения чистой культуры возбудителя, споры засевают 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, окрасивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении в мазках грамполюсовидных палочковидных бактерий (0,9-1,2х4-6мкм) субтерминальными спорами на 5-7-е сутки инкубирования проводят выявление токсина и его идентификацию в реакции нейтрализации на мышах, как описано выше. Указанные 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 *S. 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 клеток, типичных для *S. 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 децитариназы и липазы путем посева на желточный агар, определяют наличие желатиназы, казеиназы, способности образовывать индол, кислоту из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы. По перечисленным критериям культуры *S. botulinum* могут быть отнесены к одному из четырех ферментативных типов (табл. 60). Применяют тест-системы для диагностики (см. ранее).

Таблица 60 - Ферментативные свойства *C.botulinum*

| Тип | Признак: | | | | | | | | | Тип токсина |
|-----|------------|--------|-------------|------------|-------|---------|---------|----------|----------|-------------|
| | Лецити-аза | Липаза | Желати-наза | Калени-аза | 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 в исследуемом материале токсина возбудителя, а также выделения культуры возбудителя и выявления у нее токсигенных свойств. С учетом характерных клинических признаков болезни, нередко ограничиваются при постановке диагноза изучением клиники и анамнестических данных.

Бактериологическое для исследования

Прижизненно для исследования направляют раневой секрет, фрагменты тканей из глубоких слоев мест поражения; посмертно — ткани в 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 характерными терминально расположенными спорами («барabanная палочка»), которые 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 р-

серию (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 ED столбнячного антитоксина. Животным третьей группы вводят фильтрат, прокипяченный при 100° С в течение 30 минут. Положительный результат: у мышей 1-й и 3-й групп изменения должны отсутствовать, у мышей 2-й группы через 2-4 суток в положительных 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 токсоина в материале работу по выделению культуры прекращают. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной микробиологии 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 *S. tetani*. Возбудитель — строгий анаэроб, температурный оптимум — 37-38° С, рН 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 вносят с целью получения изолированных колоний на кровяной агар с 1% и 3% агара в чашки Петри. Посевы культивируют в анаэробном состоянии с удалением воздуха до 4-5 мм ртутного столба или с заменой воздуха смесью Н₂ и СО₂ 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 Цейсслера *S. tetani* формирует круглые, бесцветные или серые колонии с неровными краями (ризидные), на 1,5%-ном агаре (жидком) наблюдают характерный расплывающийся, роящийся рост возбудителя. Может наблюдаться узкая зона β-гемолиза.

На жидких питательных средах и подозрительных колониях делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. В положительных случаях находят в мазках тонкие грамположительные палочки с терминальными спорангиями, с возрастом клетки становятся грамвариабельными, вплоть до

грамотрицательных. Если первичный посев производили только в агаровую 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 *S. 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 *S. tetani* характерно отсутствие лецитиназы, липазы, казеиназы, возбудитель не образует кислоты из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы, гидролизует желатину, индол образует не постоянно. Для целей идентификации удобно использовать тест-системы для анаэробов.

Питательные среды

Среда Кита-Тароци. Мясо или печень крупного рогатого скота нарезают мелкими кусочками, заливают трехкратным объемом МПБ 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 (запятят с последующим охлаждением).

Кровяной агар с глюкозой. К 3%-ному МПА (рН 7,2-7,4), расплавленному 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 (Тароци). В бульон Мартена (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 на водяном паре в течение 2 часов. Затем раскладывают по пробиркам наклонным столбиком и стерилизуют в течение 2 часов при 110° С. Для более быстрого

для повышения мозговой среды при культивировании анаэробов рекомендуется добавить 0,05% сернокислого 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, сливают, 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% двуосновного 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, 4,4 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 сернокислого натрия (Na_2SO_4) и 1 мл 8%-ного раствора хлоридного железа (FeCl_3), приготовленного на стерильной дистиллированной воде. Раствор Na_2SO_4 предварительно стерилизуют 1 ч текучим паром. Готовую среду, не стерилизуя, разливают по чашкам Петри. Сернокислый натрий можно заменить серноватистокислым натрием ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_4$), а хлоридное железо — сернокислым (FeSO_4). Сульфат натрия соединяется с хлоридным железом, и образуется черный осадок сернистого железа (FeS). Этим свойством обладают анаэробы и некоторые аэробные бактерии, в результате чего колонии таких микроорганизмов окрашиваются в черный цвет. *S. perfringens*, обладающий большой скоростью роста, изменяет цвет среды через 1-2 ч культивирования. Другие анаэробы формируют зеленовато-черные колонии через 6-7 ч.

Молочные среды. Молоко отстаивают и удаляют верхний жировой слой. Обезжиренное молоко разливают высоким столбиком в пробирки, в 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 сернистоокислого 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-кровяной агар. К 3%-ному МПА (рН 6,4) с 1% глюкозой подогретому до температуры 50° С, добавляют бензидин до концентрации 9% и 10% стерильной дефибринированной крови барана. Компоненты перемешивают до приобретения средой шоколадного оттенка, разливают по чашкам Петри и подсушивают 4-5 ч в термостате. Заселенные 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, 0,3 мл 1% HCl и нагревают до растворения. Раствор пригоден для употребления в течение 2 недель.

Желточно-кровяной агар Шанина — Вегина. К 2,5%-ному МПА добавляют 10% дефибринированной крови барана, 10% желточной массы. Среда предназначена для выявления *S. povuі*. Через 16 ч выращивания 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 одновременно перламутрового слоя и зоны редукции.

Полусинтетическая среда. Используют для культивирования и быстрой селекции анаэробных бактерий. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 15 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 2,5 г натрия хлорида, 1,3 г агар-агара и подщелачивают. Смесь автоклавируют при 120° С в течение 15 минут, фильтруют, добавляют 5,5 г глюкозы, 0,5 г гидросульфита натрия, предварительно растворенных в небольшом количестве воды, устанавливают рН 7,1. Добавляют 0,001 г ре-зазурина и встряхивают смесь в течение нескольких минут. Среду разливают в пробирки по 10 мл, стерилизуют при 110° С 30 минут, охлаждают под холодной водой. При росте анаэробов среда окрашивается в нижней части пробирки, фекультативных анаэробов — весь столбик среды. Среду используют 3 недели при хранении в условиях комнатной температуры.

Перфрингенс-агар (O.P.SJP.-агар, пропись фирмы «Дифко», 1981). 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 трибуфера, 10 г агара, устанавливают рН 7,3. Стерилизуют автоклавирующей

на 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 мл 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. Такой состав обеспечивает селективные свойства, оптимальные для изоляции *S. perfringens*. Натрия метабисульфат и аммонийно-цитратное железо являются индикаторами редукции сульфита, что влияет на формирование колоний возбудителя черного цвета диаметром 2-4 мм. Рост таких сульфитредуцирующих бактерий (сальмонеллы, протей, цитробактер, стафилококки, бациллы) ингибируется. На среде могут расти энтеробактерии, но их колонии по внешнему виду отличаются от колоний *S. 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 (энтерококков) 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 хлорида 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 *S. perfringens*. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют трипозы — 15 г, соевого пептона — 5 г, мясного экстракта (сухого) — 5 г, дрожжевого экстракта — 5 г, натрия метабисульфата — 1 г, железа аммонийноцитратного — 1 г, агара — 14 г. Устанавливают рН 7,6, стерилизуют при 121° С 10 минут. Затем среду охлаждают до 50° С и вносят соответствующие селективные добавки.

Триптозо-сульфитный циклосеринный агар (TSC-агар). В основной перфрингенс-агар вносят D-циклосерин из расчета 400 мг/л и 50 мл/л водной эмульсии. Компоненты перемешивают и готовую среду разливают в чашки Петри.

Перфрингенс-агар Шахиди-Фергусона (SFP-агар). В основной перфрингенс-агар вносят следующие антибиотики: 12 мг/л канамидин сульфат, 30000 ЕД/л полимиксин В сульфата и 50 мг/л желточной мукосии. 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 МИК.

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 рН 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 пивурата, 0,0005 г менадиона, 0,005 г гемина, 10 г агара. Устанавливают рН 7,1, стерилизуют при 121° С 15 минут. Среда рекомендуется для изоляции 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-агар). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 3 г дрожжевого экстракта, 10 г мясного экстракта, 10 г пептона, 5 г декстрозы, 1 г растворимого крахмала, 3 г натрия хлорида, 3 г натрия ацетата, 0,5 г цистеина гидрохлорида, 15 г агара. Устанавливают рН 6,8, стерилизуют при 121° С 15 минут. Среда рекомендуется для исследования кишечной микрофлоры. С добавками крови она пригодна для обнаружения в фекасах животных и людей патогенных клостридий, с добавками крови и неомицина — бактериоидов.

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. Приготовленный 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 сбраживов. 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 Нечасевской 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 вновь фильтруют. Полученную светло-желтую прозрачную жидкость разливают по пробиркам или флаконам, в которые помещают кусочки вареного картофеля и накладывают вазелиновое масло; стерилизуют 20 минут при 1 атмосфере. Для приготовления твердой среды к бульону добавляют 1% агара и стерилизуют.

На картофельных средах все анаэробы не теряют своих патогенных и ферментативных 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 воды добавляют 0,25% агара (на 500 мл) и расплавляют в автоклаве.

В горячему агару добавляют 100 мл мясо-пептонной воды с лакмусом. Для улучшения буферности среды добавляют 0,2% думеталлического тетраборнокислого натрия.

Агар с лакмусом разливают по колбам из расчета количества имеющегося в лаборатории испытуемых Сахаров. В каждую колбу вносят 2% испытуемого сахара. После растворения сахара агар разливают по пробиркам высоким столбиком и дробно стерилизуют текучим паром 3 дня по 15 минут. Посев производят в расплавленный и остуженный до 40° С жидкий агар. Лакмус можно заменить индикатором Андраде (5 мл). Приготовление индикатора Андраде: 0,5 г кислого фуксина растворяют в 10 мл дистиллированной воды и прибавляют 16 мл нормального раствора содового 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 покраснение 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 фазу. 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 баранов, 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* относятся к так называемой «ренальной» группе коринебактерий. *C. equi* (синоним *Rhodococcus equi*) вызывает бронхопневмонию у жеребят 2-4-месячного возраста, цервикальные лимфадениты у свиней, крупного рогатого скота; обычно этот вид бактерий обнаруживают в фекалиях животных. *C. lacti* обитает в молочном канале крупного рогатого скота, его роль в патологии неясна. Хорошо известный ранее вид *C. pyogenes* перенесен в род *Actinomyces*. **Лабораторная диагностика коринебактериозов основана на результатах бактериологического исследования.**

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является гной, экссудат, при пневмонии (*C. equi* - *R. equi*) — образцы трахеальной слизи, в случаях цистита и нефритов 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 Целя—Нильсена. В препаратах, окрашенных по Граму, коринебактерии имеют форму грамположительных палочек с закругленными концами, различной степенью полиморфизма, нередко располагающихся под углом 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, черного 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, белые.

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 подозрительных 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, отбирают на питательные среды и исследуют 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, каталазную 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 желатинина, образование урасы, образование кислоты без газа из глюкозы, мальтозы, сахарозы (табл. 61).

С целью дифференциации коринебактерии «ренальной» группы дополнительно изучают скорость формирования колоний, цвет, рост при pH 5,4 (в бульоне), редукцию нитратов, разжижение желатина, гидролиз тинна-80, образование кислоты из ксилитозы, 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 *S. 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 вызвать 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 гидроокиси натрия, 18 мл 2%-ного раствора теллурита калия, 18 мл 2,5%-ного раствора гипосульфата натрия и 200 мл стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота.

Приготовление раствора теллурита калия. В 100 мл дистиллированной воды растворяют 2 г теллурита 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

| Признак | Corynebacterium | Agromyces | Cellulomonas | Oerskovia | Rothia | Actinomyces | Arcanobacterium | Propionobacterium | Arachnia | Cardanella |
|-------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|----------------------|
| Морфология | Палочки булаво-видной 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 |
| Грама | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Споровый | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Аэробный | X | + | + | + | + | + | + | P | + | + |
| Анаэробный | - | - | - | - | - | - | - | P | - | - |
| Степень окисления | - | - | P | X | - | - | - | - | - | - |
| Степень окисления | + | - | + | + | + | 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; патогены для человека и животных | Продукты, кожа, человека, клинический материал. Есть патогенные для человека | Ротная полость и др. раны, царапины, чело- века. Мо- жет быть патоген- ной для чело- века | Грибы, плесень, дрожжи, грибы |
| <p>* - Возможно быстрое обесцвечивание; * - Возможно появление грамотрециательных клеток, но более типична вариабельность; некоторые штаммы дают положительную реакцию; ⁴ которые штаммы дают негативную реакцию; штаммов имеют положительный признак, признак различен в рангах (вида, рода, семейства).</p> | | | | | | | | | | |

Таблица 62 - Дифференциация коринебактерий и *Rhodococcus equi*

| Признаки | <i>C. bovis</i> | <i>C. kurtzscheri</i> | <i>C. pseudo-tuberculosis</i> | <i>C. renale</i> группа | <i>R. equi</i> |
|---------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------|
| Грибок | - | V | - | - | - |
| Угнетение культуры | - | + | - | - | - |
| Угнетение инкубации | - | + | V ^н | V | + |
| Угнетение | - | + | + (>18ч) | + (<1ч) | + (>18ч) |
| Угнетение культуры | - | - | - | V | - |
| Угнетение | + | + | + | + | - |
| Угнетение | - | + | + | - | - |
| Угнетение | - | + | - | - | - |

Угнетение культуры: - отрицательная реакция; v - варьирующий признак;
 н - штаммы, выделенные от лошадей позитивные, 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 |
| Число колоний микроскопически видимых на чашке при 17° С | 24 | 24 ч | 48 ч |
| Угнетение культуры из: | | | |
| Угнетение | - | - | + |
| Угнетение | - | + | + |
| Угнетение инкубации | - | + | - |
| Угнетение культуры | + | - | - |
| Угнетение смеси-80 | - | - | + |
| Угнетение смеси рН 5,4 | + | - | - |

Таблица 64 - Дифференциальные признаки видов коринебактерии

| Признаки | | <i>C. diphtheriae</i> | <i>C. pseudotuberculosis</i> | <i>C. xerosis</i> | <i>C. pseudodiphthericum</i> | <i>C. kurtzscheri</i> | <i>C. minusissimum</i> | <i>C. striatum</i> | <i>C. renale</i> |
|-------------------------|-----------|-----------------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Гидролиз | эскулина | - | - | - | - | - | нд | - | - |
| | гиппурата | - | - | + | + | + | + | + | + |
| | желатина | 1 | X | - | - | - | - | X | - |
| Уреаза | 1 | + | - | + | + | - | - | - | + |
| Фосфатаза | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| Расщепление тирозина | - | - | - | - | - | - | нд | + | - |
| Метилрот | + | + | - | - | - | - | - | + | - |
| Расщепление казеина | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Редукция нитратов | + | X | + | + | + | - | - | - | - |
| 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 | - | - |
| лектоина | + | X | - | - | + | нд | + | + | |
| крахмала | X | - | - | - | + | - | + | - | |

| Штаммы | C. parvum | C. mucetoides | C. matruchoii | C. flavescens | C. vitarumen | C. glucamicum | C. callunac | C. bovis | C. paurometobolium |
|----------|-----------|---------------|----------------|---------------|--------------|---------------|-------------|----------|--------------------|
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| акридон | + | - | + | нд | + | - | - | - | + |
| глицерин | + | нд | + | - | - | + | + | + | - |
| глицерин | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| глицерин | + | - | X ² | - | + | + | + | - | - |
| глицерин | - | + | - | - | - | нд | нд | + | + |
| глицерин | - | нд | нд | нд | нд | нд | нд | - | - |
| глицерин | - | - | - | + | + | + | + | - | - |
| глицерин | - | нд | нд | нд | нд | - | - | - | - |
| глицерин | + | - | + | - | + | + | - | - | - |
| глицерин | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| глицерин | - | - | - | - | нд | - | - | X | - |
| глицерин | - | - | - | - | нд | - | - | - | - |
| глицерин | - | нд | - | - | нд | - | - | - | - |
| глицерин | + | нд | + | + | + | + | + | + | - |
| глицерин | - | - | + | + | + | - | - | + | - |
| глицерин | + | - | + | + | + | + | + | - | - |
| глицерин | - | - | - | - | - | - | - | X | - |
| глицерин | - | - | + | - | + | + | + | + | - |
| глицерин | нд | + | - | + | + | + | + | - | - |
| глицерин | + | X | - | - | + | + | + | X | - |
| глицерин | - | - | 5 X | - | нд | - | - | - | - |
| глицерин | нд | + | - | + | + | - | + | - | - |
| глицерин | + | - | + | - | нд | - | - | X | - |
| глицерин | + | нд | 5 | - | - | - | - | - | - |

11 — тип ulcerans; ² около 50% штаммов положительны; ³ тип ulcerans может быть отрицательным; ⁴ некоторые штаммы отрицательны; ⁵ некоторые штаммы положительны; нд — не обнаружен; X — 11-89% штаммов положительные.

Приготовление раствора гипосульфита натрия. Раствор готовят на стерильной дистиллированной воде. После добавления каждого компонента среду тщательно перемешивают и, не стерилизуя, разливают по

чашкам Петри. До использования среду можно хранить при 10° С 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%-ного питательного агара прибавляют 3 мл 2%-ного раствора теллурита калия, 10 мл глицериновой смеси и 50 мл «лаковой крови». Среду разливают в чашки Петри (используют не более 3-4 суток) и хранят при 4-10° С. 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° С питательного агара (рН 7,6-7,8) добавляют 10 мл дефибринированной крови лошади или крупного рогатого скота, 2 мл 2%-ного раствора теллурита калия (K₂TeO₃). Полученную среду перемешивают и разливают в чашки Петри. Колонии дифтерийных бактерий на этой среде имеют черный цвет или черный центр колонии, дифтероидов — более выпуклые, влажные, серого цвета, с коричневым центром, ложнодифтерийных бактерий — мелкие серые, с коричневым центром, непрозрачные.

Среда Пергола. Используют как среду обогащения для выделения коринебактерии дифтерии. Из куриного яйца стерильно извлекают желток, 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° С. Затем для контроля стерильности выдерживают 48 ч в термостате при 37° С. На этой среде дифтерийные бактерии формируют через 12-15 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 рогатого скота, добавляют 75 мл «лаковой крови», 20 мл 1%-ного раствора теллурита 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 текущим паром в течение 1 ч, охлаждают до 48° С и добавляют 10 мл 1%-ного раствора теллурита калия и 21 мл дефибринированной крови барана.

Желточно-молочно-агаровая среда. К 1000 мл 4%-ного агара на варшавском 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 800 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 цистицина, 1,3 мл 50%-ного раствора ацетата натрия, 880 мл 1%-ного раствора теллурита 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 коровьих яиц, 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 60° С. 3 дни по 2ч в аппарате Коха или в сушильном шкафу при 70° С 3 раза 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 средой обитания предположительно являются слизистые ротовой полости и 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 неходимости 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 гранул «друз», обнаруживаемых в гное или экссудате. С указанной целью гной (экссудат) помещают в чашку Петри, разводят небольшим количеством дистиллированной воды, находят зеленовато-желтые (*A. bovis*) или серо-белые (*A. viscosus*) зернышки, т.н. «друзы». Зернышки промывают в дистиллированной воде, помещают на предметное стекло в каплю 10-20% ного раствора NaOH или KOH и выдерживают 15 минут или немного подогревают 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 маленькие, очень полиморфные грамположительные палочковидные бактерии размером 0,5-2,0 x 0,2-0,3 мкм, располагающиеся беспорядочно. Клетки *A. hordeovulneris* имеют морфологию, типичную для рода, — нитевидные ветвящиеся, реже короткие дифтерондные формы.

Выращивание и идентификация патогенных видов рода *Actinomyces*

Культивирование. Посев исследуемого материала производят на кровяной агар (кровь овец, крупного рогатого скота). Посевы материала, преимущественно 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 засевают на селективные среды (см. «Питательные среды»). Для выделения *A. israelii* из контаминированного материала на неселективных средах следующую его предварительную обработку. Материал концентрируют в транспортной среде Syed: раствор 1-0,6% раствор K_2HPO_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, 10 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 концентрируют в транспортной среде. 1 мл суспензии смешивают с 1 мл раствора 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 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 гемолиза, выпуклые, с ровными краями, непрозрачные, белые или серо-белые, гладкие, мягкой консистенции.

A. viscosus формирует колонии двух типов: 1-й тип — крупные, гладкие, блестящие, выпуклые; 2-й тип — маленькие, шероховатые, неправильной формы.

A. hordeovulneris. Первоначально образует нитевидные микроколонины, 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 микроколонины на плотных средах, к 14 дню - макроколонины 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 — короткие 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 рода Начальные этапы идентификации предполагают в первую очередь дифференциацию видов рода *Actinomyces* от родов *Nocardia*, *Streptomyces*, *Dermatophilus*. При этом у выделенных культур определяют: потребность в O каталазную активность, подвижность, кислотоустойчивость, рост на грибных средах, наличие воздушных гиф, образование диффрагментацию гиф наличие запаха у колоний, тип утилизации углерода (окислительная, ферментация в тесте Хью - Ляйфсона).

На основании перечисленных признаков для дальнейшего изучения отбирают культуры бактерий, типичные по морфологическим, типичные

по химическим и культуральным свойствам для Actinomycetes, растущие в анаэробных или капнофильных (CO₂) условиях атмосферы, не имеющие запаха, дающие отрицательную (чаще) или положительную (реже) реакцию на каталазу, не проявляющие при окраске по модифицированному методу Цили — Нильсена кислотоустойчивое™, не растущие на средах для культивирования грибов, не образующие воздушных гиф, спор, не проявляющие склонности к фрагментации нитей (гиф), расщепляющие крахмал (глюкоза) в тесте Хью — Ляйфсона путем ферментации.

Таблица 65 - Родовые признаки Actinomycetes

| Признак | Actinomycetes | Nocardia | Streptomyces | Dermatophilus |
|--|--|----------------|-------------------|-----------------------------|
| Требование к кислороду | Анаэробы или капнофилы | Строгие аэробы | Аэробы | Аэробы/ капнофилы |
| Запах | -(+) | + | + | + |
| Каталаза | - | + | - | - |
| Кислотоустойчивость по окраске по модифицированному методу Цили — Нильсена | | | | |
| Рост на агаре | - | - | - | +(зооспоры) |
| Рост на агаре при инкубации в CO ₂ | + | + | + | - |
| Воздушные гифы | - | + | + | - |
| Споры | - | +(конидии) | +(конидии) | +(зооспоры) |
| Трехветвистая гиф (шнур) | - | + | + | + |
| Форма споры | - | - | Острый, почвенный | - |
| Метаболиты | Ферментация | Окислация | Окислация | Слабая ферментация |
| Среда обитания | Слизистые рта и носоглотки | Почва | Почва | Больные и животные-носители |
| Клиническое значение | Локальные и системные болезни, характеризующиеся образованием гранулы на коже, подкожной и в органах | | Не патогенны | Вызывают поражение кожи |

— положительная реакция; - отрицательная реакция; -(+) преимущественно негативные реакции.

Идентификация представителей рода Actinomycetes на видовом уровне. У выделенных культур, отвечающих родовым признакам Actinomycetes, 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 гное | Зелено-желтые гранулы (друзы) | Серо-белые гранулы (друзы) | - | (+) |
| Обнаружение при микроскопии мазков из исходного материала | Нити, ветвящиеся формы, реже дифтерейдные формы | Аналогично <i>A. bovis</i> | Короткие дифтерейдные формы | Аналогично <i>A. bovis</i> |
| Отношение к кислороду | Анаэроб-капнофил | Аэроб-капнофил | Аэроб-капнофил | Аэроб-капнофил или анаэроб-капнофил |
| Образование ката- | - | + (слабая реакция) | - | + (слабая реакция) |
| САМР - тест с <i>S. aureus</i> | - | - | + | - |
| Разжижение сыворотки 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 переменную патогенность. При подкожном заражении *A. pyogenes* у животных развиваются подкожные абсцессы, внутрибрюшинном или внутривенном — возможен летальный исход.

Питательные среды

Питательные среды и условия культивирования актиномицетов подбирают 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) — 11,0 г, сердечного отвара — 5,0 г, протеозопептона — 10,0 г, декстрозы — 10,0 г, натрия хлорида — 5,0 г, двуназиевого 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. Среда пригодна для культивирования *A. bovis* и *A. bovis*.

Среда Дох-агар (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют натрия нитрата — 2,0 г, калия хлорида —

1 г, калия сульфата — 0,35 г, калия сульфата — 0,35 г, сахарозы—30 г, вода — 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, агар-агар — 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, *M. bovocanis* — на средах с 15-20% фетальной сыворотки. Для изоляции ряда актиномицетов применяют питательные среды с селективными добавками.

Среда Бейгтона и Колмана. Состав питательной среды: сердечнорастворимый бульон — 3,7 г, дрожжевой экстракт (порошок) — 0,5 г, поливинилпирролидон — 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 калия 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 мкг/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, овец, собак и других видов животных. Вызывает легочной или системный нокардиоз, опухолеподобные поражения в тканях, локальные кожные или внутренние поражения, хронические грануломатозные маститы у крупного рогатого скота, у собак часто наблюдаются пневмонии, плевриты, вплоть до поражения центральной нервной системы. При кожном нокар-

диозе у крупного рогатого скота наблюдают грануломатозно-гнойное воспаление подкожной ткани и лимфатических сосудов. У свиней, овец вызывает пневмонии, маститы и лимфадениты, у кроликов — подкожные грануломатозные абсцессы или/и гнойно-грануломатозные поражения в 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** нокардиозов основана на выделении культуры возбудителя и его идентификации.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является ткань из гранулом, в том числе заключенная 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 клетки 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 спирально нитевидных ветвящихся грамположительных нитевидных форм.

Выделение и идентификация патогенных видов рода *Nocardia*

Культивирование. Посев материала проводят на кровяной агар, сербечно-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 сербечно-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. Колонии *N. asteroides* весьма похожи колонии непатогенных видов рода *Streptomyces*. Образующиеся воздушные гифы можно обнаружить микроскопией. Обычно на воздушных, реже на вегетативных колониях могут наблюдаться короткие и длинные цепи конидий.

Морфология клеток нокардий в культуре. Из подозрительных колоний готовят мазки, которые окрашивают по Граму и модифицированному методу Цилю-Нильсена. В положительных случаях находят грамположительные палки, 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 («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 нити, 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 культур.

Идентификация нокардий на уровне вида. При наличии у животных характерных для нокардиоза патологоанатомических изменений и соответствующих 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

Выделение этой группы микроорганизмов не представляет трудностей. Для их выделения из патологического материала можно использовать теллуритовую среду, декстрозный агар Сабуро, сердечнокровный агар и среду Левенштейна-Йенсена. Для подавления посторонней микрофлоры рекомендуется при выделении *N. asteroides* добавлять в питательную среду диметилхлортетрациклин (5 мкг/мл) или метилтетрациклин (10 мкг/мл) и противогрибные антибиотики.

Таблица 67 - Дифференцирующие признаки видов *Nocardia*

| Признаки | <i>N. asteroides</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. orlansensis</i> | <i>N. ripens</i> | <i>N. scrofulaceae</i> |
|---|----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------|---------------------|----------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| Разножение | | | | | | | | | | |
| Казеина | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Эластина | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Эскулина | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Гипоксантина | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + |
| Тестостерона | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Тирозина | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Ксантина | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Рост за счет использования как единственного источника углерода (% масса/объем) | | | | | | | | | | |
| Алонитола (1.0) | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| L-лябинозы (1.0) | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Мезоинозитола (1.0) | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - |
| D-маннитола (1.0) | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - |
| L-рамноза (1.0) | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - |
| Алипиновой к-ты (0.1) | + | - | - | - | d | - | - | - | - | - |
| Изобутанола | - | - | d | - | + | + | + | - | - | - |
| Пимелиновой к-ты (0.1) | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Себациловой к-ты (0.1) | + | - | - | - | d | d | - | + | - | - |
| Образование | | | | | | | | | | |
| Кислой фосфатазы | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - |
| a-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 крупный рогатый скот. *B. suis* включает четыре биовара, из которых первые три поражают свиней, а четвертый выделяют от северных оленей. Вид

— в России распространен повсеместно, второй — в Центральной и Восточной Европе, третий — в США, Аргентине, четвертый (олений) — в арктической зоне. *B. ovis* поражает овец, обуславливая эпидидимиты и выкидыши, 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 от других видов животных известны.

Согласно последней реклассификации представителей рода *Brucella* следует рассматривать как биовары *B. melitensis*: биовары *melitensis*, *suis*, *canis*, *neotomae* и *maris*. Биовар *maris* адаптирован к морским животным.

Лаборатория диагностики бруцеллеза основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

В лабораторию направляют абортирванный плод, плодные оболочки, плаценту, печень, желудок плода с перевязанным пищеводом и двенадцатиперстной кишкой, содержимое гигром, истечения из родовых путей. Кровь из матки берут в первые дни после аборта стерильным тампоном из полости 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 эпидидимы, семенники, предстательные железы, у овцематок берут истечения из родовых путей, абортирванные плоды. Если животное убито с диагностической целью, то исследуют половые органы, лимфатические узлы, паранатальные органы. Если в течение 1-1,5 суток материал доставлен в лабораторию нельзя, его консервируют в 4-5-кратном объеме 10% раствора глицерина.

Пробы молока (последние порции) отбирают в пробирки с резиновыми шариками и исследуют в день взятия пробы или консервируют добавлением салициланнолита (конечная концентрация 1:25 000) или борной кислоты (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 сцеживании молока на долю вымени надавливают рукой.

Материал для кольцевой реакции (КР) берут в виде сборной пробы из цистерны вымени в общем объеме 10-15 мл. Пробы молока па рынках берут по одной 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 крови для серологических исследований получают методом отстаивания, допускается консервирование фенолом (1 капля 5%-ного фенола на 1 мл), сухой молочной 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 образуют, расположены одиночно, реже — парами, короткими цепочками или небольшими группами.

Для бруцелл характерно более медленное окрашивание и отслаивание при промывании водой или обработке слабыми растворами кислот по сравнению с другими видами бактерий, что позволило ряду авторов предложить дифференциальные методы окраски клеток возбудителя.

Окраска бруцелл по Е.В. Козловскому. Мазок фиксируют на пламени, окрашивают 2%-ным водным раствором сафранина 2 минуты с подогреванием до появления пузырьков, затем промывают водой и окрашивают 0,75-1%-ным водным раствором бриллиантовой или малярийной 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 Цайля-Нильсена). Мазок фиксируют на пламени, окрашивают фуксином Пфейффера 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, промывают 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 3 капели 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, промывают 2 минуты карболовым фуксином Циля, разведенным водой 1:1, промывают водой, окрашивают 5 минут 2%-ным водным раствором метиленового синего, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы — красные, другие бактерии имеют синий цвет.

Иммунофлуоресцентное выявление бруцелл проводят прямым или непрямым способом.

Выделение и идентификация культур бруцелл

Культивирование. Обычно исследуемый материал засевают в пробирку с жидкой и в несколько пробирок (5-10) — с агаровой питательной средой (жидко-пентонный печеночный бульон, мясо-пептонный бульон, глюкозный-глицериновый бульон, альбими-бульон, аналогичные агаровые среды, сывороточнокартофельный агар, сывороточно-декстрозный агар). Бруцеллы хорошо растут на кровяном агаре (5-10%). Жидкий материал высевает на сывороточно-декстрозный агар с индикаторами (рекомендация Объединенного комитета экспертов ВОЗ на бруцеллез): генцианвиолет 1:200 тыс. или кристаллический фиолетовый 1:100 тыс., уксуснокислый натрий (0,25 мг/мл) или п-аминофенилглицерин (0,005-0,007%).

Бруцеллы — аэробы или микроаэрофилы. Температурный оптимум — диапазон — 20-40°C, оптимум pH 6,6-7,4. Микроаэрофильные свойства проявляют *B. abortus* и *B. ovis*. Поскольку не известно, какой вид бактерий 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 (10%). Посевы при исследовании на наличие *B. ovis* инкубируют только в атмосфере CO₂. В первой генерации бруцеллы обладают замедленным ростом, поэтому посевы культивируют, периодически просматривая, до появления колоний. Подготовка и исследование различных материалов имеют некоторые особенности.

При исследовании абортированного плода производят посев тканевого 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 и физиологическим раствором (1:10), гомогенат высевают на среды. Аналогичным образом подготавливают для посева материал, взятый при диагностическом 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 и слоя сливок на селективные среды. Рекомендуется исследовать пробы 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 1:800. 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 Алабими, трипозный бульон, среду Первушина, МПБ с 1% глюкозы и 1% глицерина. Хорошие результаты получаются при посеве на комбинации

ванные 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 грибы (Л.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 появления пигмента. На ППГГА в проходящем свете колонии имеют янтарный оттенок.

При изучении колоний в косопроходящем 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, Вановскому. Клетки бруцелл в культуре не отличаются по морфологии от клеток возбудителя в исходном материале (см. выше), жгутиков не имеют.

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 посевах бактерий, типичных по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам для бруцелл, проводят их серологическую идентификацию. Для целей серологической идентификации используют двухсуспензионные агаровые культуры исследуемых бактерий и диагностические агаровые среды с соответствующими R- и S-сыворотки. На предметном стекле в каплях S- и R-сывороток, физиологического раствора суспензируют бактериологическую палочку испытуемую культуру. Для контроля R-сыворотки проверяют

в разведении, указанном биофабрикой с роз-бенгал и цветным агглютинационным 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, обладают оксидазой (кроме *B. ovis* и *B. neotomae*) и уреазой (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 таблице.

Определение вида и биовара выделенной культуры бруцелл дает возможность более детально проводить эпизоотологический и эндемический анализ.

Разработанные методы дифференциации видов бруцелл предполагают работу с бруцеллами в S-форме (кроме *B. ovis* и *B. canis*), поэтому при проведении 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 каплю взвеси засевают последовательно шпателем на поверхность агаровой среды в трех чашках Петри.

Посевы инкубируют 5 суток при 37-38°C. При таком методе посева в плотной среде вырастает достаточно большое количество изолированных колоний бруцелл. В чашки Петри с колониями осторожно настороженно пипеткой наливают рабочий раствор кристаллвиолета¹ тонким слоем.

... пять минут краситель осторожно отсасывают пипеткой и сливают в ... в дистиллированной воде. Затем колонии изучают при помощи стереоскопического микроскопа.

Дифференцированные колонии имеют цвет от темно-фиолетового до ... S-колонии окрашиваются в светло-желтый, реже — в ... цвет. Для изучения отвивают несколько колоний в ...

Таблица 58 - Дифференциация видов и биоваров рода *Brucella*

| Биовар | B. abortus биовары | | | | | | | | | H. sapiens | B. melitensis | | | B. neotomae | B. ovis | B. suis | | | |
|--------|--------------------|-----|-----|-----|---|-----|-----|---|---|------------|---------------|---|---|-------------|---------|---------|---|---|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | 1 | 2 | 3 | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | (+) | (+) | (+) | (+) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (+) | - | - | - | - | - |
| 2A | - | - | - | - | - | (-) | (+) | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - |
| 3 | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| 4 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | (-) | + | + | + | - | (-) | (-) | - | + | (+) |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

0 - колонии положительные;

1 - колонии отрицательны; (-) - большинство штаммов отрицательны;

1) концентрация красителя 1:50 000;

2) концентрация 1:25 000, при этом биовар 3 растет, а биовар 6 - нет.

Культур бруцелл в S-форме изучают: лизис под действием бруцеллезина, окисление ряда аминокислот, углеводов, потребность в CO₂, образование H₂S, уреазы, рост в средах с тионином, основным фуксином, ингибирование с моноспецифическими сыворотками против антигенов A, B, C.

Определение потребности культур бруцелл первых генераций в

CO₂. В инкубатор (другой герметически закрывающийся сосуд) с посевом ... добавляют через газомер CO₂ до содержания 5 - 10%, либо в сосуд помещают ... чашки Петри с 0,35 г Na₂CO₃ на 1000 мл объема, в эту чашку в наклонном положении помещают пробирку Флоринского с ... на HCl, сосуд закрывают и, наклоняя его, выливают кислоту, что способствует накоплению необходимого количества CO₂ в емкости. Па-

параллельно культивируют посе́вы в условиях обычной атмосферы. Некоторые биовары *B. abortus* могут не требовать CO_2 уже в первой генерации.

Определение образования сероводорода. Испытуемую культуру бруцелл выращивают на скошенном печеночном агаре в пробирках с бумажкой, пропитанной насыщенным водным раствором уксуснокислого свинца. Результаты учитывают через каждые два дня в течение 6 дней.

Оксидативный метаболизм. Испытуемые культуры выращивают на сыворотно-декстрозном агаре 48 часов, смывают фосфатным буфером Соренсена (рН 7,0), трехкратно отмывают центрифугированием и стандартизируют до концентрации, эквивалентной 0,9 МгN/мл по Кьельдалю. Измерение поглощения кислорода проводят объемным респирометром с определением константы Варбурга. Поглощение кислорода выражают в виде микролитров на миллиграмм клеточного азота за час (QO_2N).

Обычно используют следующие субстраты: *α*-аланин, *α*-аспарагин, *α*-глутаминовая кислота, *α*-аргинин, Да-цитруллин, Да-орнитин, *α*-лизин, *αα*-арабиноза, D-галактоза, D-глюкоза, D-рибоза, D-ксилоза, мезо-эритритол. Субстраты готовят в виде 10%-ных (вес/объем) растворов в буфере Соренсена (рН 7,0), стерилизуют фильтрацией, хранят при -20°C . Да-цитруллин стерилизуют при 121°C 15 минут. QO_2N объем вычисляют по методу Варбурга с коррекцией на эндогенное поглощение O_2 .

Определение способности к росту на питательных средах с фенилсином 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 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 среде выращивают 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 1 -2 -3 -4 -5 и 24 часа. На среду засевают одну бактериологическую единицу испытуемой культуры. Результат считается отрицательным, если уреазная активность не проявляется в течение 24 часов. Культуры *B. suis*, *B. melitensis*, *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.

Исследование культур бруцелл в РА с моноспецифическими сыворотками (М, А, R). Моноспецифические сыворотки получают отдельной иммунизацией кроликов соответствующими эталонными штаммами бруцелл с последующей перекрестной адсорбцией агглютининов этими же штаммами.

Густую суспензию испытуемой культуры бруцелл (~ 2 млрд. мк./мл.), выращенной в течение 48 часов на сывороточно-декстрозном агаре, прогревают при 60° С 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 глицерином (1 мг/мл) и устойчивость к пенициллину при использовании доз 5 ЕД. Культуры вакцинного штамма *B. abortus* N19 не растут на средах с указанными концентрациями тионина и глицерина и чувствительны к пенициллину, в отличие от эпизоотических штаммов.

Определение чувствительности к фагам. Тестируемые культуры бруцелл могут быть в S-форме. Суспензию бруцелл готовят как для РА и засевают стерильным газопом на плотную питательную среду. Тв-фаг стандартизируют в рутинном тесте разведения (RTD) и для титрования берут RTD и делают ИТД. Также используют фаги репрезентативных групп 1-5 Corbell и Ньюман. Отдельные капли фага (~0,25 мкл) наносят на поверхность застывшего агара, инкубируют при 37° С, учет проводят через 24 часа и далее в том же интервалом.

Биопроба

Используется для обнаружения возбудителя в исследуемом материале и для проверки патогенных свойств выделенной культуры. Биопроба является наиболее чувствительным методом выделения бруцелл из материала, если только не предполагается его контаминация посторонней микрофлорой. Биопроба достоверно вероятно при исследовании генитальных выделений животных, стери и т.д.

Наиболее восприимчивы к бруцеллезу морские свинки и белые мыши, но первые удобнее, так как у них легче брать кровь для серологических исследований. Морских свинок живой массой 350–400 граммов преимущественно исследуют в РА в разведении сыворотки крови 1:5–1:40. Для опыта берут животных, не имеющих бруцеллезных антител. Заражение проводят подкожно со стороны внутренней поверхности бедра. Заражают двух морских свинок. Тканевый материал измельчают в стерильной физиологическом растворе 1:10, удаляют грубые частицы путем центрифугирования (1000 об/мин, 5–7 минут), морской свинке вводят 1 мл надосадочной жидкости. Молоко (20 мл) центрифугируют 10 минут при 1000 об/мин и вводят весь осадок и сливки двум морским свинкам. Содержимое 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 реагирующих животных 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, кольцевая реакция с молоком, реакция диффузионной преципитации.

Пробирочная реакция агглютинации. Используют при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота, швец, 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 «проникновения». Сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей, собак, пушных зверей, верблюдов разводят 0,85%-ным раствором натрия хлорида с 0,3% 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

Этой схемой (технику постановки и учета результатов РА см. в разделе «Иммунологические реакции»). В качестве контролей параллельно исследуют также только 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 овец и коз исследуют через три-четыре недели повторно.

Низкими титра результаты пробирочной РА выражают в международных единицах (МЕ). В разных странах готовят антигены, различающиеся по активностнабильности, 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 бруцеллезных антител, а вторая сыворотка, давшая титр 1:400, содержит $1000 \times 400 : 500 = 800$ МЕ и т.д. В настоящее время в странах разработаны национальные стандартные бруцеллезные сыворотки, соответствующие по активности международной сыворотке. В РФ в соответствии с «Наставлением по диагностике бруцеллеза животных» (2000) приняты следующие критерии оценки РА в МЕ. Реакцию считают положительной у вакцинированного крупного рогатого скота, верблюдов, лошадей, а также иммунизированных неагглютиногенными вакцинами при наличии 100 МЕ антител (сомнительной — 50-100 МЕ); у овец и коз — 100 МЕ; оленей и собак — 50 МЕ; пушных зверей и морских свинок — 10 МЕ. РА считают сомнительной у овец, коз, оленей, собак этой группы на уровне 10-50 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 агглютиногенными вакцинами, животных с уровнем антител не более 200 МЕ предполагает через 15-30 суток их повторное исследование. Если при повторном исследовании наблюдают повышение уровня антител, то животных признают больными. При отсутствии повышения дополнительными методами 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,

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 последнем случае 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 эмальрованных пластинках с лунками при температуре не ниже 18°C. Исследуемые сыворотки в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки, затем в лунку рядом с сывороткой помещают при исследовании крупного рогатого скота, лошадей, 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 pH, при которых нормальные антитела с низкой авидностью 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

животных, сомнительно реагирующих исследуют повторно через 15-30 дней 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 овец на рынках.

В РФ, в соответствии с «Наставлением по диагностике бруцеллеза животных», реакцию и оценку результатов проводят следующим образом. В титровочные пробирки 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:

| | | |
|----|---|-------------------------|
| 4+ | Четко выраженное синее кольцо в верхней части столбика молока в слое сливок, молоко белое | Результат положительный |
| 3+ | Достаточно выраженное синее кольцо в слое сливок, остальная часть молока имеет синеватый цвет | Результат положительный |
| 2+ | Слабо кольцо в слое сливок выражено слабо, столбик молока имеет синий цвет | Результат сомнительный |
| 1+ | Столбик молока равномерно окрашен в синий цвет, слой сливок белого или желтоватого цвета | Результат отрицательный |

3Р на 2-3 креста считают положительной, 1 крест — сомнительной. При положительной КР от всех животных стада берут кровь для исследования в РА или РСК (РДСК) или РА и РИД. Если получают их отрицательный результат, то независимо от позитивной КР животных признают здоровыми.

Реакция связывания комплемента (РСК, РДСК). Данную серологическую реакцию применяют для диагностики бруцеллеза практически у всех видов животных. Согласно «Наставлению по диагностике бруцеллеза животных» исследуемые сыворотки крови крупного рогатого скота для РСК инaktivируют разведенными 1:5 в водяной бане в течение 30 минут при 60-62°С; сыворотки крови ослов, мулов при 64-65°С; буйволов — 62-64°С; свиной — 60-62°С 50 минут; при постановке РДСК 30 минут при 64°С. Используют единый бруцеллезный антиген в рабочем титре, ге-

молизин для РСК в удвоенном титре, для РДСК — в утроенном, 2,5%-ную 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 1:5 или 1:10 (технику постановки и учета результатов см. в разделе «Серологические реакции»).

При исследовании сывороток в одном разведении (1:5) и задержке гемолиза 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 из 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 и благополучных по бруцеллезу стадах ранее вакцинированного крупного рогатого 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 и 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 200 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 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

... 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 штапом 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 коспрохоном свете через 24 и 48 часов. Как положительный результат оценивают 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 результат реакции признают положительным.

Питательные среды

Печеночно-сывороточный или печеночно-аминопептидный агар.

Готовят печеночный отвар: 500 г свежего фарша говяжьей печени смешивают в 300 мл воды, кипятят 1 час, фильтруют через ватный фильтр, стерилизуют в автоклаве, смешивают равные объемы печеночного отвара и дистиллированной воды, добавляют 1% пептона, 0,5% натрия хлорида, 2% агара. На 1000 мл смеси вносят 17 мл 10%-ной двууглекислой соды, 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) и разливают по чашкам или пробиркам. Также готовят полужидкие агары, добавляя 0,15-0,2% агара-агара. Рекомендуют среды данного типа для культивирования *B. ovis*.

Печеночный агар Хеддльсона.

В 500 мл воды вносят 10 г пентона, натрия хлорида, 20 г агара-агара, автоклавируют 30 минут, добавляют 100 мл печеночного отвара, охлаждают до 60° С, устанавливают рН 7,0. К 100 мл добавляют один яичный белок, автоклавируют 30 минут при

120° С, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают рН 7,0, разливают по емкостям и стерилизуют 30 минут при 115° С.

Плотный печеночно-глюкозо-глицериновый агар (ППГГА). 400 г 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% агара и 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 вносят 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 бактериостатическом методе дифференциации бруцелл. ППГГБ готовят так же, но агар не добавляют.

Сывороточно-декстрозный агар. К 835 мл дистиллированной воды добавляют 15 г агар-агара, 10 г 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 фильтрованной сыворотку крови лошади или крупного рогатого скота до концентрации 5% 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.

Альбими-агар. В 1000 мл дистиллированной воды добавляют 20 г сухого пептона, 20 мл дрожжевой воды, 5 г натрия хлорида, 20 г агара. Устанавливают рН 7,3, все компоненты растворяют в аппарате Казе, фильтруют через ватный фильтр. Вносят 1 г глюкозы, 0,2 г бисульфита натрия, устанавливают рН 7,2-7,3, 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 в флороформе 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°C, настоей 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°C. 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.

Изменитель среды Альбими. К 1 л дистиллированной воды добавляют 20 г пептона Дифко, 20 мл кожной воды, 5 г натрия хлорида, 20 г кровяного агар-агара или Ц ара Дифко. Устанавливают рН 7,3. Нагревают сразу до расплавления агара, фильтруют через ватный фильтр. В горячую среду добавляют 1 г глюкозы и 0,1 г натрия бисульфата. Корректируют рН до 7,2-7,3. Разливают в колбы или пробирки, стерилизуют 30 минут при 110° С.

Для приготовления дрожжевой воды в 1 л дистиллированной воды стерилизуют 1 кг пекарских (хлебных) дрожжей, кипятят 5-10 мин, фильтруют через плотный фильтр. Хранят в темном месте под хлороформом не более 2 недель.

Усовершенствованные среды для выделения бруцелл из молока и других материалов (рецепты фирмы Oxoid)

К расплавленному и охлажденному до 55-60°C агаровым средам (сывороточно-декстрозный или кровяной агара с 5% лошадиной сыворотки и 1% желатин) добавляют следующие антибиотики (из расчета на 1 л среды): полимиксина В — 500 ИЕ, бацитрацина — 25 000 ИЕ, циклогексимид — 100 мг, налидиксовой кислоты — 5 мг, нистатина — 100 000 ИЕ и ванкомицина — 20 мг. Антибиотики суспендируют в 10 мл метанола. Вносят суспензию в среду и тщательно перемешивают.

Картофельный агар Корнеевой. 500 г очищенного, нарезанного ломтиками картофеля варят в 1000 мл водопроводной воды. Отвар фильтруют через вату, доливают до 1000 мл, вносят 5 г натрия хлорида, 10 г пептона, 10 г глицерина, 10 г глюкозы, 20 г агар-агара для пробирок и 30 г для колб. Смесь нагревают до расплавления, отстаивают в теплом месте, нижней частью в 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 насыщен- ный раствор генцианвиолета до конечной концентрации 1:100 000. Среда рекомендуется для выделения бруцелл из молока.

Среда Первушина для выделения гемокультур. Мясопептонный бульон с 1% глюкозы и 4% глицерина разливают в колбы по 100 мл, засыпают в колбу 0,5 г стерильной гигроскопической ваты. Стерилизуют и 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, среднеазиатский, голарктический. Последний подвид дифференцируется на три биовара: японский, I Egys (эритромицинчувствительный) и II Egys (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, носороги и 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° С - -70° С), в случае необходимости можно консервировать в 30%-ном стерильном растворе глицерина.

Микроскопические 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 грамтрицательные полиморфные, мелкие (0,2x0,2-0,7 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 палочкой прямым или косвенным 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 питательных сред — 6,8-7,3, требователен к питательным средам. На обычных МПА и МПВ возбудитель не растет.

Выделить культуру возбудителя методом прямого посева на питательные среды удается редко. Обычно исследуемым материалом заражают 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, кровяной 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 извилистого 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, выпуклых, с матовой блестящей поверхностью колоний беловатого цвета.

На кровяных средах через 2-4 дня колонии достигают максимального роста, 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 граммотрицательные, чаще кокковидные. В отличие от клеток в животных тканях, в мазках из жидких культур имеют форму изогнутых палочек с закругленными концами, иногда нитей. При специальных методах окраски выявляется капсула. Подвижности не обладают, но из-за мелких размеров имеют выраженное «бриуновское движение».

Идентификация возбудителя на родовом уровне. Франциселлы имеют некоторое морфологическое сходство с рядом граммотрицательных 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 нистеине или цистине, способность к расщеплению углеводов, образованию оксидазы, 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 пастерелл и иерсиний (*Y. pestis* в первую очередь). Франциселлы являются, как и бруцеллы, аэробами. Имеют, в отличие от иерсиний, температурный оптимум $37^\circ C$, требуют для роста цистин и цистин, чем отличаются от бактерий указанных родов. Франциселлы расщепляют углеводы только на специальных средах с углеводами (среды Гисса не годятся), 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. tularensis*, но не растут культуры других биоваров *F. tularensis*. Также обязательно проводят культивирование выделенной культуры на среде с нистеином или цистином, на агаре Мак-Конки, в МПБ с 6% NaCl. Увеличивают размер образующихся колоний, *F. tularensis* требует для роста

они и/или цистеин. Исследуют образования кислоты из мальтозы, сахарозы, глицирина, 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-Конки 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 разведению сыворотки в объеме 0,5 мл добавляют 0,5 мл микробной взвеси. Пробирку выдерживают 2 часа при 37° С и 20-22 часа при комнатной температуре. Культура туляремийного 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*¹

| Тесты | подвид неарктический | подвид голарктический | подвид <i>novicida</i> |
|--|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Рост на простых средах | - | - | + |
| Ростовость в цистине и в цистине | + | + | - |
| Рост на среде Мак-Конки | - | - | варьирующий показатель |
| Скорость колоний на кровя- ной среде с глюкозой и глицерином (5 мм в диаметре) | - | - | + |
| Образование кислоты из: | | | |
| глюкозы | - | - | + |
| сахарозы | + | - | + |
| мальтозы | + | + | - |
| глицерина (ММ) с 6% NaCl | - | - | варьирующий показатель |
| ММ для кроликов при инъекции заражении (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 патогенные 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 возбудителя 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 подщелочить до pH 7,0-7,2 (зеленый цвет с бромтимоловым синим). В целях 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 казеина — 10 мл, аутолизата дрожжей -2,5 мл, хлористого натрия — 0,3 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% дефибринированной 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 — 30 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 — 30-30%, гидролизат желатины — 10%, дрожжевой аутолизат — 1-5%, 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 или 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, мясной экстракт — 300 г; пептон (BBL) — 17,5 г; крахмал — 1,5 г; агар — 17 г; дистиллированная вода — 1000 мл. Среду разливают по 25 мл в колбы, автоклавируют 15 минут при 121° С, охлаждают до 50° С, добавляют в каждую колбу по 0,25 мл смеси антибиотиков V-C-N Inhibitor (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 тиамин (Difco) — 20,0; солянокислый цистеин — В; натрия тиоглюконат — 10,0; глюкоза — 10,0; агар — 10; смешивают все МПоненты, кроме агара, регулируют pH 7,2, добавляют агар и расплавляют, автоклавируют при 121° С в течение 20 минут, охлаждают до 45-48° С, добавляют 50 мл дефибрированной крови кролика и разливают в шики Петри.

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 возбудителя 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 подщелочить до pH 7,0-7,2 (зеленый цвет с бромтимоловым синим). В целях 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 пивных дрожжей — 10 мл, аутолизата дрожжей -2,5 мл, хлористого натрия — 0,1 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% дефибринированной крови кролика, разлитую в пробирки и скашивают либо разливают в чашки Петри.

Мартеновский дрожжевой агар. Мартеновского бульона — 0,1 г, дрожжевого аутолизата — 70 мл, глюкозы — 10 г, цистина — 1 г, хлористого калия — 0,4 г, хлористого натрия — 3 г, двууглекислой соды — 0,1 г, сернистого магния -0,3 г, двуосновного фосфорнокислого натрия — 0,8 г, едкого натра 5% (раствор добавлять до pH 7,2 -7,4), агар-агара — 30 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 Дрожжевой. 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 — 10,40%, гидролизат желатины — 10%, дрожжевой аутолизат — 1,5%, желатина — 1,5%, хлористый натрий — 0,5%, глюкоза — 1%, цистин — 0,1%; рН среды 7,2-7,3. Все гидролизаты получают путем ферментативного переваривания при добавлении поджелудочной железы или панкреатина. Гидролиз ведут до получения аминного азота от 600 до 800 мг%.

Среда Френсиса. К МПА с 1% пептона и 0,5% NaCl (рН 7,3) добавляют 0,1% цистина и глюкозы. Сразу кипятят несколько минут, охлаждают до 50° С и вносят 10% дефибрированной крови кролика.

Гелевая среда Тейера—Мартина. Агар (BBL) — 38 г, мясной экстракт — 300 г; пептон (BBL) — 17,5 г; крахмал — 1,5 г; агар — 17 г; дефибрированная вода — 1000 мл. Среду разливают по 25 мл в колбы, автоклавируют 15 минут при 121° С, охлаждают до 50° С, добавляют в каждую колбу по 0,25 мл смеси антибиотиков V-C-N Inhibitor (BBL) (ванкомицин, колистин, нистатин), размешивают, разливают по чашкам Петри. В данной среде можно выделить *F.tularensis* из смешанной культуры.

Среда для выделения *F.tularensis* (г/л). Триптазный бульон с гиамидом (В) — 20,0; солянокислый цистеин — В; натрия тиоглюконат — 10,0; желатина — 10,0; агар — 10; смешивают все МПоненты, кроме агара, добавляют рН 7,2, добавляют агар и расплавляют, автоклавируют при 121° С в течение 20 минут, охлаждают до 45-48° С, добавляют 50 мл дефибрированной крови кролика и разливают в шпикеты Петри.

Пептон-цистеиновый агар (г/л). Бакто-пептон (Difco)—20,0, натрий хлорид — 10,0, глюкоза — 1,0, солянокислый цистеин — 1,0, агар — 20,0; смешивают компоненты кроме агара, устанавливают рН 6,8, 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, рН 7,2. Раствор Б: агар — 15 г, расплавленный 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). Среду стерилизуют при 121° С в течение 20 минут и добавляют тот или иной стерилизованный фильтрованием углевод до конечной концентрации 1%, разливают по 5 мл в пробирки и смешивают. При исследовании сахаролитических свойств испытываемую 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, пневмонию и атрофический ринит свиней. *P. multocida* серовара А у крупного рогатого скота участвует в развитии пневмонии телят, иногда — маститов коров, у овец этот серовар пастерелл является причиной пневмоний и маститов, у свиней — пневмоний (часто как первичный агент), у кроликов — плевропневмоний (заразного насморка), генитальных инфекций, у птиц — «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 пнев-

рачки» 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 селезенки, печени, почек, сердце с перевязанными сосудами, лимфатические узлы, тубчатая кость. Трупы мелких животных направляют в лабораторию целиком. В случае поражения легких берут фрагменты на границе здоровой и пораженной ткани, экссудат из грудной полости, регионарные лимфатические узлы, миндалины. Прижизненно для исследования берут гной, экссудат, пробы со слизистой носовой полости, молоко от животных с маститом. Материал транспортируют в лабораторию в термосе со льдом, тубчатую кость обертывают марлей или ватой, смоченной 5-10%-ным формалином. Фрагменты органов можно пересылать в 30%-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 препаратах окраска видна как короткие, с закругленными концами (овоидные) Грамотрицательные 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 бактерий окрашиваются лучше. Достаточно характерно биполярное окрашивание пастерелл, но следует иметь в виду, что ряд энтеробактерий, атакуемых актинобациллами проявляют склонность к биполярной окраске. Для выявления биполярности рекомендуется окрашивать мазки водно-спиртовым раствором пиоктанина в течение 1 минуты с подогреванием при отхождении паров. Микроскопическая картина: фон светло-синий, По-

люса клеток темно-синие, центр клетки не окрашен. Приготовление раствора пиктоанина: пиктоанина — 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 при 42°С, оптимум рН питательных сред 7,2–7,4. Для первичного культивирования используют обычные МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, но лучше — обогащенные среды: кровяной, сывороточный агар и бульон. 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 селективную 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 образование наряду с колониями S-формы шероховатых колоний R-формы.

P. haemolytica при росте на жидких питательных средах вызывает равномерное помутнение, обычно без формирования пристеночного осадка. 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 крупного барана гемолитические свойства обнаруживаются только после свертывания колонии с поверхности питательной среды.

Морфология клеток пастерелл в культуре. В мазках из культуры клетки пастерелл обычно полиморфны, выглядят как мелкие грамотрицательные 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 отрывочны, 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 | | | |
|---|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>Actinobacillus</i> | <i>Haemophilus</i> | <i>Pasteurella</i> | <i>Yersinia</i> |
| Цветность колонии | + | - | - | - |
| Выживаемость при 22° С | - | - | - | Р |
| Угнетение | Р | Р | + | + |
| Гемолитичность | Р | Р | Р | - |
| Ферментация | + | + ¹⁾ | + | + |
| Рост на агаре Мак-Конки | + | - | Р | + |
| Рост на нитрате (37°С) | - | Р | - | + |
| Рост фазиса Проскауера | Р | н.д. | - | - |
| Рост на среде с 0,5% NaCl | - | - | - | + |
| Колонизация с образованием инвазивных колоний | | | | |
| Слизистая колония | + | + | + | + |
| Результативность | + | Р | + | + |
| Слизистая колония | + | Р | Р | Р |
| Слизистая колония | - | - | - ²⁾ | - |
| Слизистая колония | - | - ²⁾ | Р | Р |
| Слизистая колония | - | - ²⁾ | - | - |
| Слизистая колония - 80 | - | - | - | Р |
| Титр ДНК, моль-% | 40-43 | 38-44 | 40-45 | 46-50 |

1) отмечено — *H. haemoglobinophilus*;
 2) отмечено — *P. multocida* и *P. haemolytica*;
 3) отмечено — *H. aphrophilus* и *H. parasuis*;
 4) отмечено — *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 на способность к росту на агаре Мак-Конки, образовывать бета-гемолитический, оригитин-декарбоксилазу, уреазу, индол, кислоту из глюкозы, лактозу, сахарозу, мальтозу, маннита. Биохимическую идентификацию можно проводить при помощи тест-системы API20 NE (Bio Merieux) и др.

люса 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 при 42°С, оптимум рН питательных сред 7,2–7,4. Для первичного культивирования используют обычные МПА, МПБ, бульон и агар Хоттингера, но лучше — обогащенные среды: кровяной, сывороточный агар и бульон. 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 селективную 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. Культурой *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 осадка. На плотных средах через 24 часа культивирования формирует крупные 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 крупного рогатого скота гемолитические свойства обнаруживаются только после 48 часов инкубации колонии с поверхности питательной среды.

Морфология клеток пастерелл в культуре. В мазках из культур клеток пастерелл обычно полиморфны, выглядят как мелкие грамнегативные 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 | | | |
|--|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>Actinobacillus</i> | <i>Haemophilus</i> | <i>Pasteurella</i> | <i>Yersinia</i> |
| Плотность колоний | + | - | - | - |
| Устойчивость при 22° С | - | - | - | P |
| Устойчивость к окислению | P | P | + | + |
| Устойчивость к ферментации | P | P | P | - |
| Устойчивость к фаталину | + | + ¹⁰ | + | - |
| Рост на агаре Мак-Конки | + | - | P | + |
| Устойчивость к перитриг (37°С) | - | P | - | + |
| Тест Фогта-Проскауера | P | нд. | - | - |
| Рост на среде с 0,5% NaCl | - | - | - | + |
| Устойчивость к окислению с образованием пигмента | | | | |
| <i>actinobacillus</i> | + | + | + | + |
| <i>multocida</i> | + | P | + | + |
| <i>haemolytica</i> | + | P | P | P |
| <i>parvus</i> | - | - | - ²⁰ | - |
| <i>argrophilus</i> | - | - ²¹ | P | P |
| <i>parasuis</i> | - | - ²¹ | - | - |
| Устойчивость к высушиванию - 80 | - | - | - | P |
| % ДНК, моль% | 40-43 | 38-44 | 40-45 | 46-50 |

actinobacillus — *H. haemoglobinophilus*; P — признак различен в таксонах рангов (виды рода, семейства); нд — нет данных
multocida — *P. multocida* и *P. haemolytica*;
argrophilus — *H. argrophilus* и *H. parasuis*;
parasuis — *H. parasuis*

Идентификация пастерелл на уровне вида

Для видовой дифференциации пастерелл рекомендуется исследовать у представителей способность к росту на агаре Мак-Конки, образовывать бета-галактозидазу, орнитин-декарбоксилазу, уреазу, индол, кислоту из глюкозы, сахарозы, мальтозы, маннита. Биохимическую идентификацию можно проводить при помощи тест-системы API20 NE (Bio Merieux) и др.

Таблица 71 - Основные дифференцирующие признаки видов рода *Pasteurella*

| Вид пастерелл | Признаки | | | | | Кислота (24-48 ч.) | | | | |
|-------------------------|----------|-------------------------|-------|-------|------------------------|--------------------|---------|----------|----------|--------|
| | Гемолиз | Рост на агаре Мак-Конки | Индол | Уреаз | Орнитин декарбоксилаза | 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. dagmatis</i> | - | - | + | + | - | +* | - | - | + | - |
| <i>P. caballi</i> | - | - | - | - | +/- | +* | + | н. | (+) | + |
| <i>P. aerogenes</i> | - | + | - | + | (+) | +* | (-) | + | + | - |
| <i>P. gallinamm</i> | - | (-) | - | - | +/- | + | - | + | + | - |

(+) — преимущественно положительный результат; (-) — преимущественно отрицательный результат; +* — газ и кислота из глюкозы; нд — нет данных; ¹⁾ *P. avium* требует для роста 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 полисахарида (полисахарид), в соответствии с чем *P. multocida* подразделяют в РИГА 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 РИГА, из-за отсутствия коммерческих реагентов, пока недоступна. Поэтому прибегают к несерологическим методам, основанным на особенностях клеток пастерелл.

Поскольку серовар Е встречается в Африке, а серовар F выделен в Европе, то реально речь идет об установлении сероваров А, В и D. У исследуемую культуру пастерелл засевают на агар Хоттингера в инкубаторе

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 обычно сопряжено с хорошо выраженной гемолитической активностью.

Таблица 72 - Критерии дифференциации подвидов *P. multocida*

| Подвид | Ферментация | | | | |
|---|-------------|-----------|---------------------|--------|---------|
| | Трегалоза | Д-Ксилоза | α -Арабиноза | Сорбит | Дульцит |
| <i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i> | V | V | - | + | - |
| <i>P. multocida</i> subsp. <i>parva</i> | + | + | - | - | - |
| <i>P. multocida</i> subsp. <i>solitaria</i> | - | + | V | + | + |

V — варьирующий признак.

Посевы инкубируют при 37° С в течение 18-24 часов и просматривают в проходящем пучке света в стереоскопическом микроскопе МБС-1.

Биовары *P. multocida* серовара А, из-за расщепления гиалуронидазой сферококка гиалуроновой кислоты в капсуле пастереллы, в отличие от сероваров В и D, тусклые, имеют серый или голубой цвет и не агрегируют.

Если испытуемая культура не относится к серовару А, то ее исследуют триафлавиновой пробой, 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 триафлавина (триафлавин) 1:1000. Компоненты перемешивают и выдерживают 10-20 минут при комнатной температуре. Если взвесь бактерий стабильна, культуру относят к серовару В, выпала в осадок — к серовару D.

Таблица 73 - Критерии дифференциации биоваров *P. haemolytica*

| Биовар | Биовары | |
|-------------|---------|---|
| | А | Т |
| Биовары из: | | |
| А | + | - |
| Т | + | - |
| Д | - | + |

| 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 данном способе заражения удастся определить наличие вирулентных штаммов *P. multocida*. За животными наблюдают в течение недели. При проверке патогенных свойств выделенных культур *P. multocida* суспензией бульонной 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 П — в пределах семи суток. Патогенность культур, выделенных от птиц, проверяют на мышах или цыплятах. В последнем случае используют 90-дневных цыплят, которым культуру в дозе 0,1 мл вводят внутримышечно. Культуры *P. haemolytica* вызывают гибель белых мышей только при внутрибрюшинном заражении. Апробирована ПЦР для детекции *P. multocida* в материале.

Питательные среды

Элективная питательная среда для первичной изоляции *P. multocida* — расщавленному и остуженному до 45°C агару Хоттингера добавляют клиндамицин из расчета 2 мкг/мл, среду разливают по чашкам Петри.

Модифицированная элективная питательная среда Морриса — к вянному агару с 5% крови овцы или крупного рогатого скота добавляют селективные компоненты в одной из следующих комбинаций: а) пенициллин

— 0,0025, теллурид калия — 0,0025, тиротрицин — 0,01, актидион — 0,1; б) неомицин — 0,0015, новобиоцин — 0,002, актидион — 0,1 (г/л).

Лабораторная диагностика гемофилезного полисерозита

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) — инфекционная болезнь поросят, проявляющаяся генерализованным серозно-фибринозным воспалением серозных оболочек (плевра, перикард, брюшина), менингитом, артритом. У свиней более старшего возраста вызывает артриты и пневмонию или выступает как секундарный агент при энзоотической (свиноглазковой) пневмонии. Возбудитель — бактерия *Haemophilus parasuis*, относящаяся к роду *Haemophilus* семейства *Pasteurellaceae*. Распространено носительство *H. parasuis* у клинически здоровых свиней. Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Гигиенично отбирают серозно-фибринозный экссудат из перитонеальной, плевральной, перикардальной полостей, пораженных суставов, при наличии симптомов поражения — ЦНС-фрагменты тканей головного мозга, при наличии пневмонии — кусочки легких на границе пораженной паренхимы. Материал транспортируют в термосе со льдом.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и определяют методами для выявления капсул. В патологическом материале возбудитель располагается в виде одиночных мелких грамотрицательных диплококков бактерий, иногда небольшими скоплениями, короткими цепочками, клетки имеют капсулу.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Выращивание. *H. parasuis* — факультативный аэроб, температура optimum 37-38°C, рН 7,2-7,4. На обычных средах возбудитель не растет, требует добавления в среду готового фактора роста — V-фактор (никотинамидаденин-динуклеотид или NAD-фосфат NADP). В качестве источника V-фактора используют дрожжевой экстракт, ферментативный источник NAD (NADP), гретую кровь барана (лошади) или растущую культуру «бактерий-кормилок», которая при этом выделяет в окружающую среду V-фактор, что обеспечивает возможность роста вокруг колоний «бактерий-кормилок» спутанных мелких колоний *H. parasuis*. Сте-

| 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 данном способе заражения удается определить наличие вирулентных штаммов *P. multocida*. За животными наблюдают в течение недели. При проверке патогенных свойств выделенных культур *P. multocida* суточную бульонную культуру 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 В — в пределах семи суток. Патогенность культур, выделенных от птиц, проверяют на мышях или цыплятах. В последнем случае используют 6-7-дневных цыплят, которым культуру в дозе 0,1 мл вводят внутримышечно. Культуры *P. haemolytica* вызывают гибель белых мышей только при трибрюшинном заражении. Апробирована ПЦР для диагностики *P. multocida* в материале.

Питательные среды

Элективная питательная среда для первичной изоляции *P. multocida* — расплавленному и остуженному до 45°C агару Хоттингера добавляют клиндамицин из расчета 2 мкг/мл, среду разливают по чашкам Петри.

Модифицированная элективная питательная среда Морриса добавляют к вянущему агару с 5% крови овцы или крупного рогатого скота следующие селективные компоненты в одной из следующих комбинаций: а) 100

ны 0,0025, теллурид калия — 0,0025, тиротрицин — 0,01, актидион — 0,1, б) нисомидин — 0,0015, новобиоцин — 0,002, актидион — 0,1 (г/л).

Лабораторная диагностика гемофилезного полисерозита

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) — инфекционная болезнь поросят, проявляющаяся генерализованным серозно-фибринозным воспалением серозных оболочек (плевра, перикард, брюшина), менингитом, артритами. У свиней более старшего возраста вызывает артриты и пневмонии или выступает как вторичный агент при энзоотической (гемоглазмозной) пневмонии. Возбудитель — бактерия *Haemophilus parasuis*, относящаяся к роду *Haemophilus* семейства *Pasteurellaceae*. Распространено носительство *H. parasuis* у клинически здоровых свиней. Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Гигиенично отбирают серозно-фибринозный экссудат из перитонеальной, плевроперикардиальной, 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 применяют методы для выявления капсул. В патологическом материале возбудитель располагается в виде одиночных мелких граммотрицательных палочковидных бактерий, иногда небольшими скоплениями, короткими цепочками, клетки имеют капсулу.

Выращивание и идентификация культуры возбудителя

При активировании. *H. parasuis* — факультативный аэроб, температурный оптимум 37-38°C, pH 7,2-7,4. На обычных средах возбудитель не растет. Требуется добавление в среду готового фактора роста — V-фактор (витамин никотиноамидаденин-динуклеотид или NAD-фосфат NADP). В качестве источника V-фактора используют дрожжевой экстракт, энзиматически синтезированный NAD (NADP), густую кровь барана (лошади) или растущую 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*. Сте-

рильные дрожжевой экстракт и чистый NAD добавляют в МПА, МПВ, 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 первичного выделения возбудителя лучше всего использовать кровяной агар (5-10% дефибринированной крови барана, лошади, кролика) с «бактерийно-кормилкой». При исследовании контаминированного материала применяют среды Controni.

Кровяной агар слегка подсушивают. Исследуемый материал засеивают шпателем (бактериологической петлей) по всей поверхности среды. Затем по диаметру чашки в виде двух прямых линий под углом 90° засеивают 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 засеивают 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» (интенсивной 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 пассажирования возбудителя на питательных средах в результате дисперсии колонии могут терять свойство флуоресценции.

В жидких питательных средах (бульон Левинталя, сывороточный 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 Гинсу, 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 на среде с 0,5% NaCl, агаре Мак-Конки, образовывать каталазу, оксидазу, фосфатазу, ферментировать глюкозу, дульцит, гидролизовать твин-80. На практике идентификацию возбудителя, исходя из патолого-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 (свинья), *H. parasuis* приходится дифференцировать от NAD-зависимых культур *Aerobacillus 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 10 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 |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Уреазы | - | + |
| β-гемолиз | - | + |
| САМР-тест ¹⁾ | - | + |
| альфа-фукозидаза | + | - |
| Образование кислоты из: | | |
| Д-ксилозы ²⁾ | - | + |
| Д-маннита | - | + |

¹⁾— методика САМР-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 актинобациллезной 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 полостей 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 мате-

рода *H. paragailinarum* имеет форму небольших, нередко коккоподобных грамтрицательных палочек, окруженных капсулой.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37-38°C, pH 7,2-7,6, проявляет потребность при культивировании в NAD, сыворотке крови (лучше использовать куриную сыворотку), повышенном содержании CO₂ в атмосфере.

Исследуемый материал высевают на 10%-ный кровяной агар в чашках Петри (серьез овец, кролика, курицы, крупного рогатого скота) с последующим посевом «культуры-баккормилки» (стафилококк, кишечная палочка). Можно использовать кровяной агар Левинталя, сывороточно-дрожжевой агар. Поскольку материал обычно контаминирован сопутствующей 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 вокруг центра питающей культуры мельчайшие сателлитные, негемолитические колонии. На «шоколадном агаре», агаре Левинталя и сывороточно-дрожжевом агаре через 48 часов культивирования возбудитель формирует круглые, выпуклые, с гладкой поверхностью, полупрозрачные, сероватые, 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 подозрительных колоний, бульонных культур клетки *H. paragailinarum* имеют форму коккобактерии, полиморфных палочек, нитей, грамтрицательные, эллипсоид. При окраске по методу Гинса или другими методами обнаруживается капсула.

Идентификация *H. paragailinarum* на уровне рода и вида. Для окончательной выделенной культуры к роду *Haemophilus* используют те же критерии, что и для *H. parasuis*. Основную сложность в процессе идентификации представляет дифференциация *H. paragailinarum* и *Pasteurella avium* (прежнее наименование *Haemophilus avium*). *P. avium* по морфологическим, тинкториальным, культуральным признакам сходна с *H. paragailinarum* 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, фосфатазу, окислять трегалозу, галактозу, мальтозу, маннит, сорбит, сахарозу, способность для кур (см. табл. 75).

Таблица 75 - Дифференциальные признаки *H. paragallinarum* и *P. avium*

| Признаки | <i>H. paragallinarum</i> | <i>P. avium</i> |
|---|--------------------------|------------------|
| Потребность в NAD | + | D |
| Каталаза | - | + |
| Фосфатаза | + | - |
| Потребность в сыворотке крови | + | - |
| Интенсивность роста на питательных средах | скудный рост | интенсивный рост |
| Образование пигмента (чаще желтого) | - | + |
| Образование кислоты из: | | |
| Д-маннита | + | - |
| Д-галактозы ²⁾ | - | +(медленно) |
| мальтозы | + | - |
| Д-сорбита | + | - |
| сахарозы | + | - |
| трегалоза | - | + |
| Патогенность для кур | + | - |

d— 21 -79% штаммов положительные.

¹⁾ слабая реакция.

²⁾ для роста возбудителя необходимо добавлять в среду NAD (10 мкг/мл) или дрожжевой экстракт (10%).

От других видов пастерелл *H. paragallinarum* легко отличить по потребности в NAD. Этот признак исследуют посевом культуры на сывороточный или кровяной агар с последующим высевом «баккорминки» или нанесением на поверхность питательной среды бумажного диска, пропитанного NAD (10 мг/мл). Через 24 часа инкубирования сателлитный рост дают только культуры *H. paragallinarum* и *P. avium*, остальные пастереллы и другие родные виды бактерий растут с одинаковой интенсивностью по всей поверхности питательной среды (NAD-зависимость отсутствует).

Серологическая идентификация *H. paragallinarum*

Вид антигенно неоднороден, подразделяется в РА на ряд сероваров. Биопромышленность РФ соответствующие диагностические сыворотки не выпускает.

Биопроба. Применяют для определения патогенных свойств выделенной культуры NAD-зависимых бактерий. Культуру выращивают в желатинном мешке 6-7-дневных развивающихся куриных эмбрионов или на оптимальной плотной питательной среде. Биопробу проводят на 2-3 эмбрионах здоровых вях восприимчивого возраста. Содержимое желатинного мешка вводят курам интраназально в дозе 0,1-0,2 мл. Клинические признаки болезни выявляются через 24-48 часов, но иногда инкубационный период составляет 6-7 суток.

Питательные среды такие как и при лабораторной диагностике актинобациллезной пневмонии свиней.

Лабораторная диагностика актинобациллезной пневмонии свиней

Актинобациллезная пневмония свиней - инфекционная болезнь свиней преимущественно двух-трехмесячного возраста и откормочных животных, характеризуется развитием фибринозногеморрагической секретизирующей пневмонии и фибринозного плеврита. Возбудитель — грамотрицательная бактерия *Actinobacillus pleuropneumoniae*, относящаяся к роду *Actinobacillus*, семейства *Pasteurellaceae*.

Лабораторная диагностика основывается на результатах бактериологического исследования. Серологические реакции используют как Методы групповой диагностики для оценки эпизоотической ситуации.

Бактериологическое исследование

Для исследования стерильно отбирают фрагменты пораженной легочной ткани на границе с нормальной тканью, а также средостенные лимфатические узлы, экссудат из грудной полости, пораженную легочную камеру. Материал транспортируют в термосе со льдом или в замороженном виде.

Микроскопическое исследование исходного материала

Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из методов для выявления капсул. В положительных случаях в препарате обнаруживают грамотрицательные, вплоть до кокковидных, грамотрицательные палочки с закругленными концами, чаще располагающиеся парно, единично, реже — в виде коротких цепочек, обладают капсулой. Типичные по морфологии актинобактерии 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, рН 7,2-7,4. Известны два биовара возбудителя: 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 (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 полисеринат поросят»). Можно высевать материал на агар Левинтала, «пикококковидный» и сывороточно-дрожжевой МПА и МПБ с 5% сыворотки крови крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта. Контаминирующийся сопутствующей 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 источника ростового фактора дисков с ДПН, «бактерии-кормилки», рост *A. pleuropneumoniae* 1-го биовара наблюдается в виде сателлит-нах 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 шире 1,5-3 см. Колонии на кровяном агаре окружены четкой зоной β -гемолиза. На сывороточно-дрожжевом МПА, агаре Левинтала, «пикококковидном» 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 слипшаяся. В последнем случае бактериальная масса с трудом снимается ватным тампоном с поверхности плотной питательной среды и плохо суспендируется в 0,85%-ном растворе натрия хлорид. Нередко возбудитель образует колонии «резиноподобной» консистенции. Молодые культуры *A. pleuropneumoniae* в косопроходящем пучке света при просмотре невооруженным глазом флуоресцируют, в микроскопе МБС-10 имеют изумрудно-зеленое свечение с медно-красным оттенком и легкую концентрическую исчерченность. В жидких питательных средах (бульон Левинтала, сыво-

ственно-дрожжевой МПБ) недиссоциированные культуры растут со сла-
бым равномерным помутнением среды, без образования пристеночного
слоя и поверхностной пленки, через 72 часа на дне пробирки формиру-
ется беловатый осадок (Скородумов Д.И., 1997).

Культуры *A. pleuropneumoniae* 2-го биовара не требуют для своего
роста ДПП, 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
густые, а рост на жидких питательных средах несколько интенсивнее.

Морфология клеток возбудителя в культуре. Из агаровых и буль-
онных культур готовят мазки, окрашенные по Граму, Гинсу (на капсулу),
а также обязательно препарат «раздавленная капля» для выявления по-
движности. Морфология клеток *A. pleuropneumoniae* аналогична таковой у
бактерий в исследуемом материале, но достаточно часто, наряду с палоч-
ковидными клетками (коккобактерии), обнаруживаются короткие ните-
видные формы. В отличие от *B. bronchiseptica* клетки *A. pleuropneumoniae*
по подвижностью не обладают.

Идентификация *A. pleuropneumoniae* на уровне рода. Дифференци-
ровка представителей родов семейства *Pasteurellaceae* представляет опре-
деленные трудности в случае использования общепринятых фенотипиче-
ских признаков. К роду *Actinobacillus* относят культуры грамотрицатель-
ных палочковидных бактерий, проявляющих тенденцию к образованию
плотных колоний, клетки которых не имеют жгутиков, обладающие спо-
собностью к росту на агаре Мак-Конки, ферментирующие с образованием
кислоты глюкозу, фруктозу, ксилозу, образующие фосфатазу, дающие ва-
рирующие результаты в тестах на каталазу, оксидазу, Фогес-Проскауэра,
положительный результат в пробе с метиловым красным, негидролизиро-
ванные (тип 80), не ферментирующие дульцит, инозит, инулин. При иден-
тификации *A. pleuropneumoniae* важнейшим признаком является обнару-
жение NAD-зависимости, поэтому перечисленные признаки более суще-
ственны при идентификации культур NAD-независимого биовара.

Идентификация *A. pleuropneumoniae* на видовом уровне. На пер-
вом этапе посевом испытуемой культуры на кровяной или сывороточный
питательный агар с экзогенным источником NAD («бактерия-кормилка»,
или пропитанные NAD) определяют ее NAD-зависимость. Культуры,
имеющие зависимость от ростового фактора, имеющие характерные
для *A. pleuropneumoniae* культуральные, морфологические и тинктори-
альные признаки, отбирают для дальнейшего изучения. Практически, с
целью происхождения материала, их приходится дифференцировать от
единственного NAD-зависимого вида бактерий, который можно выделить
при разведении свиней — *H. parasuis*. Основные отличительные призна-

ки *A. pleuropneumoniae* 1-го биовара и *H. parasuis* следующие: *H. parasuis* не синтезирует гемолизины и не ферментирует D-маннит, *A. pleuropneumoniae* обычно образует β-гемолизины и расщепляет с образованием галеры D-маннит; *H. parasuis* не образует уреазу, *A. pleuropneumoniae* всегда продуцирует этот фермент; *H. parasuis* растет на «шоколадном», сахарно-точно-дрожжевом агаре, агаре Левинтала 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 зависимых от NAD, сходных с *A. pleuropneumoniae* (что позволяет предполагать возможную их принадлежность ко второму биовару *A. pleuropneumoniae*), необходима дифференциация от более широкого круга бактерий.

Сходные признаки с *A. pleuropneumoniae*, включая гемолитическую и уреазную активность, имеет *B. bronchiseptica*. Для их дифференциации культур определяют способность к утилизации цитратов в качестве единственного источника углерода (посев на среду Кристенсен), а также подвижность клеток и ферментацию углеводов. *B. bronchiseptica*, в отличие от *A. pleuropneumoniae*, использует цитраты,

Имеет жгутики, не ферментирует углеводы, например фруктозу, D-глюкозу, 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 диссоцированными сероварами 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. lignieresii</i> | <i>A. equi</i> |
| Способность к росту на среде Энриха | - | + | + | + |
| Выделение H ₂ S | + | - | + | V ²⁾ |
| Срежа свиная | V | + | - | - |
| Срежа конная | + ¹⁾ | + | - | - |
| Срежа овинная | | | | |
| Срежа козья манниста | | | | |
| Морфология | + | - | + | + |
| Морфология | - | + | - | + |
| Морфология | - | + | - | - |
| Морфология | - | + | - | + |

¹⁾ дифференцируется 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 выпускаются. При наличии антисывороток серовариантную идентификацию штаммов *A. pleuropneumoniae* проводят в РА на стекле, в реакции коагглютинации, прямой иммунофлуоресценции, РДП.

Виивироби. Проводят с целью определения патогенных свойств изолированной культуры бактерий. Наиболее подходящей лабораторной моделью являются морские свинки живой массой 250-300 г. Заражение проводят интранс-зально под легким эфирным наркозом 18-24-часовой агаровой культурой в дозе 0,5-1,0x10⁹ м.к. Вирулентные штаммы возбудителя вызывают гибель животных в течение 1-4 суток после заражения при типичных поражениях легких. На вскрытии у павших животных обнаруживают геморрагическую пневмонию, при достаточно длительном переживании — фибринозный плеврит. Белые мыши несколько устойчивее к *A. pleuropneumoniae*.

Лабораторическая диагностика

Клиническое переболевание свиней актинобациллезной пневмонией сопровождается образованием тип- и видоспецифических антител. Обычно серологические реакции (РСК, РА с 2-меркаптоэтанолом, иммуноферментный метод) оценивают как методы групповой диагностики, которые находят применение при комплектовании благополучных стад. Как

метод индивидуальной диагностики РСК применим только к микробным возбудителям, где число реагирующих невелико. Большинство авторов считают, что титр РСК 1:10 как диагностический. В РФ диагностически значимы 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 в нее 10-15% стерильной дефибринированной или цитрированной крови лошади, барана или кролика. После охлаждения питательной среды до 55-60°C 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) дефибринированной или цитрированной 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 5 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 не в виде жидкой питательной среды.

Сывороточно-дрожжевой агар. Содержит V-фактор. К расплавленной и остуженной до 45° С МПА Или агару Хоттингера добавляют 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 100 мл дистиллированной воды, кипятят на огне в течение 4-5 минут. Затем гомогенную массу осаждают центрифугированием, надосадочную жидкость пропускают через стерилизующие пластины фильтра Зейтца. Стерильный дрожжевой экстракт хранят при 4-5° С и используют в течение 4-10 суток.

и сывороточно-дрожжевой бульон. Готовят так же, как и сывороточно-дрожжевой агар, но на основе жидкой питательной среды.

Питательные среды с добавлением чистых препаратов V- и X-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 термолabileн, 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 основную 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° С.

Селективная среда Conroni с соавт. (1972). На чашки Петри с кровяным агаром, содержащим 5% крови барана, засевают исследуемый материал. Затем кладут диск фильтровальной бумаги с раствором сапонина (1%) и бацитрацина (2 ЕД). Сапонин разрушает эритроциты, вокруг диска образуется зона гемолиза. Из разрушившихся эритроцитов освобождаются X- и V-факторы, которые диффундируют в толщу питательной среды и способствуют росту зависимых бактерий.

Селективная среда Chapin с соавт. (1983). К расплавленному «шо-шо» агару добавляют ванкомицин (5 мкг/мл), бацитрацин (300 мкг/мл) и клиндамицин (1 мкг/мл).

Лабораторная диагностика бортелиоза

Бордетеллы представляют собой аэробные, мелкие грамотрицательные палочковидные бактерии, являются паразитами млекопитающих, обитают среди клеток 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 бронхопневмоний свиней, атрофического ринита свиней; у собак вызывает инфекционный бронхит, нередко в сочетании с вирусными инфекциями; у кроликов — воспаления верхних отделов респираторного тракта, бронхопневмония или септицемии; *B. avium*, которую ранее именовали как *B. bronchiseptica* — подобные бактерии, вызывает ринотрахеит и синусит у ин-

дюшат, цыплят и уток. *B. pertussis* — патоген человека и других приматов; *B. parapertussis* вызывает мягкие формы бордетеллеза человека, 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 легких.

Микроскопическая исследование исходного материала

Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму. Бордетеллы, независимо от видовой принадлежности, выглядят как мелкие грамотрицательные коккобактерии шириной 0,2-0,5 мкм, длиной 0,2-2,0 мкм; окрашиваются биполярно, располагаются одиночно, парно, редко — короткими цепочками. Вирулентные штаммы *B. bronchiseptica* имеют микрокапсулу. Фирма Health Gene выпускает набор для быстрого выявления возбудителя в ПЦР.

Выделение 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), предпочтительнее посев производить на селективные среды. При этом необходимо учитывать, что при наличии в материале бактерий, разлагающих 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 неомитином, пенициллинитрофурантоиновый агар, среду Мак-Конки, среду Baskerville с гентамицином, пенициллином, фуранта-доном (SB). Штаммы *B. avium* на SB-среде культивируют без внесения антибиотиков. Штаммы 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 краями колонии, обычно с зоной β-гемолиза. В наибольшей степени гемолитическая активность выражена на среде Борде-Жангу (рН 6,2-6,4).

— Являются анаэробного типа, но обычно негемолитичные. На МПА (1:10) выделенные культуры образуют гладкие, полупрозрачные, с блестящей поверхностью колонии диаметром 0,2-1,5 мм, которые позднее (18-24 часа) становятся серо-белыми. В зависимости от культуральных условий могут быть выявлены колонии трех типов: S-форма — 1-й тип, R-форма — 2-й тип, R-форма — 3-й тип. На агаре Гартоха колонии имеют беловатый цвет, на агаре Мак-Конки колонии мелкие, с розовой периферией и светлым центром. На селективной среде Smith-Baskerville (10% среда) колонии

B. bronchiseptica и *B. avium* через сутки инкубирования имеют размер около 0,5 мм, голубой цвет и с голубым окрашиванием среды вокруг колонии, что свидетельствует о защелочении pH в зоне роста, позднее колонии достигают размера 1,5-2,0 мм. Сходные по культуральным признакам сахаролитические бактерии вызывают закисление pH, поэтому колонии в окружающая среда приобретают желтоватый цвет. В жидких питательных средах (сывороточный МПБ) бордетеллы растут с равномерным помутнением среды, в последующем образуется осадок и пристеночное кольцо, среда становится прозрачной.

Морфологии клеток бордетелл в культуре. Морфология клеток в жидких и твердых препаратах из культур и патологического материала сходна. Клетки по образуют. *B. bronchiseptica* и *B. avium*, в отличие от *Campylobacter* и *B. pertussis*, имеют жгутики, поэтому обязательно исследуют выделенную культуру на подвижность.

Идентификация бордетелл на уровне рода. Бактерии рода *Bordetella* по морфологическим и тинкториальным свойствам сходны с бруцеллами, 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); потребность в никотинамиде (бордетеллы зависят от этого ростового фактора); реакцию нитратов (бордетеллы и гемофилы всегда редуцируют нитраты в аммонийные аминокислоты (бордетеллы, в отличие от гемофильных бактерий, окисляют аминокислоты); редуцируют тетразолия (бордетеллы, в отличие от видов рода *Alcaligenes*, редуцируют этот субстрат); утилизацию нитратов (*B. bronchiseptica* использует цитраты); защелочение лакмусовой бумаги (защелачивают бордетеллы и алкалигенес); способность к росту в питательных средах, содержащих 320 мг/л теллурита калия (бордетеллы 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>Alcaligenes</i> |
| Спогие паразиты | + | + | + | - |
| Сапрофиты | - | - | - | + |
| Строгие аэробы | + | + | - | + |
| Потребность в ростовых факторах: тиаминс | - | + | - | - |
| никотинамиде | + | - | - | - |
| Хили V) | - | - | + | - |
| Ферментация углеводов | - | - | + | - |
| Редукция нитратов | P | + | + | P |
| Подщелачивание лакмусового молока | + | - | - | + |
| Окисление аминокислот | + | + | - | + |
| Редукция тетразолия | + | н.д. | + | - |
| Рост в присутствии 320 мг/л теллуриата калия | + | н.д. | - | + |
| Утилизация 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 изобро- рованной культуры, наличие гемолитической активности, способность к росту на агаре Мак-Конки, скорость роста на среде Борде-Жангу, продук- цию бурого пигмента на пептонном агаре, морфологию колоний на этой среде, редукцию нитратов, образование уреазы, оксидазы, утилизацию цитрата. При наличии системы API можно дополнительно определить ис- пользование в качестве единственного источника углерода ацетата, мал- пината, мезо-тартрата, итаноната, сукцината. *B. bronchiseptica* способна утилизировать перечисленные субстраты, *B. avium* не использует мезо- тартрат и итанонат.

Серологическая идентификация бордетелл. При наличии специфич- ных теллезных агглютинирующих сывороток медицинского назначения мож- но провести серологическую идентификацию *B. bronchiseptica* и *B. paraptussis*.

Серологическая идентификация может быть осуществлена на основе просмотра первичных посевов. При обнаружении подозрительных колони- ний из них делают мазки, окрашивают по Граму. Если клетки окрасились в розовый цвет, это свидетельствует о наличии бактерий.

Таблица 73 - Дифференциация видов рода *Bordetella*, патогенных для животных

| Показатели | Виды бордетелл | | |
|---|--------------------------|-----------------|-------------------------|
| | <i>B. bronchiseptica</i> | <i>B. avium</i> | <i>B. parapertussis</i> |
| Результативность | + | + | - |
| Среда | - | - | - |
| Устойчивость к высушиванию на среде Борде-Жангу | 1-2 | 1-2 | 2-3 |
| Устойчивость бурого пигмента при росте на питательной среде | - | D | + |
| Морфология колоний на SB-среде | мелкие, голубые | мелкие, голубые | н.д. |
| Устойчивость к антибиотикам | + | - | - |
| Среда | + | - | + |
| Среда | + | + | - |
| Устойчивость в качестве источника углерода | + | + | + |
| Среда | + | + | + |
| Устойчивость Мю-Конки | + | + | + |

Таблица 74 - Антигенная структура видов рода *Bordetella*

| Антигены | Виды бордетелл | | |
|---|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| | <i>B. bronchiseptica</i> | <i>B. parapertussis</i> | <i>B. pertussis</i> |
| Антигенный набор для рода | + | + | + |
| Антигены для рода | | | |
| Фактор 7 | - | - | + |
| Фактор 14 | - | - | + |
| Фактор 12 | + | - | - |
| Антигены в отдельных факторных сыворотках | | | |
| Фактор 11 | | | + |
| Фактор 8 | | + | |
| Факторы 8, 9, 10, 11, 13 | + | | |
| Антигенный набор для рода | + | + | + |

серотипическим и тинкториальным характеристикам бордетелл, то культуры проверяют в РА на стекле с родовой бордетеллезной сывороткой. В составе клеток бордетелл установлено наличие 14 антигенов (факторов). Родовым антигеном является фактор 7, который встречается у всех бордетелл. Видовыми факторами для *B. bronchiseptica* является фактор 12, для *B. parapertussis* — 14. Типовыми факторами для *B. bronchiseptica* определены 8, 9, 10, 11, 13, для *B. parapertussis* — 8, 9, 10. Реакции агглютинации на стекле ставят с адсорбированными видовыми тинкториальными сыворотками, используя 48-часовые культуры. Используя факторные сыворотки, можно определить серотип.

Вивероба. Для подтверждения патогенности выделенных культур бордетелл у них определяют наличие токсигенных и адгезивных свойств.

B. bronchiseptica и *B. avium* синтезируют иммунологически ответственные дермонекротические токсины, которые выявляют внутривенной инъекцией на морских свинках. При введении молодых культур возбудителей внутрибрюшинно можно наблюдать летальный эффект. Целью обнаружения адгезинов *B. bronchiseptica* бактериальную массу из двух колоний суточной культуры суспендируют на предметном стекле в капле физиологического раствора и добавляют равный объем 3% 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 добавку.

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 0,1% раствора 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 ванкомицин — 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. Основной патогенный вид — *M. bovis*, вызывает инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, его также выделяют при конъюнктивитах лошадей. Заболевание возникает на фоне предрасполагающих факторов, преимущественно

... животных до двухлетнего возраста. В этиологии болезни в качестве основного predisposing фактора рассматривают действие солнечного (солнечного) ультрафиолетового излучения.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования является конъюнктивальный секрет. Возбудитель отличается малой устойчивостью, поэтому материал помещают в стерильной емкости (1-2 мл) стерильного физиологического раствора и исследуют не позднее двух часов после взятия, лучше производить посев на питательные среды непосредственно в момент взятия материала.

Микроскопическое исследование исходного материала

При микроскопии приготовленных препаратов, окрашенных по Граму, можно видеть, вплоть до кокков, толстые, капсулированные грамотрицательные палочки размером 1,0-1,5 x 1,5-2,5 мкм, располагающиеся преимущественно парами, иногда — в виде цепочек.

Выделение и идентификация *M. bovis*

Культивирование. Для большинства видов рода, и в том числе для *M. bovis*, характерны сложные пищевые потребности. Моракселлы растут на средах, обогащенных кровью или сывороткой крови, температурный режим 33-35° С, pH 7,2-7,6, аэробы. Материал засевают на кровяной («шоколадный») агар и посевы культивируют в условиях обычной аэрации в течение 2-3 суток. На простом агаре возбудитель не растет.

Через 48-72 часа на кровяном агаре с кровью крупного рогатого скота на поверхности образуются округлые, выпуклые или плоские серо-белые колонии диаметром до 1 мм, с зоной бета-гемолиза или без него. Считается, 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 бактериальной массы крошковидная, и взвесь бактерий в физиологическом растворе неустойчива. В последующих пассажах колонии имеют мягкую 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 могут проявляться признаки полиморфизма: клетки варьируют по размеру, могут присутствовать нити. Особенно сильно полиморфизм про-

является при недостатке кислорода, превышении температуры. Клетки жгутиков 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 кислоты. Внутри этой группы неферментирующих 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 | | | | | |
|----------------------|--------------|------------------|------------------|---------------|---------------|----------------|
| | Moraxella | Pseudo- monas | Alca- ligenes | Achromobacter | Acinctobacter | Flavobacterium |
| Образование пигмента | - | X | - | - | - | - |
| Оксидаза | + | X | + | + | - | - |
| Рост на простом МПА | - | + | + | + | + | + |
| Подвижность | - | + | + | + | - | - |

Как видно, моракселлы в этой группе представляют единственные род, бактерии которого не растут на простом агаре.

M. bovis внутри подрода *Moraxella* от других видов дифференцируется по гемолитической, желатиназной, оксидазной, каталазной, фенилаланиндезаминазной, уреазной активности, способности к росту на агаре Мак-Конки.

Для *M. bovis* характерно наличие гемолитической активности, оксидазы, желатиназы (инкубация 7-14 суток), пептонизация лакмусового индикатора, чувствительность к пенициллину, образование каталазы и редукция нитратов приблизительно у 14% штаммов, отсутствие образования кислоты из Д-глюкозы, Д-ксилозы, Д-маннита, лактозы, сахарозы, мальтозы, фенилаланиндезаминазы, уреазы на среде Кристенсена, утилизация азота на среде Симмонса, образования индола. Возбудитель образует индол, что выявляется в тесте с бумагой, пропитанной ацетатом свинца, на среде

...ствует 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 щелочная часть среды приобретает синий цвет, казеин пептонизируется. Для биохимической идентификации подходит тест-система Enterotest 24 (PIVA-Lachema) и ее аналоги.

Таблица 80 - Критерии дифференциации моракселл внутри рода Moraxella

| Критерии | Вид бактерий | | | | | |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | <i>M. bovis</i> | <i>M. lacunata</i> | <i>M. phenylpyruvica</i> | <i>M. osloensis</i> | <i>M. nonliquefaciens</i> | <i>M. atlantica</i> |
| Оформление | (+) | - | - | - | - | - |
| Скопления | (+) | + | - | - | - | - |
| Скользящие | + | + | + | н.д. | н.д. | н.д. |
| Скользящие | (-) | + | + | н.д. | н.д. | н.д. |
| Скользящие | - | - | (+) | - | - | - |
| Скользящие | - | - | - | - | - | - |
| Скользящие | - | - | (+) | н.д. | н.д. | н.д. |
| Устойчивость к окислению 1 ЕД/мл | + | + | + | + | + | + |

н.д. - большинство штаммов положительные или отрицательные.

Проверка. С целью подтверждения патогенных свойств выделенной культуры можно заражать внутрибрюшинно белых мышей. Вирулентные культуры вызывают летальный исход. Косвенным признаком вирулентности является четко выраженная гемолитическая активность.

Лабораторная диагностика инфекционного тромбоэмболического менингоэнцефалита крупного рогатого скота

Инфекционный тромбоэмболический менингоэнцефалит крупного рогатого скота (ИТЕМЕ) — инфекционная остропротекающая септическая болезнь, характеризующаяся симптомами поражения центральной нервной системы, органов дыхания, гениталий и суставов конечностей. Заболевание, как правило, развивается в виде респираторного синдрома, а на последней стадии поражаются различные органы и ткани. У овец воз-

будитель обнаруживается как комменсал генитального тракта и может быть причиной орхитов, эпидидимитов, пневмоний, маститов, простатитов, 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 выключен 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 остальных случаях материал берут по возможности сразу после смерти животного: пробы трахеальной слизи, участки пораженных Легких, перикардиальную и плевральную жидкость, сегменты тонкого кишечника с изменениями, субменингеальные мазки, сегменты мозга, цереброспинальную жидкость из латерального желудочка, фибринозный экссудат из пораженных суставов, лимфоузлы, регионарные узлы генитальным 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 грамнегативные палочковидные, вплоть до кокковидных, бактерии с капсулами.

Выделение и идентификация возбудителя

Культивирование. *H. somnus* требует для своего роста повышенное содержание CO_2 (5-10%), в обычной атмосфере не растет. Температурный оптимум $37-38^{\circ}\text{C}$, pH питательных сред 7,8. Зависимости роста от других V-ростовых факторов нет, хотя в первых пассажах возбудитель может проявлять феномен роста около штриха *S. aureus* на сыровороточном (10%) но не «шоколадном» или кровяном агаре. Свежевыделенные штаммы растут на общепринятых питательных средах, сыровороточном, гемолитическом агаре, ингредиенты которого стерилизовали автоклавированием, плохо растут на «шоколадном» агаре. Оптимальной питательной средой для первичной изоляции возбудителя является агар с цитрированной казеиновой средой.

тот (3-10%) крупного рогатого скота. Кровь других животных стимулирует рост *H. somnus* хуже.

При незначительном содержании клеток возбудителя в исследуемом материале (данные микроскопии) целесообразно параллельно делать высевы на среду обогащения — сердечно-мозговой бульон с добавками кровяного экстракта, крови крупного рогатого скота или заражать в специальный мешок 7-дневные куриные эмбрионы. В случае отсутствия роста на кровяном агаре через 24-48 часов делают высевы со сред обогащения на кровяной агар.

На питательные среды целесообразно делать посев кусочками органов, в жидкие среды помещают фрагменты исследуемых тканей. На кровяной агар 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 кровяном агаре через 48 часов возбудитель формирует нежные, 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.

Морфологии 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 обнаруживаются структуры неправильной формы. При микроскопическом изучении колоний в агаровом блоке, окрашенном по Клинбергер-Гимза, находят длинные извилистые нити с овоидными утолщениями, а также слабо окрашенными полярными зернами и цепи из бактерий. Клетки имеют капсулу, жгутиков нет.

При просмотре первичных посевов обращают внимание на наличие колоний с грамбтрицательными коккобактериями и палочками в чашке Петри, инкубированной в аэробных условиях (это могут быть пастереллы и эстимобациллы). Для исследования берут колонии бактерий, растущие только в присутствии CO_2 .

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 каталазию, оксидазную активность, способность к редукции нитратов, образованию индола, уреазы, лизиндекарбоксилазы, аргининдигидролазы, потребность в V- и X-ростовых факторах (посев на сывороточный агар с дисками, пронумерованными 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 азота | + |
| Редукция нитратов | + |
| Индол | + |
| Каталаза | + |
| Уреаза | + |
| Орнитиндекарбоксилаза | + |
| Аргениндигидролаза | + |
| Потребность в NAD | + |
| Потребность в X-факторе | + |
| Утилизация нитратов | + |
| Образование кислоты из: фруктозы, D-глюкозы, мальтозы, D-маннита, D-маннозы, D-сорбита, трегалозы, D-ксилозы | + |
| Отсутствие образования кислот из: адонита, α-арабинозы, целлобиозы, глицерина, 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 массовой агглютинации. С целью получения антигена культуру выращивают в PPLO-бульоне с фильтрованным дрожжевым экстрактом на шейкере-аппарате в течение 24 часов. Клетки осаждают центрифугированием, отмывают в ве-роналовом буфере (pH 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 агглютинации. Пробирочную РА ставят общепринятым способом с разделением в пробирке до титра. Пробирки выдерживают при 37-38° С в течение 15 часов и учитывают результат.

Серологическая диагностика. Широко распространенное носительство возбудителя и частое инapparантное течение инфекции приводят к тому, что приблизительно в 50% обследованных стад в РСК реагируют положительно от 10 до 100% животных. В то же время переболевание ведет лишь к кратковременному и небольшому повышению уровня гуморальных аггител, что делает пока нецелесообразным практическое использование серодиагностики болезни.

Исследовательские среды

Кровинный агар. В качестве основы используют агар Хоттингера (рН 7,4). К расплавленному и остуженному до 45° агару добавляют 5-10% стерильной свежей цитрированной крови крупного рогатого скота, компоненты перемешивают, среду разливают по чашкам Петри.

Средично-мозговой бульон («Дифко»). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 12,5 г сухого мозгового отвара, 10,0 г протеозопептона, 1,0 г декстрозы, 5,0 г натрия хлорида, 2,5 г динатриевого фосфата, устанавливают рН 7,8, стерилизуют при 121° С 15 минут. Стерильную среду обогащают добавлением 5% стерильного дрожжевого экстракта, или 5-10% 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 спаривания с жеребцом-бактерионосителем. На 6-8-й неделе после спаривания может произойти аборт или резорбция плода. У жеребцов инфекция практически не проявляется. Возбудитель — бактерия *Teylorella equigenitalis* (прежнее наименование — *Haemophilus equigenitalis*), относящаяся к роду сформированному роду *Teylorella*, в котором является единственным видом.

Бактериологическое исследование

Половые органы обмывают антисептическим раствором (1:1000), осушают салфетками. Стерильными тампонами берут пробы слизи из преуциальной 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 у-

лаженными тампонами с головки пениса, препуция, уретрального канала.

Возбудитель отличается слабой устойчивостью. Материал доставляют в лабораторию не позднее 3-4 часов после взятия. Лучше для транспортировки использовать специальную среду Timoney Р.У. и соавт. (1981). 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 из 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 растет очень слабый; хорошо культивируется на «шоколадном» агаре, но зависимость 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 посев на селективные среды со стрептомицином, амфотерицином и кристаллиолетом. Возможно выделение стрептомицинчувствительных штаммов, поэтому рекомендуется посев производить одновременно на две селективные среды: «шоколадный» агар со стрептомицином и «шоколадный» агар с амфотерицином и кристаллиолетом (Тейлор К. и соавт. 1978).

Посевы инкубируют при 37° С в атмосфере 10% CO₂. Макроскопически видимый рост обычно появляется через 48 часов, но иногда не появляется, поэтому в отрицательных случаях посевы рекомендуется выдерживать 7 суток.

На «шоколадном» агаре через 2-4 суток инкубирования в оптимальных условиях формируются круглые, выпуклые, с блестящей поверхностью и конусовидным центром полупрозрачные колонии, первоначальный диаметр 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 до коричневого, заметна зона α -гемолиза, которая отчетливо видна только на 5-7-й день культивирования. Гемолитическая активность в высокой степени проявляется при использовании эритроцитов лошади и овцовой — овцы.

Характерна консистенция колоний на плотных питательных средах. При надавливании бактериологической пестлей 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 3-4-й день 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 нет.

Идентификация возбудителя по ферментативным свойствам. Вид *Escherichia coli* является на сегодня единственным представителем рода, но при бактериологическом исследовании могут быть выделены сходные виды бактерий других родов, от которых возбудитель необходимо дифференцировать на первом этапе исследования: *Wolinella recta*, *Bacteroides oviformis* и *Bacteroides gracilis*. Перечисленные виды обитают в организме человека и в исследуемом материале могут присутствовать как симбионты. С указанной целью определяют у выделенных культур подвижность, наличие уреазы, оксидазы, способность к восстановлению нитрата и нитрита. Для дальнейшего изучения отбирают бактерии, не имеющие жгутиков, не образующие уреазу, обладающие оксидазной активностью, не редуцирующие нитраты и нитриты.

У культур контролируют отсутствие способности к росту в обычной среде, наличие фосфатазы. Фосфатазную активность проверяют следующим образом: в 0,5 мл трисбуфера (рН 8,0) суспензируют несколько палочковидных колоний, добавляют 0,5 мл раствора гидрофосфата (1 мг/мл), смесь выдерживают при 37° С в течение 2 часов. Положительный результат — желтое окрашивание. *Escherichia coli* вырабатывает фосфатазу. В случае необходимости проверяют другие ферментативные свойства и ростовые потребности. Для *Escherichia coli* свойственно отсутствие потребности в V-и F-витаминных факторах, хотя последний несколько стимулирует рост, отсутствие синтеза лецитиназы, утилизации цитратов, продукции индола, сероводорода, Р-галактозидазы, желатиназы, аргинин и лизиндекар-

боксилазы, окислации глюконата, образования кислоты из сахаров: глюкозы, мальтозы, арабинозы, рибозы, ксилозы, эскулина, декстрозы, дульцита, галактозы, маннозы, маннита, рамиозы, сорбита, целлобиозы, лактозы, раффинозы.

Сахаролитические свойства испытывают посевом на среды Гисса 1-10% сыворотки крови, 1% испытуемого углевода, 0,002% бромкраски пурпурового.

Серологическая идентификация возбудителя. При наличии специфических антител в сыворотке возможна идентификация возбудителя в реакции агглютинации или коагглютинации. РА на стекле целесообразно использовать на стадии отбора подозрительных колоний, при этом допустима слабая спонтанная агглютинация бактерий в контроле с физиологическим раствором. Более специфической и чувствительной считается реакция коагглютинации. 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 5 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 смегму у жеребцов из уретральной ямки, уретры, препуция, пениса, у кобыл из клиторного синуса и ямки. Смегму разбавляют в 30 мл дистиллированной воды и ин окулируют при помощи осеменительной шпательки в матку кобыле. Если смегма содержит возбудитель, то через три дня можно выделить из цервикальной или маточной слизи. Одновременно в заражении и после заражения (7-14-е сутки) у кобылы исследуют сыворотку 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 1:16-1:32; 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. Лошадей-бактерионосителей при помощи РСК и РА, как правило, выявить не удается. В отдаленные сроки целесообразнее использовать более чувствительные серологические реакции (иммуоферментный метод, РНГА).

В России в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике контагиозного метрита лошадей» (1984) для серологической диагностики болезни рекомендована пробирочная РА. В качестве реагента применяют инаktivированную формалином (0,25%) взвесь бактерий концентрацией 10 млрд.м.к. в 1 мл по оптическому стандарту мутности. РА ставят в объеме 1 мл, на 3%-ном растворе натрия хлорида (рН 7,2-7,4) в разведениях 1:20 и 1:40. Учет результатов проводят через 20-24 часа. Так положительный результат оценивают реакцией интенсивностью не 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, выращенной на «шоколадном» агаре. Бактериальную массу смывают трис-буфером (рН 7,4), трижды отмывают центрифугированием, ресуспендируют в буферном растворе и консервируют мертиолатом (1:10 000). Рабочее разведение антигена определяют в опыте титрации обычным способом. Реакцию ставят в объеме 1 мл. Исследуемую сыворотку крови инкубируют 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. После доведения индикаторной системы компоненты выдерживают в водяной бане при 37° С в течение 1 часа.

Питательные среды

«Шоколадный» агар. Готовят обычным способом (см. «Возбудитель контагиозного полисерозита поросят») на базе агара Мартена, Хоттингена (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 из расчета конечной концентрации 200 мкг/мл.

Лабораторная диагностика сапа

Сап - инфекционная болезнь однокопытных, протекающая преимущественно хронически, характеризующаяся возникновением на слизистых оболочках, во внутренних органах узелков, склонных к катаральному распаду с формированием язв. Восприимчивы лошади, ослы, мулы, а также львы, тигры, рыси, белые и бурые медведи. Болеет человек, но у животных в 90% случаев наблюдается хронический сап, то у людей, наоборот, правило, он проявляется в острой форме.

Возбудитель болезни — грамотрицательная, аэробная палочковидная бактерия *Burkholderia mallei*, род *Burkholderia*, семейство *Pseudomonadaceae* (ранее *Pseudomonas mallei*). Лабораторная диагностика сапа у животных основана на результатах бактериологического и серологического исследований. Основными методами диагностики являются серологические, к бактериологическому исследованию прибегают редко и применяют 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 — регионарными лимфатическими узлами, подчелюстные и задние 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 закругленными концами размером 0,5-1 x 2-4 мкм. При окраске по Романовскому-

Грибок, споры которой Леффлера, в клетках, за счет гранул поли-β-гидроксибутирата, выявляется зернистостью, что нередко приводит к биопорной 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, к питательным средам не требователен, лучше растет на средах с глицерином (1-2%). Исследуемый материал высевают на глицеринизированный МПА, МПБ, кровяной МПА. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры в питательные среды рекомендуется вносить основной фуксин 1:10 000, кристаллический фиолетовый 1:200 000, бриллиантовый зеленый 1:100 000. Посевы культивируют при 37-38° С. Макроскопически видный рост обнаруживается уже через 24-48 часов инкубирования, редко

на глицеринизированном агаре возбудитель образует через сутки круглые, двоякие, серовато-белые, с перламутровым блеском, полупрозрачные колонии слизистой консистенции, постепенно сливающиеся в тягучий, прозрачный налет. На картофельно-глицериновой среде возбудитель синтезирует пигмент, что считается важным диагностическим признаком; через 2-3 суток на картофельных пластинках вырастают мелкие, полупрозрачные, с желтоватым оттенком колонии, которые сливаются. Образуются слизистый медообразный налет, цвет которого меняется от янтарно-желтого (1-3 дни) до буро-коричневого или буровато-красного (6-8 дней). Колонии само от цвета колонии сохраняют свою прозрачность. В МПБ (1-2% глицерина) возбудитель вначале растет в виде мутной взвеси, через 48 часов формируется пристеночный осадок в виде слизистых тяжей, часто покрытых сероватой слизистой пленкой. Образующийся осадок при встряхивании разламывается в виде тяжей, среда полностью не просветляется. При посеве уколом в желатину наблюдается поверхностный рост в виде сероватого налета в верхней части укола. Желатина не разжижается, иногда в нижнем роде наблюдается желтое окрашивание.

Морфология клеток *B. 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 закрученными, заостренными или со свободными концами. В старых культурах на М П Б формируются нити из 4-8 клеток. Споры, капсулы, жгутиков клетки не образуют, зернистость в клетках при культур окрашивается метакроматично.

Идентификация выделенных культур *V.mallei*. Выделенные культуры после микроскопического исследования пересевают на глиаэризованный 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 *P.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 подвижность, образование газа из нитрата, способность к росту в МБ без NaCl, пептонизация молока, образование орнитиндекарбоксидазы.

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, РИ.

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 кожные язвы, главным образом на конечностях, на лицевой части животного 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 подкожном заражении образуется узелок, вскрывающийся на 4-5 сутки с формированием язвы. После внутрибрюшинного заражения в положительных случаях развивается отеочность 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 | Кокцилообразные прямые палочки с двойной капсулой | |

| Субстрат, животное | - | + |
|------------------------------|-----------------------|-----------|
| Сыворотка крови | 100 | 40 |
| Сыворотка свиной сыворотки | окисление | окисление |
| Сыворотка крови из Д-глюкозы | 100 | 100 |
| Сыворотка | 12 (50) ¹⁾ | 86 (14) |
| Сыворотка | 62 (14) ¹⁾ | 94 (6) |
| Сыворотка | 12 (62) ¹⁾ | 99 (1) |
| Сыворотка | 0 | 66 (4) |
| Сыворотка | (75) ¹⁾ | 99 (1) |
| Сыворотка | 100 | 100 |
| Сыворотка | 25 | 100 |
| Сыворотка Мак-Конки | 88 | 100 |
| Сыворотка | 0 | 8 (31) |
| Сыворотка | | 7 (3) |
| Сыворотка Симмонса | 0 | 77 (4) |
| Сыворотка, среда Кристенсена | 12 | 13 (8) |
| Сывороточные питательные | 100 | 100 |
| Сыворотка | 0 | 100 |
| Сыворотка | 0 | 0 |
| Сыворотка скар TS1, кислота | 0 | 72 |
| Сыворотка ТН, кислота | 0 | 0 |
| Сыворотка ТН | 0 | 0 |
| Сыворотка с антигеном РБ | 100 | 26 |
| Сыворотка желатина | 0 | 79 |
| Сыворотка желатина | 0 | 96 |
| Сыворотка желатинный | 0 | 51-беслый |
| Сыворотка желатинный | 0 | |
| Сыворотка 12° С | 100 | 100 |
| Сыворотка | 100 | 100 |
| Сыворотка | 0 | 100 |
| Сыворотка желатина | 0 | 59 |
| Сыворотка желатина | 0 | 0 |
| Сыворотка желатина | 100 | 100 |
| Сыворотка желатина | 100 | 0 |
| Сыворотка желатина | 0 | 100 |
| Сыворотка желатина | 0 | 12 |

1) Реакция может проявиться с задержкой, необходима инкубация 7—14 суток. 2) Инкубация 1—14 суток.

заболевает. На пике заболевания морских свинок убивают, вскрывают, делают записи — 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 перекрестный феномен не является строго специфической реакцией и 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 редких пор — пластинчатая РА с сапным цветным антигеном. Со-

гласно действующей инструкции предписывается применение РА вместо глазной 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, энтаральноногнойным воспалением слизистых оболочек, образованием язвенно-узловых узелков и гнойных очагов в различных органах и тканях. В естественных условиях восприимчивы к мелиодозу грызуны, собаки, кошки, свиньи, овцы, крупный рогатый скот, лошади, ослы, а также человек. Возбудителем болезни является грамотрицательная палочковидная бактерия *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 являются: гнойное отделяемое язв, содержимое абсцессов, кровь, моча, мокрота, выделения из носовых отверстий, глаз. Посмертно берут участки пораженных тканей, кровь, кусочки внутренних органов, лимфатические узлы.

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, люминесцентно-серологического и иммуноферментного исследования. В положительных случаях в мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают полиморфные, грамтрицательные, нередко биполярные палочковидные бактерии с закругленными концами размером 3-6x0,3-0,6 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 6,8-7,0, диапазон 5,6-8,5. Возбудитель не требователен к питательным средам, но лучше растет на субстратах с добавлением 4-5% глицерина. Обычно посев производят на мясопептонный агар и бульон с глицерином. Для заминированного материала рекомендуется в течение 3 часов обработать пенициллином (1000 ЕД/мл) и высевать на М ПА с кристаллвиолетом (1:200 000), на синтетическую среду с Р-аланином и неомицином. Колонии инкубируют при 37° С, в аэробных условиях в течение 5-6 суток, периодически просматривая. *B. pseudomallei*, в отличие от *B. mallei*, не способна 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, непрозрачные, сероватого цвета колонии с ровными краями, выпуклые с гладкой поверхностью, которые напоминают колонии эшерихий, но несколько мельче. На кровяном агаре некоторые штаммы вызывают агглютинацию. Иногда вырастают крупные слизистые колонии, диаметром до 1 см, правильной круглой формы, выпуклые, слегка опалесцирующие. Иногда часто колонии этой морфологии образуются при исследовании

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 типкториальные свойства *B.pseudomallei* в культуре. В мазках из культуры клетки возбудителя имеют морфологию, сходную с наблюдаемой в патологическом материале; клетки мелкие, располагаются одиночно, парами, короткими цепочками, «обоймиками» по 5-7 штук. При старении культур образуются скопления по 8-10 штук, объединенные слизистой массой; клетки с возрастом удлиняются, увеличивается зернистость, одновременно обнаруживаются коккобактерии. Для клеток, окрашенных по Граму и другими анилиновыми красителями, характерна биполярность, спор не образуют, подвижны, движение клеток прямолинейное или змеевидное. На сывороточных средах возбудитель образует капсулу.

Идентификация *B.pseudomallei* по ферментативным свойствам. Для *B. pseudomallei* характерно наличие аргининдигидролазы, окисление желатиназы, гидролиз крахмала, денитрифицирующая активность, использование глюкозы, трегалозы, мезо-инозитола, d-валина, β-аланина, d-аргинина, D-рибозы, леулината, эритритола, α-амиланина, инертности по отношению к гераниолу, D-ксилозе, d-рамнозе, сахарату, цитрату, мезаконату, D- и мезо-тартрат. Критерии дифференциации *B.pseudomallei* представлены в таблице 79. Согласно этим данным, для возбудителя типично образование газа из нитрата (100% штаммов), кислоту на скошенном агаре TSA (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, мальтозы, эскулина, амидона, декстрина; непостоянный — окисление арабиноксилозы, глюкозы, леулезы, лактозы, мальтозы, трегалозы, раффинозы.

маннита, маннита, инулина; постоянно отрицательный — отсутствие лактозы, рамнозы, сахарозы, салицина, дульцита, инозита, сорбита, галактозы. Система комбинированного тестирования ферментативной активности API 20 E позволяет идентифицировать только 50-63% штаммов возбудителя. Более эффективны системы Minitek и EPA — 18 NF. Несовпадение методов идентификации возбудителя по фенотипическим признакам подтверждает перспективность молекулярно-генетической диагностики мелиоидоза.

Серологическая идентификация возбудителя. На различных этапах бактериологического исследования может быть использован метод флуоресцирующих антител, РНГА, ИФА. При просмотре первичных посевов на питательных питательных средах отбирают «подозрительные» колонии и проверяют их в РА на стекле. Коммерческая иммунная мелиоидозная сысертка агглютинирует в разведении до 1:160 культуры всех известных штаммов *B. pseudomallei*. В РА, при использовании поликлональной сысертки, нельзя дифференцировать *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Возбудитель мелиоидоза имеет антигены, родственные довольно широкому кругу серологических видов бактерий, но наиболее близок по спектру антигенов к *B. mallei*. По результатам РА отбирают культуры для дальнейшего изучения ферментативных свойств с целью окончательной идентификации.

Биопроба. Проводят с целью выделения культуры возбудителя из исследуемого материала и установления патогенных свойств изолированной культуры. Биопробу проводят на морских свинках, золотистых хомяках и крысах (крысы резистентны к *B.mallei*). Если материал не загрязнен посторонней микрофлорой, то его вводят животным внутривенно, в 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 сапа. 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 мочевыводящих путей, постхирургические осложнения. *P. aeruginosa* известен как возбудитель псевдомоноза норки. *Pseudomonas aeruginosa* является аэробной, грам-

отрицательной 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 воспалительный экссудат, посмертно — пораженные участки легких при пневмонии, лимфатические узлы, селезенка, печень, почки и т.д. Материал желательно отбирать непосредственно из очага воспаления, отделяемого, если таковое имеется, а также до начала антибиотикотерапии или после 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 изогнутых грамотрицательных палочек размером 1,5-3x0,5-1,0 мкм, располагаются одиночно, парами, в виде коротких цепочек. Вирулентные штаммы продуцируют значительное количество капсулоподобного слизистого вещества. В мазках — отпечатках из тканевого материала клетки *P. aeruginosa* часто обнаруживаются внутри фагоцитов.

Выделение и идентификация культур *P. Aeruginosa*. Культивирование. *Pseudomonas aeruginosa* — аэроб, температурный оптимум — 35-37° С, диапазон 4-42° С, рН — 7,2, к питательным средам неприхотлив. Исследуемый материал высевают на МПА, кровяной МПА или селективной среде, содержащую цетилтриметил аммония бромид (цетримид), на 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, с волнистыми, волнистыми распространяющимися плоскими краями, полупрозрачные, с гладкой поверхностью и приподнятым центром колонии, часто отличающиеся металлическим блеском, кроме того, могут быть мелкие, шероховатые колонии, напоминающие маргаритки. Штаммы, выделенные из респираторного и мочеполового тракта, могут образовывать мукоидные или мукоидные колонии. На кровяном агаре колонии часто окружены зоной β-гемолиза. Культуры *P. aeruginosa* имеют фруктовый запах, прозрачные среды в процессе роста окрашивают в зеленоватый или желто-зеленый цвет. Пигментообразование — важный таксономический 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 растворим в воде и хлороформе, окрашивает питательные среды в сине-зеленый цвет. 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 синет. 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 флуоресцеин (пиовердин) — зеленый пигмент, растворим в воде, не в хлороформе, флуоресцирует при освещении культуры, выращенной на среде «В» в темноте, ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 254 мкм, его вырабатывают большинство штаммов. Синтез пиовердина стимулирует среда «В», а также культивирование при 25° С. Цвет пигмента пурпурин у культур на среде «А» варьирует от розового до темно-каштанового. 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 свободной культуры. Спектр пигментов, образуемых *P. aeruginosa* и другими псевдомонадами, представлен в таблице 79. Определение наличия пигментов его типа — важный этап в идентификации *P. aeruginosa*.

В МПБ рост *P. aeruginosa* проявляется образованием поверхностной серебристо-белой пленки, что считается характерным признаком. При этом 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 слизеобразованию в процессе пассирования на питательных средах быстро утрачивают, спор не образуют. Подвижность исследуемых 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 питательном агаре, образующих колонии с признаками, характерными для

P. aeruginosa, проводят микроскопическое исследование мазков, окрашенных по Граму. Исследуют способность к слизеобразованию, пигментообразованию и тип пигмента.

Таблица 83 - Пигментообразование у *P. aeruginosa* и некоторых других псевдомонад

| Вид бактерий | Тип пигмента | | |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| | Диффундирующие флуоресцирующие | Диффундирующие нефлуоресцирующие | Недиффундирующие нефлуоресцирующие |
| <i>Aeruginosa</i> | + | + сине-зеленый | - |
| <i>Alcaligenes</i> | - | - | d желто-оранжевый |
| <i>Chryseobacterium</i> | - | + желто-зеленый | - |
| <i>Flavescens</i> | - | + различные | - |
| <i>Fluorescens</i> | + | - | + зеленый или оранжевый |
| <i>Hydrophila</i> | + | - | - |
| <i>Indologens</i> | - | - | - |
| <i>Limicola</i> | - | - | - |
| <i>Morganella</i> | + | - | - |
| группа I | - | - | - |
| группа II | + | - | - |
| группа III | + | - | - |
| группа IV | + | - | - |
| группа V | + | - | + синий |
| <i>Hydrophila</i> | - | + желто-зеленый | - |
| <i>Limicola</i> | - | - | + желто-оранжевый |
| <i>Limicola</i> | - | - | - |
| <i>Limicola alcaligenes</i> | - | - | - |
| <i>Limicola</i> группы A | + | - | - |
| группа II | + | - | - |
| <i>Limicola</i> | - | - | - |
| <i>Limicola</i> | - | d коричневый | - |
| <i>Limicola</i> | - | - | - |
| <i>Limicola</i> | + | - | - |
| <i>Limicola</i> | - | - | + желто-оранжевый |
| <i>Limicola</i> | + | d сине-зеленый | - |

В случае выявления типичных грамотрицательных палочек проверяют на оксидазную и каталазную активность.

Для дальнейшего исследования отбирают колонии оксидазо- и каталазо-положительных бактерий. Исследуют у выделенных культур подвижность, способность к восстановлению нитратов, образованию газа из сахара, ферментации молока, гидролизу желатины, утилизации цитрата, синтезу пигментов (см. выше), аргининдигидролазы, способность к росту при 25° С, 35° С, 42° С, в МПБ без NaCl, образованию кислоты из D-галактозы, D-ксилозы, D-маннита. Для *P. aeruginosa* характерны свой-

ства, отраженные в таблице 80. Может быть использована тест-система NEFERV 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 носовом монозе норок, 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, инактивированную 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 (цетримидоламмония бромид) — 0,3 г; пептон — 20,0 г; магниевый хлористый — 1,0 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 |
| D-глюкозы | |
| D-ксилозы | 90 |
| D-маннита | 70 |
| Лактозы | <1 |
| Сахарозы | 0 |
| Мальтозы | <1 |
| Каталаза | 100 |

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Амидоаза | 99 |
| Рост на среде: | 100 |
| Мил-Конки | |
| агаре | 96 |
| тримид-агаре | 94 |
| глицерин-цитрата | 95 |
| сыворотка на среде Кристенсен | 48 |
| восстановление нитратов | 98 |
| рост на нитрата | 93 |
| лизина | 0 |
| кислотный агар TSI, кислота | 0 |
| серфид TSI, кислота | 0 |
| (столбик TSI) | 0 |
| (бумага с ацетатом РЪ) | 4 |
| аминаза | 82 |
| слизистое молоко | 89 (пептонизация) |
| лизин | 65 |
| лизин | |
| лизин | 46 |
| лизин | 25 |
| лизин | |
| лизин 25° С | 23 (пиомеланин) |
| лизин | 100 |
| лизин | 100 |
| лизин | 100 |
| лизин | 0 |
| лизин | 0 |
| лизин | 100 |
| лизин | 0 |
| лизин | 100 |
| лизин | 0 |
| лизин | 100 |

Примечания: SS — агар — сальмонелла — шигелла — агар.

Таблица 85 - Соответствие схем обозначения O-антигенов *P.aeruginosa* (Беляков В.Д. и соавт., 1990)

| Схематическая | Habs | Homma | Lanyi | Verder-Evans | Fischer | Meitert |
|---------------|------|-------|-------|--------------|---------|---------|
| 1 | 10 | 6 | 4 | 4 | 13 | |
| 2 | 2 | 3 | - | 3 7 | 2 | |
| 3 | 1 | 1 | 6 | - | 5 | |
| 4 | 6 | 11 | - | - | 8 | |
| 5 | 7 | 3 | 1 | 7 | 6 | |
| 6 | 8 | 4 | 2 | 1 | 1 4 | |
| 7 | 3 | 5 | 8 | 6 | 3 | |
| 8 | 3 | 5 | 8 | 6 | 3 | |
| 9 | 4 | 10 | 9 | - | 14 | |
| 10 | 9 | 2 | - | 5 | 11 | |
| 11 | 5 | 7 | 3 | 2 | 15 | |
| 12 | 14 | 13 | 7 | - | 7 | |
| - | 12 | - | - | - | - | |
| - | 12 | - | 5 | - | - | |
| - | 11 | 12 | - | - | - | |

| | | | | | | |
|----|---|----|---|----|---|----|
| 16 | - | 13 | 3 | - | - | - |
| 17 | - | - | - | - | - | 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. Бактериопептон (Difko) — 20 г; глицерол — 10; хлористый магний — 1,4 г; сернокислый калий — 10 г; агар — 15 г; дистиллированная вода — 1000 мл, pH доводят до 7,2, автоклавируют в пробирках при 121°C 15 минут.

Среда В («Flo») для выявления пигментообразования. Протокол-пептон № 3 (Difko) — 20 г; глицерол — 10 мл; фосфорнокислый кальций 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 О-антигенов *P.aeruginosa*

| Группа | О-антигены | |
|--------|------------|------------------------------------|
| | групповые | парциальные |
| 1 | 1 | - |
| 2 | 2a | 2b :2c :2d :2d2e :2d2f :2b2e :2b2c |
| 3 | 3a | 3b:3b3c:3d |
| 4 | 4a | 4b:4c |
| 6 | 6a | 6b:6c:6d |
| 7 | 7a | 7b7c:7b7d:7d |
| 9 | 9a | 9b9d:9c:9d |
| 10 | 10a | 10b:10c |
| 11 | 11a | 11b:11c |
| 12 | 12 | - |
| 13 | 13a | 13b:13c |
| 14 | 14 | - |
| 15 | 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 расшифрован.

Агар с экстрактом сердечной мышцы (Difko). Экстракт сердечной мышцы крупного рогатого скота — 500 г; Васто-триптон — 10 г; хлорид натрия — 5 г; Васто-агар — 15 г; дистиллированная вода — до 1000 мл.

Лабораторная диагностика некробактериоза

Некробактериоз — инфекционная болезнь, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями, локализующимися на нижних частях конечностей, а в отдельных случаях — в ротовой полости, на вымени, половых органах, в печени, легких, мышцах и других тканях и органах. Возбудителем болезни является анаэробная грамотрицательная бактерия *Fusobacterium necrophorum*. Род *Fusobacterium* содержит 17 видов. Из культуральных образцов от животных, наряду с *F. necrophorum*, могут быть выделены другие виды фузобактерий: из кишечного тракта — *F. fundiformans*, *F. necrogenes*, *F. russii*, *F. pseudonecrophorum*; со слизистой ротовой полости — *F. simiae*. В зависимости от вида и возраста животных промышленные некробактериозы может иметь некоторые особенно-

F. necrophorum в сочетании с *Actinomyces pyogenes* вызывает форму некробактериоза, именуемую дифтерией телят, которая сопровождается образованием некротических фокусов в области гортани, трахеи, грудной 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 и половых органов. У свиней некробактериоз при кожной форме сопровождается поражениями в области шеи, туловища, вымени, кончиков ушей, хвоста. Могут развиваться некротический энтерит, абсцессы в печени. У лошадей некробактериоз чаще проявляется в виде гангренозного некроза конечностей, у северных оленей — флегмонозно-гнойным 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 инфицированной ткани из области венчика, межкопытной щели, рото-

вой 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 кожных поражениях, слизистой ротовой и носовой полостей, трахеи, 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 Сэй-Вэйг. Материал лучше транспортировать и хранить при температуре ниже температуры холодильника, так как при низких температурах возбудитель 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 окрашивают по Граму, методом С.Н.Муромцева и Л.Новиковой (цит. по Львову 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 Цейля. Может быть использована окраска по Романовскому-Гимза. В мазках из пораженных тканей 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. Длинные нити часто имеют утолщения. Кроме нитей обнаруживаются единично расположенные палочковидные клетки или цепочки из нескольких клеток, концы могут быть округлыми или заостренными. Нитевидные формы преобладают в пораженной ткани на границе со здоровой. Ближе к центру

той ткани количество нитей уменьшается. В мазках, сделанных из центра некротического фокуса, возбудитель обычно обнаруживается в виде коротких палочек, нити встречаются реже. В мазках из плевральной и перитравной жидкости возбудитель имеет преимущественно форму длинных нитей.

В мазках из материала могут быть выявлены клетки *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, клеток с утолщениями и колбовидных форм нет. *F. necrogenes* и *F. gonidiformans* по морфологии идентичны *F. necrophorum*. *F. naviforme* преимущественно имеет форму правильных палочек с заостренными концами.

Кроме того, в материале из пораженных конечностей вероятно присутствие бактерий из рода *Bacteroides* — *Bacteroides nodosus*, клетки которого грамотрицательные, размером 1,7x3-6 мкм, нередко с утолщением на одном или обоих концах, располагаются единично или парами; *Bacteroides melanogenicus* имеет форму грамотрицательных палочек (0,3-0,8x0,9-2,5 мкм), иногда в виде коротких нитей; *Bacteroides fragilis* и *Bacteroides levii* имеют форму грамотрицательных палочек размером 0,6-1,4x1,6-8 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 грамотрицательных бактерий родов *Eubacterium* и *Clostridium*, которые при окрашивании по Граму легко обесцвечиваются.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Возбудитель — строгий анаэроб, оптимальное размножение — 4-10 мм ртутного столба, температурный оптимум 36-37°С, pH 7,4-7,6. лучше растет на средах с добавлением крови, сыворотки крови, глюкозы, лактозы, дрожжевого экстракта.

Неразличные посевы обычно производят на плотные питательные среды с последующей отливкой культур на жидкие среды. Из жидких сред по материалу проводят на среду Кита-Тароцци, маргеновский бульон, бульон с добавлением 10% стерильной крови барана или крупного рогатого скота, а также 0,4% глюкозы. Используют тиогликолатный бульон с К-

геминовой 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 жидкие питательные среды добавляют 0,4% глюкозы и витаминную К-геминовую 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.necrophorus* растет в стерильной сыворотке крови. Из полужидких сред может быть использован ПЖА по Муромцеву с добавлением 5-10% сыворотки крови, 2% глюкозы, 0,2% цистина.

В качестве плотных сред для первичной изоляции возбудителя применяют глюкозный (1%), сывороточный (10-20%) агар, глюкозо-красный агар. Агаровые среды готовят непосредственно перед посевом или выдерживают перед использованием в течение 6-24 часов в анаэробных сосудах. С целью стимуляции роста возбудителя рекомендуется добавлять дрожжевой экстракт, витамин К и гемин. Для создания условий анаэробноза используют общепринятые методы: культивирование на жидких средах под слоем вазелинового или парафинового масла, добавление в среды редуцирующих веществ, на плотных средах в анаэробстабах с удалением воздуха при помощи вакуумного насоса до необходимой степени разрежения или заменой воздуха газовой смесью (Н₂ - 10%, СО₂ - 5%, Н₂О — 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% танина (95%) 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 по окраске. При выращивании на кровяных агаровых средах (кровь, кровяная) 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 посеве методом заливок в глубину глюкозного агара на 4-5-е сутки образуются

... небольшие чечевицеобразные серовато-белые колонии. Величина и форма колоний зависят от плотности агара. В сывроточном агаре через 3-4 суток формируются непрозрачные четко контурированные колонии с выделением 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 сернокислого железа происходит ее почернение ввиду выделения возбудителем сероводорода. В среде Кита-Гароцци рост наблюдается через 15-48 часов инкубирования в нижних слоях питательной среды, позднее — в верхних. Через 9-10 часов среда просветляется, на кусочках печени формируется ватообразный 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 0,3-0,7 мкм. Характерным является неравномерное зернистое окрашивание клеток возбудителя, что хорошо проявляется при фиксации мазков спиртом-эфиром и окрашиванием в течение 2-3 секунд фуксином Циля, метиленовым 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 глутамат, эскулин, образовать индол, сероводород, кислоту из углеводов. Для возбудителя нехарактерно: отсутствие способности к гидролизу гиппурата, глюкозы, образованию кислоты из галактозы, маннозы, целлобиозы, меланнона, сахарозы, трегалозы, раффинозы, салицина; возбудитель неопосредованно расщепляет глюкозу, дает кислотообразование на среде с фруктозой, сахарозой, мальтозой. Огдельные штаммы могут ферментировать инулин, дульцит, глицерин; не расщепляет желатину и свернутую сыворотку, не восстанавливает нитраты, образует индол и сероводород. Критерии идентификации *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 | <i>F.necrophorum</i> | <i>F.necrogenes</i> | <i>F.russii</i> | <i>F.similae</i> | <i>F.gonidioformans</i> | <i>F.pseudonecrophorum</i> |
|------------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|------------------|-------------------------|----------------------------|
| Гидролиз гиншурата | - | - | -/+ | + | V | н.д. |
| Гидролиз эскулина | - | + | - | - | - | - |
| Рост в среде с желчью (20% КРС) | -/+ | -/+ | - | + | - | + |
| Образование индола | + | - | - | + | + | + |
| Образование H ₂ S | + | + | -/+ | + | + | + |
| Гемолиз | β/a | β/- | -β | - | a/- | - |
| Образование кислоты из: Глюкозы | -/w | w/- | - | + | - | w |

| | | | | | | |
|------------|-----|------|---|---|---|---|
| У кроликов | - | н.д. | - | - | - | - |
| У свиней | - | w/+ | - | - | - | - |
| У лошадей | w/+ | w/+ | - | + | - | w |
| У овец | - | -/w | - | - | - | - |
| У коз | - | -/w | - | - | - | - |
| У коров | - | -/w | - | - | - | - |
| У собак | - | -/w | - | - | - | - |
| У кошек | - | -/w | - | - | - | - |
| У птиц | - | -/w | - | - | - | - |
| У рыб | - | -/w | - | - | - | - |

Примечание: w — слабая реакция; н.д. — нет данных; v — варьирующая реакция.

У кроликов при заражении в кожу живота процесс распространяется на подкожную клетчатку, брюшные мышцы, развивается перитонит. При генерализации процесса некротические очаги возникают в печени, сердце, легких и других органах. При заражении под кожу уха на месте инъекции формируется язва, затем наступает парез уха и некроз кожи головы. При заражении слабовирулентными штаммами процесс развивается медленно и некротические очаги обнаруживаются во внутренних органах.

Таблица 88 - Свойства биотипов *F. necrophorum* (Fievel, 1963)

| Свойство | A | Биотип АВ | B | C |
|--|-----|-----------|---|---|
| Устойчивость к лизису эритроцитов | + | +/- | - | - |
| Устойчивость к окислению | + | + | + | - |
| Рост в жидкой питательной среде | - | +/- | + | - |
| Устойчивость для мышей суточной культуры | +++ | ++ | + | - |

У зараженных мышей некротический процесс локализуется в коже у основания хвоста, захватывает глубокие ткани. Мыши обычно погибают через 8-10 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 около 2 мл из сердца (2 мл) и высевать на сывороточный (10%) агар (рН 7,0) в чашках Петри. Из выросших колоний культуру возбудителя отбирают на различные питательные среды (10%-ный сывороточный бульон).

Из живых 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 контагиозная болезнь овец и коз, характеризующаяся мацерацией и последующем разрывом 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 со свежепораженных 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 жидкой материал отсасывают в стерильные шприцы, удаляют из них воздух, и закрывают. Посмертно отбирают кусочки свежепораженной ткани размером 2 см³. Материал можно также собирать стерильными тампонами, свободными от кислорода, стерилизованными во флаконах, заполненных этим. Процедура взятия материала такими тампонами проводят мало, так как это быстро и затем тампон глубоко погружают в транспортную среду Сэгу-Блайг. Кусочки тканей, шприцы с материалом помещают в стерильные анаэробные контейнеры, пластиковые термостабильные контейнеры с газогенерирующим содержимым и индикатором анаэробных условий. Исследуемый материал хранят (транспортируют) при температуре 4-6° С. Все виды материалов необходимо исследовать в течение пяти дней.

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) грамотрицательные палочковидные бактерии, прямые или слегка изогнутые, часто с более толстыми концами. Оба конца клетки утолщены и окрашены более интенсивно, чем центральная часть бактерии («гантелевидные» бактерии); располагаются одиночно или последовательно парно. Нередко клетки возбудителя окружают

...отходящими мелкими грамтрицательными бактериями (фермент Бактериджа).

Наряду с *B. nodosus* в мазках в большом количестве присутствуют сопутствующие микроорганизмы (кокки, палочковидные клетки, спирохеты). Клетки *F. necrophorum* обычно длинные и нитевидные с характерной неравномерностью в окраске. Обычно в поле зрения обнаруживают от 5 до 10 клеток возбудителя, и при хроническом течении болезни при выявлении *B. nodosus* необходимо просмотреть несколько полей зрения. Эффективно использование на этой стадии исследования метода флуоресцирующих антител.

Посев и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *B. nodosus* — строгий анаэроб, температурный оптимум 37-38° С, pH 6,7-7,2. Анаэробные условия создают путем удаления из инкубатора воздуха до разрежения 25 мм ртутного столба с последующим введением 5-10% CO₂, 5-10% H₂ или азота с 10% H₂. Процедуру повторяют трехкратно. Для этой же цели могут быть использованы газ-пакеты. В обоих случаях используют в качестве индикатора анаэробнозависимый раствор метиленового синего, который при pH 7,0 и Eh 71 мВ полностью окислен (окрашен), а при Eh 49 мВ — восстановлен (бесцветный). Посев и культивирование осуществляют в соответствии с принципами Хангейта для строгих анаэробов. Агаровые среды в чашках Петри выдерживают в анаэробных условиях до посева в течение 8-24 часов и сразу же после посева помещают в анаэробные условия. Если такой возможности нет, чашки помещают в сосуд, продуваемый CO₂ свободным от кислорода. Посев проводят платиновыми или никелевыми, но не нихромовыми петлями. Петли, используемые для посева, предварительно заполняют стерильным газом. Манипуляции при посеве исследуемого материала на питательной среде осуществляют в потоке CO₂ свободного от кислорода.

Первичные посевы производят на обогащенные плотные агаровые среды кровяной (5%) агар на основе сердечно-мозгового, триптического агара, бруцелла-агара, плотной среды Бектемирова. К указанным средам в качестве стимулятора роста добавляют витамин К, гемин и ферментный экстракт. В качестве питательной селективной среды, а также для обнаружения пигментообразования применяют Brucella-агар с канальцином, который добавляют до автоклавирования, ванкомицином и 5% кровью. Последнюю получают путем трехкратного замораживания и оттаивания.

Для жидкие питательные среды особенно ценен, если по данным биохимического исследования содержание *B. nodus* в материале неве-

лико. Используют тиогликолатный бульон, среду Кита-Тароцци, мясо-пептонный бульон с глюкозой, в которые также вносят витамин К-геминовую добавку. Жидкие среды перед посевом прогревают в кипящей водяной бане 15-20 минут, охлаждают и при посеве по возможности встряхивают. Посев производят пастеровскими пипетками. Инкубирование проводят при 37° С 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 СО₂. 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 консистенции питательной среды. На кровавом агаре с 1,5% агар-агара большинство штаммов образуют мелкие (до 1 мм), гладкие, плоские, прозрачные, с выпуклым центром и неровными краями колонии. На аналогичной среде с 3% агар-агара тот же вирулентный штамм формирует более крупные (диаметр 1,5-2,0 мм) шероховатые колонии. Гемолитической активностью *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 жидкой 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 из них. Из культуры из подозрительных колоний после микроскопического исследования тивают 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 исследуемом материале. Возбудитель не образует жгутики, капсулу, споры. При окраске 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

(1% -ный, вес/объем) вносят бактериологическую петлю 48-часовой культуры изучаемой колонии с плотной среды и суспендируют на площади 1 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, желатиназу, гемолизин, разлагать мясо, гидролизовать крахмал, эскулип, образовывать кислоту из сахаров и высокоатомных спиртов. При пересеве культур соблюдают требования относительно создания анаэробноза, изложенные выше.

Для исследования указанных признаков используют обычные методы или коммерческие анаэробные идентификационные системы API 20A, API-ZYM, ATB 32A, Minitec anaerobic II и др. Для *B.nodosus* характерна инертность в отношении углеводов и многоатомных спиртов, образование сероводорода, желатиназы, разложение мяса, отсутствие индола, гемолизина, уреазы, пигмента на агаре с лаковой кровью, отсутствие роста или очень слабый рост на питательных средах с 20% желчи крупного рогатого скота.

Сериологическая идентификация *B.nodosus*. На стадии работы со штаммами и чистыми культурами *B.nodosus* идентификация возбудителя 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 надрезном виде или разводят стерильным физиологическим раствором 1:5. В надрезной щели скальпелем делают 10-15 поверхностных линейных разрезов эпидермиса кожи и втирают исследуемый материал. Дополнительно в копытцевые щели помещают ватные тампоны, пропитанные мазью, и копытца на 2-3 дня забинтовывают. Заражение овец проводят в темноте, животных содержат на влажной подстилке. Как положительный результат биопробы расценивают появление на 4-6-е сутки язвочек 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 препараты 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* изложены 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, добавляют 100 мл воды, автоклавируют при 121° С 15 минут.

б) Раствор витамина К (менадион): 100 мг менадиона растворяют в 20 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 копытцев заливают водопроводной водой и варят в закрытой кастрюле 2-3 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 агара, устанавливают pH 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% дефибрированной 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 10 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 овцы высушивают и тонко измельчают до получения порошка, смешивают 1 часть порошка и 9 частей 0,8%-ного раствора хлорида натрия. К 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, после чего фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют через фильтр Зейтца.

Лабораторная диагностика дизентерии свиней

Дизентерия свиней — инфекционная болезнь, характеризующаяся геморрагическим поносом и некротическим поражением толстых кишок. Высокочувствительны свиньи всех возрастов, но чаще молодняк 1-6-месячного возраста. Возбудитель — анаэробная, грамотрицательная, извитая бактерия *Serpulina hyodysenteriae* (ранее *Treponema hyodysenteriae*), относится к роду *Serpulina*, семейству *Spirochaetaceae*. Род *Serpulina* содержит два вида, 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 ввиду и 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). Исследования 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* грамотрицательные, спиралевидные, завитки крушной правильной формы в количестве 2-4, может быть 8-10, концы заостренные, размер 0,3-0,4x7-9 мкм.

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 скольжение, при температуре 37-42°C — активное змеевидное поступательное движение. Кишечные кампи-лобактерии гораздо толще спирохет, имеют тупые концы, движутся, вращаясь вокруг оси. Для увеличения контрастности можно к исследуемому 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 воду и спирт, 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 над пламенем горелки, но лучше этанолом или метанолом. Окрашивают по Граму, фуксином Пфейффера, по Романовскому-Гимза, краской виктории голубой. Последний краситель готовят следующим образом: в 5 мл этилового спирта (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 атмосфере, обогащенной CO_2 или N_2 10% CO_2 температурный оптимум 42°C , 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 холестерол, поэтому в среды добавляют бычий сывороточный альбумин или сыворотку крови. Поскольку исследуемый материал содержит другие анаэробные контаминанты, то для первичной изоляции обычно используют плотные элективные среды с добавлением крови, так как по гемолитической активности ориентировочно можно дифференцировать *S. hydrodysenteriae* и *S. innocens*, например кровяной агар на триптиказовой основе или на базе перевара Хоттигера.

Для культивирования (субкультивирования) можно использовать жидкую или полужидкую среды, содержащие сердечно-мозговую вытяжку и 10% эмбриональной телячьей или кроличьей сыворотки.

Последуемый материал суспендируют в стерильном забуференном физиологическом растворе 1:10, крупные частицы осаждают слабым центрифугированием или отстаиванием взвеси (20-30 минут). Надосадочную жидкость засевают на питательные среды в настольном боксе, освобожденном от кислорода. Рекомендуется для освобождения от контаминантной жидкости перед посевом последовательно пропускать через фильтры с уменьшающимся диаметром пор: 0,8-0,65- 0,45 мкм.

Культивирование осуществляют в анаэростатах типа ЛП-115, Лаборатория (Венгрия), вакуумных термостатах, заполненных газовой смесью, состоящей из 80% H_2 и 20% CO_2 , при 42°C в течение 48-72 часов.

Поможет несколько иной вариант выделения серпулин. В агаровой чашке в чашке Петри вырезают углубление диаметром 2-10 мм и глубиной 4-10 мм, но не достигающее 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 анаэростате от 4 до 7 дней при 37°C . 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 споровых) засевают субкультуру на восстановленную плотную среду с целью получения изолированных колоний.

На кровяных плотных средах *S. hydrodysenteriae* через 48 часов инкубации 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 первичных культур серпулины имеют 3-8 завитков, несколько крупнее (14-26x0,3-0,4 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 кишечных 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 индообразование.

Таблица 89 - Дифференцирующие признаки видов рода *Serpulina*

| Признаки | <i>S. hyodysenteriae</i> | <i>S. innocens</i> |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------|
| Сбраживание | - | + |
| | + | - |
| Образование индола | + | - |
| β-гемолиз | выраженный | слабый |
| Тест на интенсивность гемолиза | + | - |
| Оптимальная температура | 42° С | 37° С |
| Патогенность для свиней | + | - |

¹⁾ *S. hyodysenteriae* не ферментирует арабинозу, целлобозу, эскулин, эритрит, галактозу, лактозу, гликоген, амигдалин, маннит, маннозу, меле-цитозу, рибозу, салицин, крахмал, трозу, трегалозу, ксилозу, кроме мальтозы расщепляет глюкозу (Smibert, 1984).

Тест на интенсивность гемолиза проводят следующим образом. В течение 4 суток выращивают в агаровой среде, затем вырезают агаровый блок (0,5 см²), помещают его на свежий кровяной агар и выжи-

паруют 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 поверхность агаровой культуры помещают индикаторную бумажку. *S. hyodysenteriae*, в отличие от *S. innocens*, образует индол, и бумажка синееет. Индикаторные бумажки пропитывают 1%-ным раствором пара-диметил-анилинобензоальдегида в 10%-ном растворе соляной кислоты.

Питательные среды

Триптический соевый кровяной агар со спектомицином. Соевую муку смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1:3 и, помешивая, кипятят в течение 15-20 минут. Остужают до 40°C, при помощи 10%-ного едкого натра доводят pH до 8,0, вносят фарш поджелудочной железы крупного рогатого скота (10%) и 2% хлороформа (объем/объем). Стеклянные банки закрывают резиновой пробкой, перемешивают через 0,5-1-2 часа 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, устанавливая 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 15 минут, фильтруют, добавляют 2% агара. Затем емкости с питательной средой переносят в герметический настольный бокс, в течение пяти минут через среду пропускают свободный от кислорода CO₂ 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 CO₂ или азот, после застывания агара до 42-45°C в него вносят спектиномицин (400 мкг/мл), 10% дефибрированной крови барана, разливают по чашкам Петри и оставляют в боксе до застывания. Слой агара в чашках должен быть толщиной около 0,5 см.

Кровяной агар со спектомицином на основе перевара Хоттингера

В перевар Хоттингера добавляют 0,001% резазурина (индикатор окислительности), 0,5% натрия хлорида, 0,25% глюкозы, 1% пептона, 2% агара, кипятят, пропускают через среду азот или углекислый газ в течение 10-15 минут, регулируют pH 7,0-7,2, вносят 0,05% солянокислого цистеина, автоклавизируют при 110°C в течение 30 минут, охлаждают до 42-45°C, пропускают при этом через среду обескислороженный газ, вносят 10% сте-

рильной дефибрированной крови барана (КРС) и 400 мкг/мл спектиномицина. Среду разливают по культуральным сосудам в атмосфере CO_2 (см. выше).

Среда RGCA-SC (Holdeman L.V. et al., 1977). Глюкоза — 0,0248 г, целлобиоза — 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, Biologicals, 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 в двух пробирках расплавляют, охлаждают до 50°C и добавляют в каждую из них следующие компоненты: стерильную, инактивированную (60°C , 4 часа) сыворотку крови кролика — 1,5 мл; раствор кокарбоксилазы (тиаминпирофосфата 0,025%), стерилизованный фильтрованием — 0,2 мл; стерильный, предварительно восстановленный бульон РУ — 2,0 мл. Компоненты перемешивают и содержимое обеих пробирок выливают в чашку Петри. Среду хранят в анаэробостате 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-соевый агар. Например, кровяной агар Хоттингера готовят следующим образом: к перевару Хоттингера добавляют 0,001% резазурина (индикатор ОКНН), 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 $40\text{--}45^\circ\text{C}$, пропускают при этом через среду обескислороженный газ, после чего вносят 10% дефибрированной стерильной крови барана (КРС) и 400 мкг/мл спектиномицина. Среду разливают в атмосфере углекислого газа.

Лабораторная диагностика кампилобактериозов

Кампилобактерии представляют собой грамотрицательные подвижные бактерии, которые объединены в род *Campylobacter*, включающий 13 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 кампилобак-

титре крупного рогатого скота дополняется данными по обнаружению секреторных антител во влагалищной слизи, у овец применяют как метод серологической диагностики пробирочную РА.

Бактериологическое исследование

Для диагностики генитального кампилобактериоза при бесплодии крупного рогатого скота берут слизь из шейки матки от 10-20 живогных стада, препуциальные смывы у быков. Слизь получают с помощью полистироловых пипеток, соединенных со шприцом, или стерильным марлевым тампоном при помощи инструментов Жабоседова или Павловского.

Тампоны со слизью помещают в пробирки с 3-5 мл стерильного физиологического раствора. Если нет возможности произвести посевы 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 триглицолатный 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, почки, 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 см. Через трубку пропускают прочную нитку. Один ее конец привязывают к марлевому тампону из куска марли размером 10x10 см, тампон вводят внутрь цилиндра, концы которого и всю трубку в целом оберывают 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 дру-

гие виды), для исследования берут фекалии, содержимое киничника и помощью ректальных тампонов.

Таблица 90 - Экология и патогенные свойства кампилобактерий

| Вид кампилобактерий | Хозяин | Патогенные свойства |
|---|---|--|
| 1 | 2 | 3 |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> (син. <i>Vibrio fetus</i> sb. <i>venerealis</i>) | Крупный рогатый скот. Обитает в прспуции клинически здоровых быков. | Вызывает генитальный кампилобактериоз крупного рогатого скота (энзоотический аборт). Возбудитель передается половым путем, при искусственном осеменении, у не иммунных животных вызывает катаральный и гнойный метрит, гибель эмбрионов в 2-4-недельном возрасте. На более поздней стадии развития плода аборты не характерны. |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> (син. <i>C. fetus</i> sb. <i>intestinalis</i> , <i>Vibrio fetus</i> sb. <i>intestinalis</i>) | Овцы. Комменсал кишечника тракта. | Возбудитель генитального кампилобактериоза овец, передается орально-фекальным путем. Источником возбудителя являются животные-носители. Проявляется абортами во второй половине суягности. |
| | Крупный рогатый скот. Комменсал кишечника | Возбудитель спорадических абортов. Передается в основном орально-фекальным путем. |
| | Человек | Вид редко встречающийся при патологии. |
| <i>C. jejuni</i> (син. <i>C. fetus</i> sb. <i>jejuni</i> , <i>V. jejuni</i>). | 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 выражен. Клинически проявляется у собак, кошек, телят обычно до 14-дневного возраста. У овец, свиней и лошадей наблюдают энтериты этой этиологии реже, куры обычно не болеют. У овец и коз может вызвать спорадические аборты, у коров маститы. У птицы является причиной вибриозного гепатита. Возбудитель передается орально-фекальным путем. Является возбудителем острой кишечной инфекции у человека. |
| <i>C. mucosalis</i> <i>C. hyointestinalis</i> | Основной хозяин - свинья. Обитают в кишечном тракте здоровых свиней. | Возбудители кишечного аденоматоза у поросят 6-20-недельного возраста: пролиферации и некроза кишечника илеоцекума, одновременно развивается некротизирующий энтерит. Кампилобактерии локализуются интрацеллюлярно, поэтому фекалии для лабораторного исследования брать бесполезно. |
| <i>C. coli</i> (син. <i>V. jejuni</i> /коли вибрион). | Свиньи, человек | Комменсал кишечника тракта свиней. Может быть причиной легких диарей у свиней и абортов у человека. Нередко ассоциируется с патогенной, вызываемой у свиней <i>S. hyodysenteriae</i> . |

| | | |
|-----------------------------|------------------------------------|--|
| <i>Campylobacter coli</i> | Крупный рогатый скот | Комменсал генитального тракта коров и препуция быков, рассматривается как непатогенный вид. |
| <i>Campylobacter fetus</i> | Овцы, крупный рогатый скот | Обнаруживают в кишечном тракте, выделяют из вагины и спермы крупного рогатого скота. Рассматривается как непатогенный вид. |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Человек | Комменсал ротовой полости. Рассматривают как непатогенный вид. |
| <i>Campylobacter coli</i> | Собаки, лошади, свиньи | Выделяют из фекалий. Патогенные свойства неизвестны. |
| <i>Campylobacter coli</i> | Собаки, человек | Изолируют от клинически здоровых особей и с симптомами диарии. Патогенные свойства неизвестны. |
| <i>Campylobacter fetus</i> | Крупный рогатый скот, овцы, лошади | Выделяют из кишечного тракта здоровых животных, иногда из абортированных плодов. |

Для транспортировки и хранения материала целесообразно применять среду Керри-Блер или ее модификационный вариант с добавлением азота. 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 колита 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. На Граму кампилобактерии в препаратах окрашиваются слабо, грамореактивные, капсул нет, есть жгутики. В мазках из абортированных плодов и другого материала кампилобактерии имеют характерную форму палочек, летящей чайки, S-образную форму, средние размеры 0,5-8x0,2-0,4 мкм. В материале от давно зараженных или леченных животных могут быть выявлены клетки возбудителя в виде длинных спирилл, слабо окрашенных палочек и мелких кокковидных форм.

В мазках из исследуемого материала возбудителей генитального кампилобактериоза можно обнаружить и идентифицировать при помощи флуоресцирующих антител. Результаты люминесцентной

гие 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</i> subsp. <i>venerealis</i> (син. <i>Vibrio fetus</i> sb. <i>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 иммунизированных вызывает катаральный и гнойный метрит, гибель эмбрионов в 2-4-недельном возрасте. На более поздней стадии развития плода абортны характерны. |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> (син. <i>C. fetus</i> sb. <i>intestinalis</i> , <i>Vibrio fetus</i> sb. <i>intestinalis</i>) | Овцы. Комменсал кишечника тракта. | Возбудитель генитального кампилобактериоза овец, передается орально-фекальным путем. Переносчиком возбудителя являются животные-носители. Проявляется абортными во второй половине беременности. |
| | Крупный рогатый скот. Комменсал кишечника | Возбудитель спорадических абортов. Передается в основном орально-фекальным путем. |
| | Человек | Вид редко встречающийся при патологии. |
| <i>C. jejuni</i> (син. <i>C. fetus</i> sb. <i>jejuni</i> , <i>V. jejuni</i>). | 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 и малым течением, у молодняка более выражен. Клинически проявляется у собак, кошек, телят обычно до 14-дневного возраста. У овец, свиней и лошадей наблюдают энтериты этой этиологии реже, куры обычно не болеют. У овец и коров может вызвать спорадические аборты, у коров - маститы. У птицы является причиной вибриоцикла гепатита. Возбудитель передается орально-фекальным путем. Является возбудителем острой кишечной инфекции у человека. |
| <i>C. mucosalis</i> <i>C. hyointestinalis</i> | Основной хозяин - свинья. Обитают в кишечном тракте здоровых свиней. | Возбудители кишечного аденоматоза у поросят 6-20-недельного возраста: пролиферация энтероцитов илеоцекума, одновременно развивается некротизирующий энтерит. Кампилобактерии локализируются интрацеллюлярно, поэтому фекалии для лабораторного исследования брать бесполезно. |
| <i>C. coli</i> (син. <i>V. jejuni</i> /коли вибрион). | Свиньи, человек | Комменсал кишечника тракта свиней. Может быть причиной легких диарей у свиней и абортов у человека. Нередко ассоциируется с патологией, вызываемой у свиней <i>S. hyodysenteriae</i> . |

| | | |
|--|------------------------------------|--|
| <i>Campylobacter coli</i> | Крупный рогатый скот | Комменсал генитального тракта коров и пре-пуция быков, рассматривается как непатогенный вид. |
| <i>Campylobacter fetus</i> | Овцы, крупный рогатый скот | Обнаруживают в кишечном тракте, выделяют из вагины и спермы крупного рогатого скота. Рассматривается как непатогенный вид. |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Человек | Комменсал ротовой полости. Рассматривают как непатогенный вид. |
| <i>Campylobacter parvulus</i> | Собаки, лошади, свиньи | Выделяют из фекалий. Патогенные свойства неизвестны. |
| <i>Campylobacter fetus subsp. jejuni</i> | Собаки, человек | Изолируют от клинически здоровых особей и с симптомами диарей. Патогенные свойства неизвестны. |
| <i>Campylobacter fetus subsp. jejuni</i> | Крупный рогатый скот, овцы, лошади | Выделяют из кишечного тракта здоровых животных, иногда из абортированных плодов. |

Для транспортировки и хранения материала целесообразно применять среду Курри-Блер или ее модификационный вариант с добавлением азота. 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 колита 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. Граму кампилобактерии в препаратах окрашиваются слабо, грам-отрицательные, капсул нет, есть жгутики. В мазках из абортированных плодов и другого материала кампилобактерии имеют характерную форму палочек, летящей чайки, S-образную форму, средние размеры 0,5-8x0,2-0,4 мкм. В материале от давно зараженных или леченных животных могут быть выявлены клетки возбудителя в виде длинных спиралл, слабо окрашенных 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

пробирки высоким столбиком. По высоте столбика питательной среды градиент концентрации кислорода. Пробирки с посевами по анаэробостат с заменой 10-15% объема углекислотой. Кампиллобактерии растут в оптимальной для себя микроаэрофильной зоне.

Материал, поступающий для бактериологического исследования, контаминирован посторонней микрофлорой. При исследовании (секрета), цервикальной слизи, препуциальных смывов их центрифугуют 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость высредосредственно на питательные среды или подвергают фильтрации через мембранные фильтры, благодаря чему задерживаются грибы, бактерии. Проходят только мелкие бактерии размером 0,2-0,5 мкм — число кампилобактерии. Предназначенный для этого смонтированный фильтр Зейтца и колбу Бунзена стерилизуют в автоклаве, мембранные фильтры № 2 и № 5 кипятят в дистиллированной воде 10 минут в кипящей воде. В стерильных условиях мембранные фильтры закладывают в последовательности № 5 — № 2 — № 5. Фильтруют на питательные среды.

При исследовании абортированных плодов посевы делают из содержимого легких, печени, головного мозга, амниотической жидкости, других участков плаценты. На ПЖА высевают по 0,5 мл содержимого двенадцатиперстной кишки, околоплодных вод и желчи. Куриные эмбрионы, печени, котиледонов, мозга и легких растирают в ступке отдельно из каждого органа на 3-4 пробирки с ПЖА и три пробирки с питательной средой. Также можно производить посевы пастеровскими пробирками. Посев материала на ПЖА проводят пастеровской пипеткой на расстоянии 1 см после перемешивания часть материала аналогичным путем высевают также 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 агар, агар Мартена. Вместо мясной воды при изготовлении сред используют экстракт мышцы сердца крупного рогатого животного, а также их кровью крупного рогатого скота, овец, кроликов (5-10%), экстрактом сухих дрожжей (5-10%) и также добавляют тиогликолат натрия (0,5 г/1000 мл).

При исследовании загрязненного материала, кроме перечисленных питательных сред используют на среды с селективными свойствами: плотную среду с метиленовым синим (СЖН), оптимальные плотные питательные среды с селективной средой 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

микроскопии позволяют дифференцировать патогенные кампилобактерии от сапрофитирующего 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 подозрения на кампилобактериоз является обнаружение подвижных бактерий штопоровидной формы.

Выделение и идентификация кампилобактерии

Культивирование. Кампилобактерии являются микроаэрофилами 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 анаэрозат, оставляют 2/3 воздуха (следят по манометру), затем добавляют углекислоту до отметки 0,5.

Из микроанаэростата с посевами удаляют 2/3 воздуха, затем восстанавливают обычное атмосферное давление, вводя газовую смесь из 90% азота и 10% углекислого газа. Конечная газовая смесь содержит 6% кислорода, 6% углекислого газа и 88% азота.

Чашки Петри с посевами помещают в герметичные полиэтиленовые пакеты, которые заполняют из баллона газовой смесью (азот — 85%, углекислый газ — 10%, кислород — 5%). Пакет сжимают, удаляя газовую смесь, и вновь заполняют ею, процедуру повторяют двукратно, после чего пакет заклеивают липкой лентой.

Используют газогенераторные пакеты. В герметично закрывающийся сосуд (микроанаэрозат, эксикатор) помещают чашки Петри с посевами. Увлажненные газпакеты и сосуды закрывают. Могут быть использованы пакеты фирм BBL (Campy Pak 2) Oxoid.

В эксикатор с посевами помещают зажженную свечу, закрывают его. После затухания свечи газовый состав в сосуде составляет: азот — 90%, углекислый газ — 3%, кислород — 17%. Чистые культуры кампилобактерии в этих условиях растут недостаточно хорошо.

Микроаэрофильные условия также достигаются посевом материала (культур) в ПЖА (0,15-0,2%) и среду СЖН, налитые в бактериологиче-

вы пробирки высоким столбиком. По высоте столбика питательной среды имеется градиент концентрации кислорода. Пробирки с посевами помещают в анаэробстат 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 их центрифугируют 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость высевают непосредственно на питательные среды или подвергают фильтрации через мембранные фильтры, благодаря чему задерживаются грибы, крупные бактерии. Проходят только мелкие бактерии размером 0,2-0,5 мкм, 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 на сменной воде. В стерильных условиях мембранные фильтры закладывают в фильтры Зейтца в последовательности № 5 — № 2 — № 5. Фильтры засевают на питательные среды.

При исследовании абортированных плодов посевы делают из содержимого желудка, легких, печени, головного мозга, амниотической жидкости, отдельных 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 шпательками. 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 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).

Посевы загрязненного материала, кроме перечисленных питательных сред, делают на среды с селективными свойствами: плотную среду № 3, 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°C 4-10 дней в атмосфере с 6% кислорода, 10% углекислого газа, 84% азота, просматривая посевы каждые 3 дня.

Смешанные культуры кампилобактерии дробно рассеивают (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 5 г фекалий развести в 50 мл бульона, для удаления крупных частиц профильтровать через марлю, затем фильтр из стеклянной ваты и мембранный фильтр с порами 0,65 мкм. Фильтрат высеивают в чашки Петри с агаром для бруцелл, содержащим бацитрацин (2 ед/мл) и новобионин (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 высеивают 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 (кровяной 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, Самру-Тхио и др.) или плотные среды с селективными добавками (среды Скирроу, Бутцлера, Самру-ВАР, Престон).

Материал, находящийся в транспортных средах, допускается выдерживать в холодильнике до 24 часов. Если посев может быть произведен непосредственно после поступления материала в лабораторию, то его выдерживание в холодильнике нецелесообразно. Метод фильтрации при низком содержании в материале кампилобактерии, несколько снижает чувствительность исследования. Из отечественных питательных сред для первичной изоляции кампилобактерии в качестве основы рекомендуют эритроцит агар Дагестанского НИИ с 5%-ной лизированной дистиллированной водой крови барана. Для придания селективных свойств в ре-

плавленную среду предварительно вносят рифампицин — 10 мкг/мл, амфотерицин В — 2 мкг/мл, полимиксин В — 2 мкг/мл, ристомицин — 10 мкг/мл. Помимо эритрит 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°C в течение 2-3 суток, что обеспечивает угнетение роста многих энтеробактерий.

Для изоляции *C. mucosalis* (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. cryaerophila* используют полужидкий агар с 5-флуорацитом (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 поверхностью 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 поверхностью, 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, круглые, слегка приподнятые, просвечивающие, с влажной поверхностью. На плотной питательной среде ВИЭВ возбудители генитального 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 поверхностью 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 от-

37°C 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 внутривентрально или интравaginaльно 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 фекалии развести в 50 мл бульона, для удаления крупных частиц профильтровать 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 новобиоцин (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 (кровяной 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, Самру-Тхио и др.) или плотные среды с селективными добавками (среды Скирроу, Бутцлера, Самру-ВАР, Престон).

Материал, находящийся в транспортных средах, допускается выдерживать в холодильнике до 24 часов. Если посев может быть произведен непосредственно после поступления материала в лабораторию, то его выдерживание в холодильнике нецелесообразно. Метод фильтрации эффективен при низком содержании в материале кампилобактерии, несколько снижает чувствительность исследования. Из отечественных питательных сред для первичной изоляции кампилобактерии в качестве основы рекомендуют эритрит агар Дагестанского НИИ с 5%-ной лизированной дистиллированной водой крови барана. Для придания селективных свойств в фе-

питательную среду предварительно вносят рифампицин — 10 мкг/мл, амфотерицин В — 2 мкг/мл, полимиксин В — 2 мкг/мл, ристомидин — 10 мкг/мл. Помимо эритрит агара, сред Скирроу, Престон может быть использован бруделла-агар с 5% крови овцы, ванкомицина — 10 мкг/мл, полимиксина В сульфата — 2-5 ЕД/мл, тримстаприм лактата — 5 мкг/мл, цефалотина — 15 мкг/мл, амфотерицина В — 2 мкг/мл.

Посевы с целью выделения инкубируют при 42-48°C в течение 2-3 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. cryaerophila* используют полужидкий агар с 5-флуорацином (100 мкг/мл). Температурный оптимум 30°C. Выделенные культуры подращивают 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 поверхностью среды, в 0,5%-ном ПЖА их рост более поверхностный. Культуры непатогенного вида *C. mucosalis* в 15%-ном ПЖА растут диффузно или в виде кольца под поверхностью, а в 0,5%-ном ПЖА растут в виде «елочки» по уколу. На среде СЖН при высеивании 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 Скирроу с эритрит агаром через 48 часов культивирования растет, так же как и *C. fetus*, в виде диска под поверхностью среды. На эритрит агаре через 3 суток образуют полупрозрачные, блестящие, влажные, плоские колонии, как бы расплывающиеся по агару. Штаммы, выделенные от животных, формируют оптически более плотные, вплоть до беловатого от-

тенка, 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-суточных культур, выращенных на полужидких или плотных средах, преобладают длинные спиралевидные формы (*C. fetus*) размером 1-10x0,2-0,8 мкм. На одном или обоих концах клетки имеются жгутики. Для определения подвижности кампилобактерий удобен следующий метод. На предметном стекле смешивают каплю культуры и каплю красителя (азур-эозин 0,1 г, кристаллвиолет — 0,1 г, щавелевокислый аммоний — 0,5 г, этанол — 5 мл, дистиллированная вода — 120 мл, после растворения компонентов добавляют 180 мл физиологического раствора). Готовят препарат «раздавленная капля» и исследуют под иммерсионной системой микроскопа.

В 6-9-суточных культурах на плотной среде могут присутствовать клетки с колбообразными вздутиями, на недоброкачественных средах и в старых культурах много кокковидных клеток.

Таблица 91 - Дифференциальные признаки кампилобактерий

| Признаки | <i>C. coli</i> | <i>C. caryaerophila</i> | <i>C. fetus</i> | | <i>C. hyointestinalis</i> | <i>C. jejuni</i> | | <i>C. lari</i> | <i>C. musosalis</i> | <i>C. sputorum</i> | | |
|--------------------------------------|----------------|-------------------------|-----------------|-------------------|---------------------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| | | | subsp. fetus | subsp. venerealis | | subsp. jejuni | subsp. cloylei | | | биовар sputorum | биовар bububus | биовар faecalis |
| 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 | + | - | - | + | + | + | НД | + | + | + | + | + | НД |
| Щелочная фосфатаза | D | - | - | - | - | + | + | | | | | | + |
| Редукция нитратов | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Чувствительность к наледициксовой кислоте (30 мкг на диск) | + | d | - | - | - | + | + | - | d | D | d | - | + |
| Цефалотин (30 мкг на диск) | D | d | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + |

Примечание: "культивирование проводят в тиогликолатной среде;

Признак приведен по результатам определения H₂S при помощи бумажек с уксуснокислым цистеином 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 обильных типичными для кампилобактерий морфологией и тинкторными свойствами, дает основание для изучения других признаков, позволяющих уточнить родовую и видовую принадлежность культур, выращенных при 25°C и 42°C, на среде с 1,5% NaCl, 1% глицина, 1% бычьей желчи, чувствительность к наледициксовой кислоте и цефалотину, а так же гидролиз гиппурата, образование сероводорода, щелочной фосфатазы, редукция 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. jejuni* от «термофильных» представителей рода, способных расти при 42°C. Ряд штаммов *C. fetus subsp. fetus* могут расти при 42°C.

тенка, а от человека — более нежные колонии. При наличии подозрительных колоний на плотных питательных средах и типичного для микророзаэрофилов роста на полужидких средах из культур готовят мазки.

Морфология клеток кампилобактерий в культуре. В мазках из 3-5-суточных культур, выращенных на полужидких или плотных средах, преобладают длинные спиралловидные формы (*C. fetus*) размером 1-10x0,2-0,8 мкм. На одном или обоих концах клетки имеются жгутики. Для определения подвижности кампилобактерий удобен следующий метод. На предметном стекле смешивают каплю культуры и каплю красителя (аурозин 0,1 г, кристаллвиолет — 0,1 г, щавелевокислый аммоний — 0,5 г, этанол — 5 мл, дистиллированная вода — 120 мл, после растворения компонентов добавляют 180 мл физиологического раствора). Готовят препарат «раздавленная капля» и исследуют под иммерсионной системой микроскопа.

В 6-9-суточных культурах на плотной среде могут присутствовать клетки с колбообразными вздутиями, на недоброкачественных средах и в старых культурах много кокковидных клеток.

Таблица 91 - Дифференциальные признаки кампилобактерий

| Признаки | <i>C. coli</i> | | <i>C. fetus</i> | | <i>C. hyointestinalis</i> | <i>C. jejuni</i> | | <i>C. lari</i> | <i>C. musosalis</i> | <i>C. sputorum</i> | | |
|--------------------------------------|----------------|---------------------|-----------------|-------------------|---------------------------|------------------|----------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------|---------------|
| | <i>C. coli</i> | <i>C. cytophila</i> | subsp. fetus | subsp. venerealis | | subsp. jejuni | subsp. cloylei | | | биовар sputorum | биовар bubulus | Кансар Escal. |
| 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 гишурата | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Образование H ₂ S | + | - | - | + | + | + | НД | + | + | + | + | + | НД |
| Щелочная фосфатаза | D | - | - | - | - | + | + | | | | | | + |
| Редукция нитратов | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Чувствительность к налидиксовой кислоте (30 мкг на диск) | + | d | - | - | - | + | + | - | d | D | d | - | + |
| Цефалотин (30 мкг на диск) | D | d | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + |

Примечание: "культивирование проводят в тиогликолатной среде;

Признак приведен по результатам определения H₂S при помощи бумажек с уксуснокислым цистеином 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, выращенных 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 гишурата, образование сероводорода, щелочной фосфатазы, редукцию 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. jejuni* 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 обеспечивают 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 на 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%, 0,5% натрия хлорида, 1% пептона, 2-3% агар-агара (вес/объем). Среду стерилизуют при 115°C 30 минут, охлаждают и добавляют 10% крови барана или 20% стерильного обезжиренного молока (объем/объем). Посева 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 1:50. В качестве контроля используют стерильный физиологический раствор. Для и 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 0,5 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 объемной 4-балльной системе. При отсутствии агглютинации в контроле испытуемую культуру относят к тому виду (подвиду), с сывороткой против которого получен положительный результат. Культуры, имеющие при исследовании диссоциации, могут агглютинировать с несколькими сыворотками. В последнем случае опыт потеряют, используя разведения сывороток до 1:100.

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 люминесцирующих сывороток: 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 кровь 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 влажной 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 иссле-

дуюемого 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 ки после встряхивания помещают в термостат на 24 часа при 37° С. Через 3-6 часов выдерживания компонентов при комнатной температуре учитывают 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 овец 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 на 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 *C.fetus*. Свежая сыворотка крови крупного рогатого скота с содержанием в 1 мл: 5-флуорацил — 300 мг; полимиксин В сульфат — 100 ЕД; бриллиантовый зеленый — 50 мкг; налидиксовая 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 затвердевания. 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°С, используют не ранее чем через неделю в течение 3 месяцев.

Среда Скирроу для выделения *C.fetus*. Состав: кровяной агар № 2 (Oxoid CM 271) — 1000 мл; лизированная дефибрированная овечья кровь — 50 мл; ванкомицин — 10 мг; полимиксин В — 2500 ЕД; тримето

прим — 5 мг. Автоклавированный кровяной агар охлаждают до 5° С, добавляют другие компоненты. Селективная добавка Скирроу (ванкомицин, полимиксин В, триметоприм) в указанных пропорциях может быть внесена в другую подходящую как основу среду.

Жидкая обогатительная среда. Состав: питательный бульон № 2 — 25 г; дистиллированная вода — 1000 мл; лизированная кровь лошади — 70 мл; ванкомицин — 10 мг; полимиксин В — 2500 МЕ; триметоприм — 25 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, пленок, 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 мышцы 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 рН 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 фильтруют через бумажный фильтр. Среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 0,8 атм 25 минут. После стерилизации рН среды равен 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. К 1 кг фарша добавляют 1 л водопроводной воды, настаивают в течение 18-24 часов, затем кипятят в течение 1 часа. После кипячения доливают дистиллированной воды до первоначального объема, фильтруют через 3 слоя марли, разливают по колбам и стерилизуют при 1 атм в течение 30-40 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, 1 г поваренной соли, 20 г агара-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% дефибрированной крови барана или крупного рогатого скота и разливают в чашки Петри по 20 мл.

Полужидкий агар ВГНКИ с 1% глицина. В смесь, состоящую из 100 мл водопроводной, 250 мл мясной и 250 мл печечной воды, вносят 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, распространено 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.minatus*, *Oenithodorus 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 птиц боррелии быстро лизируются.

Микроскопическое исследование исходного материала, обнаружение антигенов возбудителя. Готовят мазки крови, взятой прижизненно из подкрыльцовой вены, гребешка, посмертно — из сердца; мазки — отпечатки из печени, селезенки, почек, костного мозга. Мазки окрашивают по методу Романовского (48-72 ч при комнатной температуре), метиленовым синим и др. методами, используемыми для окраски лептоспир. Применяют метод негативного окрашивания с туши: 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, штопорообразное. Иногда боррелий образуют сплетения из нескольких клеток или выпрямляются, приобретая нитевидную форму. Для обнаружения и идентифика-

ции клеток возбудителя. при наличии меченых антисывороток, применяют реакцию иммунофлуоресценции, для растворимых антигенов — реакцию диффузионной преципитации. До настоящего времени микроскопическое исследование остается основным методом диагностики боррелиоза птиц.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

B. anserina — микроаэрофил, температурный оптимум 28-30° С, рН 7,3-7,5. Посевы производят из крови, печени, селезенки, желчного пузыря, яичников. Особенно эффективны посевы крови, взятой у птицы на стадии лихорадки. Для культивирования применяют стерильную сыворотку крови, яичный белок с добавлением сыворотки крови, среду Терских. Для выделения культур возбудителя применяют также 7-10-дневные куриные эмбрионы, которым вводят 0,2 мл материала (кровь, взвесь ткани паренхиматозных органов) в хориоалантоисную полость. В положительных случаях эмбрионы погибают через 6-8 суток, у них выявляют носительные и дегенеративные изменения.

Рост возбудителя на плотных и жидких питательных средах скудный, для поддержания культур пересевы проводят с интервалом 5-8 суток. На жидких средах рост *B. anserina* можно подтвердить только путем микроскопии препаратов из культуры.

Для длительного хранения штаммов боррелий используют метод глубокого замораживания в жидком азоте. С целью замораживания берут свежесполученную цитратную кровь, содержащую около 6 млрд. микробных клеток в 1 мл и замораживают в жидком азоте. Боррелий сохраняют жизнеспособность и вирулентность в течение года хранения. Боррелий 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 кроликов, морских свинок, белых мышей, куриные эмбрионы.

Кровь и кусочки паренхиматозных органов объединяют, измельчают в ступке, разводят физиологическим раствором 1:10-1:20 и вводят внутримышечно по 2 мл или внутривентриально, 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 период с 48 до 72 часов после заражения (позднее боррелий могут исчезнуть).

Зараженные птицы могут погибать, но не всегда. Для обнаружения возбудителя у зараженной птицы, кроме, того используют РИФ и РДП.

Питательные среды

Сыворотка крови кролика или лошади. Стерильную, инактивированную (58-60° С, 30 минут) сыворотку разливают по пробиркам, вносят небольшое количество стерильного вазелинового масла.

Свернутый куриный белок с сывороткой крови. Стерильно взятый куриный белок разливают по стерильным пробиркам и свертывают в коагулированном 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 микаплазмозов

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 давлению. 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 клеточным микоплазмам необходим низкомолекулярный белок. В связи с вышесказанным 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*. Се-

мейство *Acholeoplasmataceae* 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. Изоляция 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 тампонами, целесообразно помещать в транспортную среду для микоплазм. При транспортировке образцов маститного молока рекомендуется в него добавлять 5 мкг/мл ампициллина.

Прямое микроскопическое обнаружение микоплазм в окрашенных препаратах из исследуемого материала из-за полиморфизма, слабого восприятия красителей 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 высевают в две пробирки с жидкой питательной средой и в две чашки Петри с агаровой средой. Экссудат и фетальную жидкость высевают на среды без 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 измельчать ткани не рекомендуется из-за выделения ингибиторов, приготовление разведений гомогената преследует эту же цель.

Наряду с посевом гомогената рекомендуется производить посев блоками тканей, 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 (100 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 40

минут и делают контрольный высеv на МПА и МПБ. Материал сохраняют при 5-10° С. В случае роста бактерий деконтаминацию проводят повторно. 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°С, 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 производят 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 8 пассажей на жидкой среде с пятидневным интервалом, прежде чем дают отрицательное заключение. С целью выделения уреаплазм 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 культивирование на средах без ингибиторов с целью получения чистой культуры. Из бульонной культуры готовят разведения 10⁻¹-1⁻¹⁰, каждое из которых (0,2-0,3 мл) высевает на две чашки Петри с агаровой средой. Для получения 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 теми 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

мест
ство

С

М.
от тр
блюд
ция м
извед
ченис
го —
нами
При
добав

Пр
пара
ятия
ценн
при

С
две г
вой
пред
кост
тель
тель
ном
ни н
дени
Н
ми т
лью
(гом
тери
стер
(500
ЕД/
риц
Взв

по бактериологической петле каждого разведения высевают на агаровую среду. Процедуру повторяют троекратно с несколькими колониями, так не все колонии дают хороший рост.

Под воздействием ингибиторов, входящих в состав питательных сред для первичного культивирования микоплазм, возможна L-трансформация бактериальных контаминантов, что требует дифференциации колоний L-форм бактерий и микоплазм.

Колонии L-форм бактерий имеют сходную морфологию, но менее 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 пяти дней, периодически просматривая на наличие колоний на агаре и типичных бактериальных клеток 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 с исследуемой колонией, наносят несколько капель красителя Динес (метиленовый голубой — 2,4 г, мальтоза — 10 г, азур II — 1,25 г, натрия 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 синего. Также учитывают, что колонии обычных бактерий при окраске могут смываться, а микоплазм нет.

Для определения морфологических и тинкториальных свойств клеток микоплазм готовят на стеклах отпечатки колоний, бульонную культуру центрифугируют при 10-15 тыс.г, осадок однократно отмывают дистиллированной водой и готовят мазки. Препараты фиксируют метанолом и окрашивают по Граму и краской Романовского-Гимза (1:10) в течение 3-4 часа. По Граму микоплазмы окрашиваются отрицательно, краситель Романовского-Гимза микоплазмы и ахолеплазмы — в светлый фиолетовый, уреаплазмы — в красно-фиолетовый цвет.

Культуры микоплазм в процессе работы поддерживают путем переноса на жидких питательных средах с интервалом 2-3 недели и хранят при 4-5° С. Агаревые культуры сохраняют в замороженном состоянии в виде агаровых блоков при -30 - 40° С.

Родовую идентификацию выделенных чистых культур микоплазм (роды *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*) осуществляют по чувствительности к дигитонину и уреазной активности с учетом диаметра микробиальных колоний по схеме, представленной ниже.

Видовую 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 сердечным 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 позитивные реакции.

Определение потребности в холестерине. От стерола не зависят микоплазмы, требуют его для своего роста микоплазмы, уреоплазмы и эриоплазмы.

Прямое определение потребности микоплазм в холестерине проводят 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). Осажденные 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 жидких средах. Ахолеоплазмы удается пассировать, микоплазмы и эриоплазмы 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 вокруг дисков. Представители семейства *Mycoplasmataceae* и *Spiroplasmataceae* 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 с дигитонином. Готовят 1,5%-ный раствор дигитонина в 95%-ном этаноле при подогревании в водяной бане. На диск из стерильной фильтровальной бумаги диаметром 6 мм наносят по 0,025 мл раствора дигитонина. Диски 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 (лунок планшета) вносят по 0,1 мл фосфатного буфера. В первую лунку добавляют 0,1 мл суспензии микоплазм и готовят последовательные двукратные 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 с эритроцитами. Чашки Петри заклеивают и инкубируют при 37° С трое 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%-ную взвесь, готовят 3,5%-ную основу агаровой среды, разливают по 2 мл в пробирки, автоклавируют, охлаждают до 50° С, вносят в пробирку 0,8 мл 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 лошади, 1,6 мл 25% дрожжевого экстракта, 2,4 мл стерильной воды (рН 7,8). Среду разливают по 2 мл в пробирки, подсушивают под вакуумом 20-30 минут, прогревают в скошенном положении текущим паром в течение 40 минут. В пробирки со средой вносят различные разведения исследуемой культуры и параллельно контрольной культуры, обладающей протектической активностью. Посевы инкубируют в течение 14—20 суток, при

смазывать каждые 2 дня. Положительный результат: появление на поверхности свернутой сыворотки просветлений, углублений, отверстий, полостей, небольшого количества жидкости.

Гидролиз казеина. Приготовление питательной среды. В 120 мл воды растворяют 2 г агара (Оксид). Устанавливают рН 7,6, автоклавируют 15 минут при 121°C. Параллельно в 90 мл воды растворяют 8 г порошка снятого молока («Дифко»), устанавливают рН 7,6, автоклавируют при 121°C в течение 15 минут. Расплавляют агаровый компонент, смешивают с раствором молока и разливают по 2 мл в пробирки. Проведение опыта. Испытуемую культуру выращивают на агаровой среде, молочный агар расплавляют в водяной бане, охлаждают и несколько капель наносят на колонии 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 желатинны. Приготовление питательной среды. В 100 мл воды растворяют 2,5 г сердечного экстракта («Дифко»), 12 г желатинны («Дифко»), устанавливают рН 7,6, разливают по пробиркам по 3 и 7 мл, автоклавируют при 121 °С в течение 10 минут, охлаждают и вносят в каждую пробирку 1 мл сыворотки крови лошади и 0,25 мл 25% дрожжевого экстракта. Проведение опыта. Исследуемую культуру и контрольный (положительный) штамм выращивают на агаровой среде, вырезают агаровый блок с колониями и переносят в пробирку с желатиновым субстратом. Посевы инкубируют при 37° С в течение 30 суток. Результат учитывают с интервалом 14-15 суток, предварительно охладив пробирки при 4°C. В качестве контроля (отрицательного) инкубируют незасеянную пробирку.

Определение уреазной активности. На поверхность колонии наносят реактив, 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 можно выявлять уреазу посевом культуры в жидкую питательную среду для уреазплазм, содержащую 1% мочевины (см. «Среда Ливингстона»). Контролем служат среды без мочевины, а также пробирки, засеянные уреазопозитивным штаммом. Посевы инкубируют при 37° С в течение 5 суток. Защелочение рН среды на 0,5 ед. по сравнению с контрольным оценивают как положительный результат.

Ферментация глюкозы. Известно несколько способов определения ферментации глюкозы. Их общим недостатком является возможное снижение рН за счет присутствующих в среде сыворотки крови и дрожжевого экстракта, причем даже у микоплазм, не ферментирующих глюкозу. Чтобы избежать ошибок, из РРЛО-среды исключают дрожжевой экстракт, снижают 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 результатов используют контроли в диапазоне pH от 8,2 до 6,0 с интервалом 0,2, при помощи которых и учитывают уровень закисления pH. Различия pH в опыте и контроле на 0,5 pH расценивают как положительный результат. При проведении данного теста в качестве базовой используют следующую питательную среду: PPLO-бульон — 70 мл, свежий дрожжевой экстракт (25%-ный раствор) — 10 мл, инактивированная сыворотка крови свиньи или лошади 10—20 мл, глюкоза (50%-ный раствор) — 1 мл, пенициллин (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 пробирку 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 (pH 7,0) — 70 мл, свежий дрожжевой экстракт (25%-ный раствор) — 10 мл, инактивированная 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 изменения pH такие же, как и при изучении ферментации глюкозы. В качестве контролей используют засеянные пробирки с аргинином и без, незасеянные пробирки с аргинином и без него. Как положительный результат оценивают покраснение среды (зашелочение).

Влияние фосфатазы. Фосфатаза гидролизует фенолфталеина дифосфат в свободный фенолфталеин, что приводит к защелочению pH до 9-10. Питательная среда: PPLO-бульон — 74 мл, агар Дифко — 08 г. Смесь автоклавируют, охлаждают до 56° С, добавляют инактивированную 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 половина служит контролем. После инкубации в течение 3 и 5 дней на поверхность опытной и контрольной частей чашки Петри вносят капли 5N NaOH. Наличие покраснения в течение 30 с расценивают как положи-

тельный результат. Для проверки качества среды используют посевы *M.bovis* — положительный результат и *M.arginini* — отрицательный результат.

Определение способности редуцировать тетразол. Агаровую культуру заливают 4 мл смеси из ионагара и трифенилтет-разолийхлорида (водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолий-хлорида и ионагара), инкубируют 4-5 часов при 35° С, результат учитывают через каждые 30 минут. Положительный результат — окрашивание колоний в красный, а затем — в пурпурный цвет за счет образования формазана.

Бульонная культура. Испытуемую культуру засевают в две пробирки с 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 из бульонных культур, колоний на дисках мембранных фильтров, микоплазм в гистосрезах, клеточных структурах. Общие принципы идентификации микроорганизмов прямым и непрямым методом иммунофлуоресценции изложены в разделе «Серологические реакции». Методика идентификации микоплазм в микроколониях на мембранных фильтрах описана в разделе «Микоплазмоз свиней». Наибольшее применение получил метод иммунофлуоресцентного окрашивания колоний на плотных средах, который оценивают как более специфический, чем тесты ингибции 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 бульонной 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 меченой сыворотки (прямой вариант) в рабочем титре, выдерживают при 37° С 30 минут, сливают копьюгат, трижды промывают буферным раствором, после чего просматривают колонии под люминесцентным микроскопом. Колонии, связавшие гомологичные антитела, ярко флуоресцируют. При

на 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 рекомендуется 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 рекомендует 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 ингибиции роста. Основан на ингибиции 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 плотных питательных средах, пропитывают диски фильтровальной бумаги диаметром 6 мм непосредственно перед использованием или хранят их в высушенном 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 выдерживают 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 оценивают как сомнительный результат. При проведении теста ингибиции

роста в жидкой или полужидкой среде предварительно готовят двукратные разведения иммунной и контрольной (нормальной) сывороток в объеме 0,2 мл на изотоническом растворе натрия хлорида, добавляют 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 сыворотки, ингибирующее рост.

Тест ингибиции метаболизма. Может быть проведен на базе любой реакции, отражающей ферментативную активность идентифицируемой 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 иммунных сывороток и в пробирку с каждым разведением вносят 0,1-0,2 мл исследуемой культуры микоплазм (10^2 - 10^3 КОЕ/мл). Контролем служат засевные пробирки без антисыворотки. Посевы инкубируют 3-5 суток и путем сравнения опытных и контрольных пробирок делают заключение о специфической 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, в центральную лунку вносят антиген, в периферические — сыворотки. Учет результатов проводят через 48 часов. С гомологичной сывороткой антиген дает обычно несколько линий преципитации, с гетерологичными — редко одну, слабо выраженную.

Кроме перечисленных серологических реакций используют для идентификации некоторых видов микоплазм иммунопероксидазный тест, РСК. В последние годы с успехом апробирована для указанных целей реакция цепной полимеризации. Штаммы *M.gallisepticum*, а также *M.synoviae*, *M.meleagridis* и других птичьих микоплазм имеют внутримодовые вариации антигенных и вирулентных свойств, что может быть выявлено путем электрофореза белков в полиакриламидном геле, гибридизацией ДНК.

Питательные среды для культивирования микоплазм

Транспортная среда для микоплазм. Дистиллированная вода — 1000 мл, PPL0-бульон — 16,8 г, сыворотка крови лошади — 200 мл, 50%-ный дрожжевой экстракт — 10 мл, DNA (Sigma) — 0,02 г, пенициллин — 2000

ед/л среды, ацетат талля — 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 — 25 мг, натриевая соль пенициллина G — 1000 ед/мл, ацетат талля (1:4000 — 1:2000) — 2,5 — 5,0 мл 10%-ного раствора, дистиллированная вода — 1000 мл. Устанавливают pH 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 талля 10%-ного раствора — 5 мл, натриевой соли пенициллина G 1 000 000 ед, дистиллированная вода — 1000 мл. Устанавливают pH 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 термолabileнных компонентов (сыворотка, NAD, цистеин, пенициллин).

Модифицированная среда Хейфлик. Жидкая среда. Бакто PPLO-Бульон (Difco) — 2,1 г в 70 мл H₂O, сыворотка крови лошади — 20 мл, дрожжевой экстракт — 8 мл, пенициллин 1000 ед/мл, дезоксирибонуклеиновая кислота (Sigma) — 0,002%, ацетат талля — 1:2000, устанавливают pH 7,6 -7,8, стерилизуют фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, разливают по пробиркам и хранят при 5° С. Можно добавить глюкозу (0,5-1,0%) и феноловый красный (1:5000).

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. Агар 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 суспензия¹ — 16,0 мл; индюшиная сыворотка крови 129,0 мл. Устанавливают рН 7,2, хранят в замороженном виде.

Среда для гомогенизации материала при исследовании на свинные микоплазмы. Модифицированный солевой раствор Хенкса (HBSS-A) — 40 мл; HBSS-B — 40 мл; сердечно-мозговой экстракт (Difco) — 5,0 мл; 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; MgCl₂ 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 — 60 мл, бацитрацин (5 000 ед/мл) — 2,9 мл, метициллин (100 мг/мл) — 2,5 мл, феноловый красный (0,5% раствор) — 4,5 мл, свиная сыворотка (инактивированная при 56° С 30 минут) — 165 мл, лошадиная сыворотка — 165 мл. Устанавливают рН 7,5 — 7,6. Хранят при -40° С. Для выделения *M. hyorheumoniae* добавляют антисыворотку *M. hyorhinis* (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-пептон (Difco) — 0,3 г, бакто-дрожжевой экстракт (Difco) — 0,1 г, деионизированная вода — 50 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, NADH (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, сердечно-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%) — 3,65 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 хлорид (2%) — 1,0 мл. Устанавливают pH 7,6-7,8. Плотный вариант среды получают включением вместо бакто PPLO-бульона бакто-агара РРЮ.

Среда Ливингстона. 1 г PPLO-бульона (Difco) без кристаллвиолета растворяют в 70 мл дистиллированной воды, стерилизуют автоклавированием (121° С, 15 минут), добавляют стерилизованные фильтрованием компоненты: неинактивированную сыворотку крови лошади — 30 мл, дрожжевой экстракт — 10 мл, раствор мочевины (10%) — 10 мл, феноловый красный (1%) — 0,2 мл, пенициллин (100 000 ед/мл) — 1 мл. Устанавливают pH 6,04. Для получения плотного варианта среды добавляют 1% агар-агара № 2.

Среда Мартена. В 1 л теплой (50° С) кипяченой водопроводной воды растворяют 250 г фарша из свежих свиных желудков и добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь выдерживают 24 ч

при 45-50° С, периодически помешивая. Прогревают 30 минут текучим паром и оставляют на 5 суток при 4° С. Надосадочную прозрачную жидкость декантируют, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120° С.

Модифицированная плотная среда ВИЭВ. К горячему 20%-ному 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 агар 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 8-8,2 и стерилизуют 30 минут при 120° С. Перед использованием в среду добавляют 10% стерильного дрожжевого экстракта, 20% сыворотки крови лошади и 0,5% глюкозы.

Среда Эдварда. Смешивают 500 мл водопроводной воды и 10 г пептона. Устанавливают рН 8,4. Стерилизуют 30 минут при 120° С. Перед использованием в среду асептически добавляют 20% инактивированной сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта.

Для получения полужидкой или плотной среды Эдварда к жидкой среде 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 40 минут, отстаивают, надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр. Полученный отвар разливают в колбы и стерилизуют 30 минут 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 1 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

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 4-8° 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 1 и печени кур, перемешивают. Выдерживают 12 ч при 4-8° С, прогревают 1 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 — высококонтагиозная болезнь, протекающая в виде крупозной пневмонии и плевропневмонии с последующим развитием анемических некрозов (секвестров) в легких. Возбудитель — *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, род *Mycoplasma*, семейство *Mycoplasmaataceae*. **Лабораторная диагностика** основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

Прижизненно берут носовую слизь тампонами, носовые истечения, жидкость путем пункции грудной полости, кровь. Посмертно отбирают кусочки пораженных легких, плевральную жидкость, регионарные лимфатические узлы. Материал транспортируют в термосе со льдом в нативном виде или в питательных средах, в последнем случае в среду не включают 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 Хейфлик, Эдварда, ВИЭВ, УНИИЭВ, мартеновский бульон с 10-15% сыворотки крови крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта.

Жидкий исследуемый материал, а также гомогенат легочной ткани высевают на агаровые и бульонные среды. Можно делать посев на поверхность агаровой среды кусочками легочной ткани и лимфатических узлов. Целесообразно из жидкого материала (легочная лимфа, плевральная жидкость), тканевого гомогената (10%-ная взвесь в сердечно-мозговом бульоне) 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 полужидкую среду Хейфлик с 0,15% агара увеличивает частоту выделения возбудителя. Посевы 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, изменения цвета. 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 «яичницы-глазуньи» и диаметр 0,1-0,6 мм. На следующем этапе проводят идентификацию колоний микоплазм (или ахолеплазм), 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 ингибиции роста и метаболизма — с диагностическими сыворотками, а также исследуют 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 сы сыворотки 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 сыворотки | Редукция тетразолия натрия | Образование пленки и пятен | Гидролиз желатина | Гидролиз казеина | Гемадсорбирующие свойства колоний |
|------------------------------------|---------|---------|----------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------------------|
| <i>M. abscessus</i> | + | - | + | - | -/- | - | - | н.д. | + |
| <i>M. agni</i> | + | - | - | - | -/+ | - | + | - | - |
| <i>M. bovocapitulum</i> | - | - | + | - | -/+ | + | - | - | d |
| <i>M. bovis</i> | - | + | - | d | + /+ | - | - | + | d |
| <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> | - | - | + | - | + /+ | d | н.д. | - | + |
| <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> | - | + | - | - | + /+ | + | - | н.д. | - |
| <i>M. canadense</i> | + | - | Слабая реакция | - | -/+ | - | н.д. | н.д. | - |
| <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> | - | + | - | - | + /+ | - | н.д. | н.д. | - |
| <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> | - | + | - | + /или слабая реакция | + /+ | - | + /или слабая реакция | + | - |
| Группа 7 Leach | - | + | - | + | + /+ | - | - | - | - |

н.д. — нет данных, d — 11—89% штаммов положительные.

Культуральная

Проводят при возникновении болезни в благополучной зоне на телятах 1-3 месячного возраста путем введения экссудата от больных животных подкожно в область шеи или подгрудка, интратрахеально, интраплеврально или аналогичными способами бульонной культурой. Инкубационный период составляет 6-27 дней. В положительных случаях при подкожной инокуляции материала на месте инъекций развивается воспалитель-

ный отек, подъем температуры до 40-42°C. Летальный исход (не всегда) наступает через 12-15 суток.

Серологическая диагностика

Для выявления антител в сыворотке крови используют РСК, ELISA, РНГА, РА на стекле, латекс-агглютинацию, реакцию конгломинации, тесты инги-биции роста и метаболизма. Циркулирующий антиген может быть обнаружен в РДП. Основным методом диагностики является РСК, которую применяют для выявления в неблагополучном стаде животных с латентным течением болезни. Положительную реакцию дают животные, привитые против ПВЛ в течение 6-8 месяцев, а также инфицированные *M. mycoides subsp. capri*.

РСК ставят в объеме 1,25 мл. Сыворотку крови инактивируют при 56-58°C в течение 30 минут. Используют 3%-ную взвесь эритроцитов. Испытуемые сыворотки разводят 1:5. Первую фазу РСК проводят в водяной бане при 37-38°C в течение 20 минут, вторую — в течение 15 минут. Предварительный учет результатов РСК проводят сразу по завершении реакции, окончательный — через 12-18 часов. Задержку гемолиза на ++, + +, + + +, оценивают как положительный, на ++, + — сомнительный результат. Сыворотки крови животных, которые дали сомнительную реакцию, через неделю исследуют повторно в разведениях 1:5 и 1:10.

Лабораторная диагностика микоплазмозов крупного рогатого скота, сопровождающихся поражением респираторного, генитального тракта и молочной железы

У крупного рогатого скота пневмонию могут, кроме *M. mycoides subsp. mycoides*, вызывать *M. bovis* и *M. dispar*, у гнотобиотических 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 миозитами.

Из генитального тракта крупного рогатого скота могут быть изолированы микоплазмы, уреоплазмы, ахолеплазмы. *Ureaplasma diversum* вызывает гранулярные вульвиты, эндометриты, аборт, сальпингиты, бесплодие, причем заболевание воспроизводится экспериментально

Mycoplasma bovis genitalium является причиной бесплодия, некротизирующего эндометрита, везикулита семенников. Причиной эндометрита

сальпингитов, оофоритов, аборт, 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 — отитисдоны, 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, трапезный материал, сперму, молоко транспортируют в замороженном виде.

Выделение и идентификация культур возбудителей

Культивирование. Материал, взятый при респираторной патологии, в максимально сжатые сроки после поступления высевают на плотные среды Фрисс и Хейфлик. Параллельно материал засевают на аналогичные жидкие питательные среды. Материал, взятый тампонами, а также трахеальные и бронхиальные смывы засевают в бульон в трех разведениях (10^0 - 10^3), легочный гомогенат разводят до 10^9 . Посевы инкубируют при 37°C в CO₂-инкубаторах при высокой влажности. Бульонные посевы через 2-3 дня культивирования высевают на агаровые среды с последующей окраской выросших колоний на жидкие среды. *M. dispar* лучше растет на жидких средах, при изоляции этого вида микоплазм до высева на плотные среды целесообразно провести несколько пассажей на жидких средах. У домашних животных в материале доминируют патогенные микоплазмы, у диких животных преобладает смешанная микоплазменная микрофлора.

Материал, взятый из репродуктивных органов для изоляции уреоплазм, высевают на уреоплазменный агар и бульон. Крупные кусочки тканей обжигают в спирте, разрезают 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 уреоплазменный агар и бульон. Часть посевов инкубируют при 37°C в аэробных, другую — в анаэробных условиях в атмосфере H_2 и CO_2 . Наличие роста уреоплазм в бульоне устанавливают по защелочению pH в течение 1-7 суток инкубирования, при наличии которого производят посевы на агаровую среду. Следует иметь в виду, что защелочение среды может быть вызвано не только уреоплазмами. Посевы на агаре исследуют 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 колониями в первичных посевах на агаровой среде или из разведений, высеванных на агар из бульона. После получения чистых культур путем трехкратного клонирования колоний идентификацию осуществляют на основании изучения ферментативных характеристик, чувствительности к дигитонину, а также при помощи серологических методов. Для дифференциации представителей родов *Mycoplasma*, *Ureaplasma* и *Acholeplasma* исследуют чувствительность к дигитонину и наличие уреазы. Дальнейшее исследование ферментативной активности и культуральных признаков позволяет провести видовую идентификацию основных микоплазм (табл. 94).

Чистые культуры микоплазм, при наличии соответствующих антисывороток, могут быть идентифицированы методом флуоресцирующих антител, в тесте ингибции роста. Именуются сообщения об идентификации *M. bovis* в подимеразной цепной реакции, а также обнаружении и идентификации микоплазм в гистосрезках 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 истинного 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 агалактичным синдромом и септицемическим заболеванием, обусловленным микоплазмами типа LC. *M. ovis* патогенна для овец, вызывает в ассоциации с *P. haemolytica* пролиферативную экссудативную пневмонию. *M. putrefaciens* ассоциируется с маститами и агалактией коз, инфекция может также проявляться артритами, септициемией. *M. conjunctivae* известна как возбудитель инфекционного кератоконъюнктивита овец и коз. Микоплазмы таксона D изолируют из генитального тракта овец с репродуктивными расстройствами, вульвовагинитами. Патогенность *M. arginini*, микоплазм таксонов U, V для овец и коз не установлена. *A. oculi* считается возбудителем кератоконъюнктивита коз. Уреаплазмы выделяют из урогенитального и 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 и убитых животных отбирают часть печени, селезенку, почку, регионарные лимфатические узлы, пораженную часть вымени, суставную жидкость, пораженный глаз. Пробы молока отбирают асептически, после сдаивания первых порций молока. Синовиальную жидкость получают путем пункции сустава при помощи стерильного шприца.

При поражении органов дыхания в лабораторию направляют части легких, экссудат грудной полости, регионарные легким лимфатические узлы, части печени, селезенки, пораженные глаза, пробы молока.

Во всех случаях при поражении 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 органов, плевральной, суставной жидкости при диагностике контагиозной плевропневмонии коз, инфекционной агалактии овец и коз и других микоплазмозов 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, кольцевидных структур розового цвета. В препаратах, окрашенных по Граму, микоплазмы обычно выявить не удается.

Для подтверждения микоплазмозной этиологии наблюдаемых мазков 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 g, смешивают равные объемы раствора красителя и молока, оставляют на 5 минут. Затем 10 микродроп смеси помещают на агаровую поверхность и накрывают покровным стеклом. Препарат исследуют под микроскопом как при методе эпифлуоресценции. Микоплазмы имеют яркий зеленый цвет, обычно выглядят округлыми или слегка удлинненными. Классиче-

ские 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, Маргенса, 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-среды), так как этот вид микоплазм отличается повышенной требовательностью к составу среды. При выделении микоплазм таксона F-38 рекомендуется материал измельчать, но не растирать или гомогенизировать и разводить в бульоне до 10^4 .

С целью выделения *M. ovipneumoniae* посев производят на модифицированную среду Фрисс с использованием методики разведения, уреаплазм — 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 материалом 5-8 суток. Рост микоплазм на жидких питательных средах проявляется опалесценцией, легким помутнением. В случае роста на среде Фрисс, «WJB» микоплазм, расщепляющих глюкозу (*M. ovipneumoniae*, F-38), наблюдается изменение цвета среды. При росте уреаплазм на среде Ливингстона происходит ее окрашивание в красный цвет (жидкая среда) или формирование окрашенных в соответствующий цвет колоний на плотной среде.

Выделение чистых культур микоплазм и их дифференциацию от форм бактерий проводят по стереотипной схеме. Морфология колоний микоплазм на плотных средах соответствует типичной, т.е. имеет форму «мешочки-глазуньи». Исключением является *M. ovipneumoniae*, колонии которой на средах с 1,5-2% агара не образуют растающего темного центра, что затрудняет, из-за смывания колоний, применение методики эпифлуоресценции для идентификации.

Отличительным культуральным признаком *M. putrefaciens* является нехарактерный для микоплазм гнилостный запах при росте на плотных и жидких питательных средах, образование пленки и пятен на яичной среде. Штаммы *M. mycoides subsp. mycoides* типа LC (козьи штаммы) отли-

чаются от типового штамма *M. mycoides subsp. mycoides* (тип SC, «коровьи 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 — sicc colony — мелкие колонии). Кроме того, «козьи штаммы» более интенсивно растут в жидких питательных средах, расщепляют казеин, более устойчивы к температуре 45° С, способны к росту на агаре с 5% крови барана или крупного рогатого скота.

Идентификация выделенных культур микоплазм. С целью видовой идентификации изолированных микоплазм, помимо вышеописанных 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, выделяемых от мелкого рогатого скота (Rosendal S., 1994)

| Вид (таксон) микоплазм | Чувствительность к дигитонину | Уреазы | Глюкоза | Аргинин | Фосфатаза | Пленки и пятна | Расщепление казеина |
|---|-------------------------------|--------|---------|-------------------|-----------|----------------|---------------------|
| <i>M. agalactiae</i> | + | - | - | - | + | + | - |
| <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> , тип LC | + | - | + | - | - | + | + |
| <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> , тип SC | + | - | + | - | - | - | - |
| <i>M. mycoides subsp. capri</i> | + | - | + | - | - | - | + |
| <i>M. capricolum</i> | + | - | + | (+) ²⁾ | + | - | + |
| Таксон F-38 | + | - | + | - | - | - | + |
| <i>M. ovipneumoniae</i> | + | - | + | - | - | - | - |
| <i>M. arginini</i> | + | - | - | + | - | - | - |
| <i>M. putrificans</i> | + | - | + | - | + | + | - |
| <i>M. conjunctivae</i> | + | - | + | - | - | + | - |
| Таксон 2D | + | - | - | - | + | + | - |
| Таксон G | + | - | + | + | - | - | - |
| Таксон U | + | - | - | + | + | - | - |
| Таксон V | + | - | + | - | - | - | - |
| Уреаплазмы | + | + | - | - | н. д. | - | н. д. |
| <i>A. oculi</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 и

пользуют 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. capricoluit* в РДП, реакции иммунофлуоресценции.

Биопроба. При лабораторной диагностике инфекционной агалактии овцы 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, апетат 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 0,05-0,1мл жидкости и, не вынимая иглы, вводят 0,1-0,2 мл материала. Контролем служит другой глаз, в который вводят 0,1-0,2 мл стерильного бульона. Положительный результат — развитие кератита через 5-2 дней после заражения кератита. Срок наблюдения — 30 дней. Овцы и козы заражают введением материала в дозе 5 мл подкожно или 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 плевропневмонии коз в РФ предусматривается проведение биопробы на 6-2-месячных козлятах. Заражения проводят исследуемым материалом или 3-суточной бульонной культурой 3-го пассажа. Материал предварительно подвергают обработке ингибиторами (см. выше). Двум козлятам материю в дозе 10 мл вводят внутривенно. Наблюдение за животным 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 РИКА, ELISA -тест, тест ингибиции образования пленки и пятен.

Ретроспективную диагностику инфекции *M. mycoides subsp. capri* проводят при помощи ELISA, РСК, РИГА. Для групповой диагностики инфек

ции *M. mycoides subsp. mycoides* типа LC апробирована РНГА, инфекции *M. capricolum* — РСК и РНГА, инфекции *M. ovipneumoniae* — РНГА, инфекции *M. putrefaciens* — РСК и пробирочная РА, инфекции *M. conjunctive* — 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 полиартритов 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*, *A. axantum*, *A. granularum*, *M. arginini*, *A. laidlawii* и др.). Лабораторная диагностика микоплазмозов 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 участок легочной доли пережимают широким пинцетом, обрезают по краю пинцета и, не раскрывая его, помещают ткань на 7-8 секунд в кипящую воду, удаляют избыток воды и переносят материал в стерильный флакон в 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. hyorhinis* 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 НИУВ на основе мартеновского бульона с добавлением сыворотки крови лошади, экстракта дрожжей, глюкозы, лактальбуминагидролизата. В исследуемом материале достаточно часто могут присутствовать другие виды микоплазм, в том числе растущие более быстро, чем *M. hyopneumoniae*, что затрудняет выделение и идентификацию культур возбудителя. Наиболее эффективно использование среды Friss с добавлением антисыворотки против *M. hyorhinis* и циклосерина, что обеспечивает ингибирование роста *M. flocculate* и *M. hyorhinis*.

Рекомендуется тканевой материал после измельчения в питательной среде в ступке или гомогенизаторе подвергнуть центрифугированию при 1,5 тыс. об/мин в течение 15 минут, надосадочную жидкость обработать остатком таллия и пропустить через стерилизующие фильтры, посеять на среды для микоплазм и с целью контроля на МПА, МПБ, среду Кита-Гароши. 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 плотные среды.

Другие исследователи предлагают следующую апробированную схему бактериологического исследования: тканевый гомогенат (1:10) разводят в среде Friss до 10^4 и инкубируют при 37° С до трех недель. *M. hyopneumoniae* лучше растет, если культивирование осуществляется разливным способом. Посевы просматривают ежедневно на наличие помутнения и изменения pH. В положительных случаях помутнение среды обычно, pH меняется обычно на 5-6-е сутки, при малом содержании воз-

будителя — позднее. Аналогичные изменения на среде Friss без циклосерина и антисыворотки против *M.hyorhina* могут вызвать *M.flocculate* и *M.hyorhina*, причем последний вид растет быстро. Параллельно один 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, споласкивают, высушивают и исследуют на наличие микроколоний в непрямой реакции иммунофлуоресценции.

При подозрении на инфекцию *M.hyorhina* (полиартриты, полисерозиты) 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 на среде Friss до 10^3 - 10^4 , инкубируют при 37° С, отслеживая изменения pH, появление помутнения. При наличии бактериальных контаминантов отмечают интенсивное помутнение среды в низких разведениях, закисление или защелочение pH. С целью выявления *M.hyosynoviae* материал (суставная жидкость, синовиальные мембраны) измельчают 1:10 и готовят на бульоне для *M.hyosynoviae* разведения 10^3 - 10^4 . Посевы инкубируют при 37° С 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.hyorhina* и *M.hyosynoviae* проводят по стереотипной схеме.

Идентификация выделенных культур микоплазм. Выделенные чистые культуры микоплазм идентифицируют по совокупности культуральных, ферментативных признаков, гемагглютинирующей активности. При этом определяют способность микоплазм утилизировать глюкозу, маннозу, аргинин, разжижать желатин, казеин, сыворотку, редуцировать тетразол, 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° С 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. hyosinoviae</i> | <i>M. hyorhinis</i> | <i>M. flocculate</i> |
| Глюкоза | + | - | + | + |
| Аргинин | н.д. | + | - | - |
| Уреаза | - | - | - | - |
| Фосфатаза | н.д. | - | + | - |
| Тетразол | -/w | -/- | + /+ | -/w |
| Желатин | н.д. | н.д. | - | W |
| Казеин | 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, подписывают, 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 раздельно в лунки планшета, к каждому сегменту фильтра добавляют рабочее 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 забуференного глицерина, покрывают покровным стеклом и исследуют при помощи люминесцентного 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. hyorhynchos смешивают с центрифугатом 100 мл бульонной культуры *M. flocculate*, смесь выдерживают 1 час при 37° С, ночь при 4° С, центрифугируют, над осадочная 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 микроколоний на мембранных фильтрах.

Биопроба. Используют при диагностике инфекции, вызываемой *M. hyorhynchos*. Для заражения берут поросят-сосунков или животных 2-3-месячного возраста, желательно выращенных без молозива, из хозяйств благополучных 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 реакция культур, наличие серологического ответа.

Серологическая диагностика

Методы серологической диагностики инфекций *M. hyorhynchos* и *M. hyosynoviae* не разработаны. Серодиагностику микоплазмозной 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, болеют и другие виды птиц. Характеризуется артритами, тендовагинитами, анемией. Наиболее восприимчива птица 4-12-недельного возраста |
| <i>M. melagris</i> | <i>M. melagris</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 |
| <i>M. anatis</i> | Микоплазмоз уток. Характеризуется респираторным синдромом. Чувствителен молодняк, у взрослой птицы инфекция протекает бессимптомно, за исключением периода яйцекладки |

Бактериологическое исследование

При подозрении на респираторный микоплазмоз, вызываемый *M. gallisepticum*, для исследования берут соскобы со слизистой гортани, трахеи, стенки воздухоносных мешков, фрагменты легких, головной мозг. В случае отсутствия изменений у взрослой птицы исследуют желточный мешок, трахею, легкие эмбрионов последних дней инкубации и 1-3-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, яйцеводы, фаллус. Объектом исследования также является фабрициева сумка, клоака, 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-Гимзи. Фиксированные мазки окрашивают при комнатной температуре краской, разведенной 1:10, в течение 24 часов, промывают и микроскопируют, или подогретую до 90° С краску наливают под стекло, положенное мазком вниз, окрашивают 20 минут, периодически внося горячую краску. Морфология микоплазм в окрашенных препаратах изложена ниже. Более 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 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 высев на аналогичную агаровую среду. Посев материала может быть произведен первоначально непосредственно на агаровые среды, однако предварительные пассажи на жидкой среде дают лучшие результаты. Та

сеянные 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 непатогенных 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 выделения этого вида микоплазм высевают на среду Фрея с 10-15% нормальной сыворотки свиньи, инактивированный при 56° С в течение 30 минут, кроме того, в среду добавляют 0,1% восстановленного никотинамидадениндинуклеотида. Все последующие процедуры по получению чистой культуры возбудителя проводят по вышеописанной схеме.

Выделение культуры *M.melagridis*. Исследуемый материал для выделения *M.melagridis* лучше, как и для изоляции *M.iowae*, высевать на агаровую питательную среду с добавлением лошадиной сыворотки крови. *M.melagridis* отличается замедленным ростом. Колонии *M.melagridis*, *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 урезной активности позволяет определить родовую принадлежность микоплазм (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*). Определение способности к ферментации глюкозы, аргинина и образованию фосфатазы дает возможность отнести штамм 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. columbae</i> | <i>M. gallopavans</i> | <i>M. pullorum</i> | <i>M. columbinasale</i> | <i>M. columbinum</i> | <i>M. gallinarum</i> | <i>M. meleis</i> | <i>M. galinaceum</i> |
| Глюкоза | + | + | - | + | + | + | + | + | + | | | | | |
| Манноза | + | н.д. | - | н.д. | d | н.д. | | н.д. | н. | н. | | | | н.д. |
| Аргинин (гидролиз) | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | |
| Фосфатаза | - | - | + | | + | | | | | + | | | | |
| Пленки, пятна | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + | |
| Тетразол (редукция) | + / + | - / w | - / + | + / + | - / + | - / + | - / + | d / d | - / - | - / - | - / + | + / + | - / - | - / - |
| Гидролиз желатина | - | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | - | н.д. | н.д. | н.д. | - | - | - | н.д. |
| Свертывание и разжижение сыворотки | - | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | - | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | - | - | н.д. |
| Расщепление казеина | - | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | н.д. | - | н.д. | н.д. | н.д. | - | - | - | н.д. |
| Гемадсорбирующие свойства | + | d | d | + | - | н.д. | | | | | | | | |

Примечание: аэробно/анаэробно; н.д. — нет данных; d — варьирующий признак.

Гемагглютинирующими свойствами обладают *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* и иногда некоторые штаммы *M. melagris*.

Серологическую идентификацию *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. melagris* обычно осуществляют при помощи кроличьих антисывороток в реакциях эпифлуоресценции, РДП, тесте ингибции роста. Штаммы *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. melagris* и другие микоплазмы 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 хориоаллантоическую полость.

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 цыплят, индюшат и через 3-5 недель в РПГА или РДП регистрируют появление в крови антител к возбудителю, что позволяет типировать изолированную культуру. Заражение куриных эмбрионов вызывает их гибель на 4-14-е сутки.

Испытание патогенных свойств *M. meleagridis* показало штаммовую переменчивость вирулентных свойств возбудителя. При заражении культурой возбудителя куриных эмбрионов гибели не наблюдают. В результате заражения 7-14-дневных эмбрионов у 30-70% вылупившихся индюшат 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, обусловленных *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 со свежей кровью или сывороткой крови. Используют окрашенные антигены *M. gallisepticum*, *M. sinoviae*, *M. meleagridis*. На предметном стекле смешивают 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 7-10 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 и реакции 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 липидов. РТГА более специфична, но менее чувствительна, чем РА на стекле, причем при диагностике инфекции, вызываемой *M. gallisepticum* из-за внутривидовой 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. melagris*, 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 *Ehrlichia* — 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

нившиеся на и в эритроцитах, рода *Eperythrozoon* — локализирующиеся 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 сочетающаяся с интерстициальной пневмонией. У животных (крупный и мелкий рогатый скот, мулы, лошади, свиньи, собаки, куры) болезнь характеризуется кратковременной лихорадкой, может сопровождаться конъюнктивитом, ринитом, бронхопневмонией, артритом, маститами, абортами, орхитами.

Передача возбудителя от животного к животному может осуществляться инфицированными клещами (свыше 50 видов) или алиментарно.

Возбудителем болезни является *Coxiella burnetii*, род *Coxiella*, триба *Rickettsiae*. **Лабораторная диагностика** основана на результатах бактериологического и серологического исследований.

Бактериологическое исследование

Прижизненно берут кровь. Для заражения куриных эмбрионов готовят пробы гепаринизированной крови, выделения из матки и влагалища, плаценту в случае аборта, пробы молока, клещей с животного; посмертно — измененные участки легких, фрагменты селезенки, паренхимы вымени, головного мозга, регионарные пораженным органам лимфатические узлы.

Микроскопическое исследование исходного материала, экспресс-методы диагностики. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Романовскому, Гименечу и др. («Хламидиозы»). В положительных случаях внутри клеток при окраске по Романовскому находят турурино-красные кокковидные клетки размером 0,2-0,4 мкм или короткие 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 мышах. Высокой чувствительностью при обнаружении возбудителя обладает ме-

тод флуоресцирующих антител (прямой вариант). Детекцию ДНК возбудителя в материале эффективно проводят при помощи ПЦР.

Выделение и идентификация *S. burneti*

Культивирование в куриных эмбрионах. Для заражения куриных эмбрионов подходит нитрированная кровь. В случае возможной контаминации материала посторонней микрофлорой тканевый гомогенат на физиологическом 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»). Используют 5-7-дневные куриные эмбрионы, начиная с 4-5 суток яйца ежедневно оплодотворяют. 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 оболочках желточного мешка в окрашенных препаратах или при помощи метода люминесцирующих антител. После адаптации штамма к куриным эмбрионам из ткани эмбриона можно экстрагировать антиген и идентифицировать его в серологических реакциях с иммунными сыворотками против фаз I и II *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 морским свинкам массой 250-300 г в дозе 3-5 мл или молодым кроликам. Морских свинок ежедневно термометрируют, проводят до 3-5 «слепых» пассажей. У погибших или убитых в период лихорадки животных берут соскобы с брюшины, готовят мазки, микроскопируют, исследуют в РИФ. О результатах 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 животных» (1996) в РФ используют реакцию длительного связывания комплемента, ИФА, РСК.

Реакция связывания комплемента. В РСК применяют антиген из I фазы *S.burneti*. Исследуемые сыворотки крови разводят 1:10, инактивируют в водяной бане при 56-58° С в течение 30 мин. Контрольную позитивную 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. Испытуемые и контрольную негативную сыворотки исследуют в разведении 1:10 (с антигеном и без него), контрольную позитивную — в разведениях с 1:10 до предельного титра. Остальные контроли проводят как обычно при РСК. Первая фаза РДСК длится 18-20 часов при 4-6° С и 20 минут при комнатной температуре, вторая фаза — 30 минут в водяной бане при 37-38° С. Результаты реакции учитывают через 18-20 часов выдерживания пробирок при 4-6° С при условии задержки гемолиза в контроле с позитивной сывороткой до ее предельного титра и при полном гемолизе с негативной сывороткой.

Результат реакции оценивают как положительный при задержке гемолиза с испытуемой сывороткой (1:10) на 3-4 креста, сомнительный — задержка 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 результата животное признают здоровым.

Непрямой вариант ИФА. Используют при сенсibilизации планшет антиген 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 (см. «Реакция микропреципитации»), капилляры закрепляют в пластине, инкубируют при 37° С в течение 5 часов или 24 часа при комнатной температуре. В молоке, содержащем агглютинины к возбудителю, слой сливок приобретает сине-черный цвет — положительный результат.

Лабораторная диагностика инфекционного гидроперикардита животных

Трансмиссивная, остро протскающая инфекционная болезнь, преимущественно крупного рогатого скота, овец и коз, характеризуется септициемией и лихорадкой, нервными явлениями и скоплением экссудата в полости тела и сердечной сорочке. Распространена в Центральной, Восточной и Южной Африке. Передается через иксодовых клещей рода *Abyloma*, 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 данных биопробы.

Бактериологическое исследование

Прижизненно для постановки биопробы берут стерильно и дефибринируют 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 интранепритонеально материала мышам, в организме которых возбудитель сохраняется достаточно долго (30 суток) без признаков заболевания мышей. Посмертно объектом исследования являются крупные сосуды (аорта, яремная вена), 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 рогов). Рекомендуется готовить мазки — отпечатки из кусочков ткани мозга путем раздавливания между предметными стеклами. У клещей исследуют эпителий 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 теленка, 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 исследуют на наличие возбудителя. При доставке в лабораторию мышей, инокулированных в полевых условиях, их убивают через 4-21 день, селезенку растирают в бульоне и вводят внутривенно овцам. Биопробу можно проводить на мышцах с учетом результата по сероконверсии.

Серологическая диагностика

Серологическая диагностика из-за малой специфичности (ЭЛИЗА) малоэффективна.

Лабораторная диагностика эрлихиозов

Возбудители эрлихиозов относятся к семейству *Rickettsiaceae*, трибе *Ehrlichiae*, роду *Ehrlichiae*. Эрлихии не патогенны для человека, вызывают заболевания животных, некоторые из них приспособились к обитанию в организме членистоногих, для других представителей векторы не установлены. 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*) — вызывает лихорадочное заболевание крупного рогатого скота (клещевая лихорадка), овец и диких животных, вектор *Ixodes ricinus*, заболевание может сопровождаться абортными, снижением удоев, животные худеют; *Ehr-*

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 острой стадией болезни и периодом реконвалесценции (Приложение № 1 к «Инструкции по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота», 1970). Критерии дифференциации анаплазм от эспиритрозоонов, пироплазм, бабезий и тейлерий представлены в таблице 97. Для выявления анаплазм может быть использован метод прямого флуорохромирования акридиновым оранжевым, а при наличии антисывороток — метод 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 положительную и отрицательную, 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 двойном количестве. РСК ставят в объеме 0,5 мл. Первую фазу РСК проводят при 37°C в течение 60 минут, вторую фазу — 20 минут. Задержку гемолиза на два креста и более считают положительным результатом РСК. Любой

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 острой стадией болезни и периодом реконвалесценции (Приложение № 1 к «Инструкции по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота», 1970). Критерии дифференциации анаплазм от эспиритрозоонозов, пироплазм, бабезий и тейлерий представлены в таблице 97. Для выявления анаплазм может быть использован метод прямого флуорохромирования акридиновым оранжевым, а при наличии антисывороток — метод 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 двойном количестве. РСК ставят в объеме 0,5 мл. Первую фазу РСК проводят при 37°C в течение 60 минут, вторую фазу — 20 минут. Задержку гемолиза на два креста и более считают положительным результатом РСК. Любой

татах микроскопического исследования материала, выявлении возбудителя методом непрямой иммунофлуоресценции.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования являются прижизненно взятые биоптаты из лимфатических узлов на стадии лихорадки. Кровь содержит возбудителя, но методом микроскопии его обнаружить трудно. Риккетсии гибнут, но 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 элементов лимфоидных тканей; по Романовскому-Гимза окрашивается в голубой, Маккиавелло — голубой и розовый цвета. В циркулирующих лимфоцитах возбудитель не выявляется, хотя кровь инфекционна.

Биопроба. 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. risticii* и *E. sennetsu*.

Лабораторная диагностика анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота

Анаплазмоз проявляется лихорадкой непостоянного типа, снижением удоев 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* — возбудитель заболевания 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 острой стадией болезни и периодом реконвалесценции (Приложение № 1 к «Инструкции по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота», 1970). Критерии дифференциации анаплазм от эритрозоонов, пироплазм, babesий и тейлерий представлены в таблице 97. Для выявления анаплазм может быть использован метод прямого флуорохромирования карболовым оранжевым, а при наличии антисывороток — метод 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 положительную и отрицательную, 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 двойном количестве. РСК ставят в объеме 0,5 мл. Первую фазу РСК проводят при 19°C в течение 60 минут, вторую фазу — 20 минут. Задержку гемолиза на 15 минут и более считают положительным результатом РСК. Любой

титр антител считается диагностическим, титрование сывороток позволяет сделать заключение о стадии носительства (титр до 1:40) или переболевания (более 1:40, вплоть до 1:1280).

Лабораторная диагностика эперитрозооза

Из представителей рода *Eperythrozoon* в патологии животных важное значение имеют следующие виды: *E. ovis* — вызывает у ягнят 2-10-месячного возраста заболевание с выраженными клиническими симптомами, анемию, потерю веса; *E. suis* — возбудитель свиного эперитрозооза, обычно протекающего субклинически, однако возможна анемия, эмбриональная смертность и аборт. Ни один вид эперитрозоонов на бесклеточных питательных средах культивировать не удается. **Лабораторная диагностика** основана на результатах микроскопического и серологического исследований. В РФ регистрируется эперитрозооз овец.

Бактериологическое исследование

От убитого или павшего животного (овцы) в лабораторию направляются кусочки селезенки, печени, лимфатических узлов, мазки крови.

(«Методические указания по лабораторным исследованиям на эперитрозооз овец», 1985).

Микроскопическое исследование материала

Из органов делают мазки-отпечатки, фиксируют метанолом (1-5 минут) или этанолом (20-25 минут) и окрашивают по Романовскому 30-40 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 палочковидные образования размером 0,4-1,5 мкм, редко палочки розоватого или розово-фиолетового цвета. На поверхности эритроцитов возможно выявление кольцевидных форм. Согласно «Методическим указаниям по лабораторным исследованиям на эперитрозооз овец» (1985) для дифференциации эперитрозоонов от анаплазм, бабезий, пироплазм и тейлерей рекомендуется руководствоваться критериями, изложенными в таблице 99.

Таблица 99 - Дифференциальная таблица возбудителей

| Возбудитель | Форма клетки | Локализация |
|-----------------|--|---|
| 1. Эперитрозоон | Округлая, овальная, палочковидная, гантелевидная, кольцевидная | На поверхности эритроцитов, трипановых эритроцитов, по их периферии, между ними |

| | | |
|------------|--|--|
| Анаплазма | Палочковидная, округлая | По периферии, в центре эритроцита |
| Парвовирус | Округлая, грушевидная (парная, одиночная), парная расположена под острым углом или параллельно | В центре эритроцита |
| Эваския | Округлая, грушевидная (парная, одиночная); парная расположена под прямым углом | Чаще по периферии, в центре эритроцита |
| Туберкула | Круглая, овальная, палочковидная, запятовидная, анаплазмозная, крестообразная | В эритроците |

Стрелогическая диагностика

Для диагностики эритрозооноза свиней испытаны и рекомендованы прямой метод флуоресцирующих антител и РСК.

Лабораторная диагностика гемабартонеллеза кошек

Возбудитель относится к семейству *Anaplasmataceae*, роду *Haemobartonella*, виду *H. felis*. Заболевание известно как инфекционная анемия кошек. Возбудитель локализуется в эритроцитах. На бесклеточных питательных средах не культивируется, не патогенен для других видов животных. 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 углублении поверхности или вакуолях эритроцитов, редко — в плазме. Шаровидные структуры встречаются редко. При окраске по Романовскому-Гимза цвет клеток темно-пурпурный.

Цитопроба. При внутривенном, интраперитонеальном или оральном введении материалом кошек воспроизводится клинически выраженное заболевание.

Лабораторная диагностика хламидиозов

Хламидии представляют собой кокковидные, грамотрицательные бактерии, которые являются облигатными внутриклеточными паразитами, энергозависимыми 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 геносистематики проведена реклассификация известных видов хламидии, определено таксономическое 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*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *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, энтерита и пневмонии у животных; *C. trachomatis* является исключительно паразитом человека, *C. muridatum* определен как патоген грызунов. В роде *Chlamydophila* вид *C. pecorum* 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 на культуре клеток. В семействе *Waddliaceae* вид *W. chondrophila* выделен из абортыванного плода коровы.

Таблица 100 - Патогенные свойства хламидий

| Вид хламидий | Характер вызываемой патологии. Виды поражаемых животных |
|-----------------------|--|
| <i>C. ruitaei</i> | 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, кошек. Офтальмия крупного, мелкого рогатого скота, свиней. Пситтакоз (орнитоз) птиц с явлениями пневмонии. Аэросаккулит, перикардит, энцефалит, Конъюнктивит, энтерит. Пневмонии, аборты, конъюнктивиты человека. |
| <i>C. trachomatis</i> | Поражения у человека органов зрения (трахома, конъюнктивит с включениями- паратрахома), репродуктивных органов (уретриты, сальпингиты, цервициты, эпидидимиты и др.). |

Методы диагностики, позволяющие четко дифференцировать виды хламидий у животных, пока в полном объеме недоступны диагностическим лабораториям. Наиболее перспективным методом видовой идентификации хламидий представляется в этом плане полимеразная цепная реакция.

Лабораторная диагностика хламидиозов основана на детекции возбудителя в ПЦР, микроскопическом обнаружении клеток возбудителя в окрашенных мазках, идентификации в препаратах из исследуемого материала при помощи серологических реакций (МФА, ELISA), выделении возбудителя путем заражения куриных эмбрионов и лабораторных животных с последующей идентификацией хламидий в органах и тканях при помощи вышеуказанных методов, а также на результатах исследованной сыворотки крови в серологических реакциях. Работы по диагностике антропоозоонозных хламидиозов проводят только в лабораториях, которые имеют специальное разрешение режимной комиссии СЭС.

Бактериологическое исследование

В случае абортов берут кусочки плаценты, абортированные плоды целиком 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 пробирки с физиологическим раствором, содержащим 500 мкг/мл стрептомицина. При исследовании конъюнктивитов соскобы с конъюнктивы берут затупленным скальпелем с предварительной ее обработкой 0,5% раствором дикаина, готовят мазки, фиксируют для окраски по Романовскому-Гимза или МФА в пероксидазным методом. От павших или вынужденно убитых животных отбирают кусочки паренхиматозных органов, лимфатических узлов, образцы слизи носовой полости, трахеи, тонкого отдела кишечника.

ка, головного мозга и мозговых оболочек. При наличии у больных животных 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): сахароза — 74,6 г; KH_2PO_4 — 0,512 г; K_2HPO_4 — 1,237 г; L-глутаминовая кислота — 0,721 г; фенолового красного — 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°C . В этой среде хламидий остаются жизнеспособными при комнатной температуре до 30 дней, при 4°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), канамицина (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 сахарозы 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°C в течение 15 минут, хранят при 4°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, Гимзу, Маккиавелло и др., а при наличии соответствующих компонентов в реакциях иммунофлуоресценции или при помощи иммунопероксидазного теста.

Предваряя интерпретацию микроскопической картины при изучении окрашенных препаратов, более подробно останавливаемся на стадии морфогенеза хламидий. В процессе жизнедеятельности хламидии под

вержены следующим морфологическим изменениям («морфогенез»). Вначале клетка хламидий в виде элементарных тельц фагоцитируется клеткой-хозяином. Элементарные тельца — электронноплотные шаровидные 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 0,8-1,5 мкм в диаметре. Промежующую морфологическую стадию между элементарными и ретикулярными тельцами называют промежуточными тельцами. Хламидии размножаются внутри цитоплазматических везикул и формируют 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 динамике роста и размножения обычной бактериальной клетки на поверхности плотной питательной среды.

Окраска по Маккиавелло. Мазки фиксируют фламбированием, окрашивают полоской фильтровальной бумаги; окрашивают раствором А 5-10 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. Мазок 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 Бузну (насыщенный водный раствор пикриновой кислоты — 75 мл, формалина — 25 мл, ледяной уксусной кислоты — 5 мл) в течение 30 минут, промывать 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 кюветах 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 микроскопируют.

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 азура 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 основных водных растворов 1:1000. Обычно на 1 мл дистиллированной воды берут 3 капли азура III и 2 капли эозина.

Окраска по Кастанеда. Препарат не фиксируют. Окрашивают 1-4 минуты свежеприготовленной смесью азура с формалином и фосфатным буфером, препараты промывают водой, в течение нескольких секунд докрашивают раствором сафранина, промывают водой и микроскопируют. Микроскопическая картина: риккетсии — сине-фиолетовые, фон — розовый. Недостаток метода — плохая дифференциация внутриклеточных риккетсии. Красители и реактивы: 1% водный раствор азура II с добавлением 0,5% формалина; 1% водный раствор сафранина; фосфатный буфер (рН 7,4-7,6); формалин (обычный). Перед окраской к 20 мл фосфатного буфера добавляют 1 мл формалина и 20 капель 1% раствора III

ра 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 хламидиозов мазки или мазки-отпечатки окрашивают по Романовскому-Гимза 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-Гимза, разведенной 1:10 фосфатным буфером с рН 7,2-7,6, промывают дистиллированной водой, подсушивают, микрофотографируют.

Микроскопическая картина: цитоплазматические включения представляют собой компактные или рыхлые зернистые массы, состоящие из слоток возбудителя на разных стадиях морфогенеза. Они часто находятся 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-Гимза 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 Сталну. Мазки фиксируют фламбированием и окрашивают следующим образом: карболовый фуксин Циля, разведенный дистиллированной водой 1:5 (рН 7,4) — 15 минут; промывание дистиллированной водой; раствор серной кислоты — (0,05%) — 1 минута; промывание дистиллированной водой; водный раствор малахитового зеленого (1%) — 30 секунд; промывание дистиллированной водой.

Микроскопическая картина: хламидий — красного цвета, ядра клеток — темно-синие; фон — зеленоватый.

Окраска по модифицированному методу Гименеж. Мазки готовят на стенках желточных мешков зараженных куриных эмбрионов, фиксируют на пламени, окрашивают 5 минут 0,25% водным раствором основного фуксина, промывают водой, окрашивают 0,8% водным раствором малахитового зеленого 30 секунд, промывают водой, обесцвечивают 2 минуты

0,5% раствором лимонной кислоты, промывают, докрашивают малахитовым зеленым 30 секунд. Затем обесцвечивают 1% раствором хлорангида 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.

Иммунофлуоресцентное 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 внеклеточные элементарные тельца хламидии округлой формы с ровными краями. Иногда обнару-

ваются ретикулярные тельца, размер которых в 2-3 раза больше. Внутриклеточные включения выявляются не более чем в 10% случаев. В качестве 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 наносят 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 30-40 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, со светофильтрами 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 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 «chl», смесь нуклеотидов, 5-кратный реакционный буфер, деионизированная вода, фермент Taq-полимераза, вода для ПЦР, масло минеральное); набор для электрофоретического анализа продуктов ПЦР. Для исследования используют паренхиматозные органы павших или вынужденно убитых животных, перевязанный лигатурными с двух сторон сычуг абортированных плодов; замороженную сперму или пробы эякулята, мочу от производителей, подозрительных по заболеванию, соскобы слизистых оболочек конъюнктивы и урогенитального 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: мышцы, морские свинки, куриные эмбрионы и культуры клеток. В диагностических лабораториях обычно используют три первые системы.

С целью деконтаминации исследуемый материал растирают в стерильном физиологическом растворе (1:5), содержащем тиомерсал и канамицин 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 пути 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 пассаже 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 и 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% суспензию, центрифугируют и центрифугатом заражают новую партию куриных эм-

брионов. При получении отрицательных результатов (отсутствие специфической гибели) проводят до трех последовательных слепых пассажей.

В случае необходимости адаптированные штаммы хламидий можно культивировать на хориоаллантаиной оболочке (ХАО) и в аллантаиной жидкости. С целью пассирования в аллантаиной жидкости материал в дозе 0,3-0,4 мл вводят в аллантаиновую полость 8-9-дневных куриных эмбрионов. Для заражения на хориоаллантаиновую оболочку используют 10-12-дневные куриные эмбрионы. В положительных случаях на 3-6-е сутки на ХАО формируются узелки, состоящие из элементарных телец хламидий.

Заражение в полость аллантаиса. 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 хориоаллантаиновую оболочку. Скорлупу дезинфицируют и обрезают ножницами вокруг над воздушным пространством, щипцом осторожно снимают небольшой кусочек подскорлуповой оболочки. На видимый участок хориоаллантаиновой оболочки наносят материал, отверстие в скорлупе закрывают стеклянным колпачком и его края заливают парафином.

Наличие хламидий устанавливают исследованием мазков из оболочек желточных мешков эмбрионов, павших на 4-12-й день после заражения, в любом из трех последовательных пассажей методом МФА, ПЦР, а также окраской одним из вышеперечисленных методов.

Заражение лабораторных животных. Действующей инструкцией по диагностике хламидиозов предусматривается внутрибрюшинное и интра-торакальное заражение белых мышей и морских свинок.

Белые мыши. Используют животных массой 16-20 г. Мыши чувствительны к внутрибрюшному, 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 очередей 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, выраженное увеличение селезенки и печени. Из этих органов делают маз-

ки-отпечатки и подвергают исследованию с целью обнаружения и идентификации хламидий.

Интраназально материал вводят в дозе около 0,05 мл в каждую ноздрю мышкам (масса — 12-16 г), находящимся под легким эфирным наркозом. Проводят до 3-6 «слепых» пассажей. Для заражения используют легочную ткань. Адаптированные штаммы вызывают гибель мышшей 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 мышшей 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 мышши 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 интраторакальному 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 ципрофлоксацина на изолирующей среде концентрацией 2 мкг/мл. Изолирующей средой называют среду с антибиотиками для заражения клеток исследуемым 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, fetalная 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 2 мл в две плоскодонные пробирки). Центрифугируют 60 минут при 3000 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 1-2 мл метанола (по стенке пробирки), фиксируют 10 минут, осторожно встряхивают пробирки для ресуспензирования 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 (x400-x600), включения хламидий дают желто-зеленую флуоресценцию. В сомнительных случаях исследуют препарат в обычном световом микроскопе с объективом x90.

Микроскопическая картина: элементарные тельца имеют розовый цвет, ретикулярные — синий. Данный метод исследований является трудным, но чувствительным.

Серологическая диагностика

Для ретроспективной диагностики хламидиозов животных используют РСК, РДСК, ИФА. Абортировавших животных исследуют на нарастание титра антител (положительный результат — увеличение титра 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. Компонент, разведенный 1:20, инкубируют с дозы 0,02 до 0,2 мл с интервалом 0,02 мл. Гемолизин исполь-

зулот 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 антикомплементарность: специфический и контрольный антиген в двойной дозе + комплемент + гемсистема; контроль антигенов на геммотоксичность: 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 последующими сыворотками.

При оценке результатов РСК и РДСК за положительный результат принимают задержку гемолиза 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. Исследуют парные сыворотки крови в разведениях 1:200-1:6000. Результат ра-

важни учитывают через 30-40 минут после внесения стоп-раствора. При визуальном учете в положительном случае наблюдают оранжево-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, роду Lyssavirus. В настоящее время установлено, что ВБ имеет 4 серотипа, что обусловлено, видимо, различием в составе мембранных белков. Все варианты 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 - 6-слойную марлевую повязку.

Лабораторные исследования материала на бешенство проводят в любой 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 специфических телец Бабеша - Негри (при окраске по Селлерсу - четко очерченные овальные или продолговатые гранулярные образования розово-красного цвета в протоплазме, при окраске по Муромцеву - светлосиние с темно-синими включениями тельца Бабеша - Негри, чаще они расположены вне нервных клеток).

Наиболее характерная особенность телец Бабеша - Негри - их внутренняя структура, позволяющая абсолютно точно дифференцировать на

Внутри видны маленькие зернышки - базофильные зернистости темно-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 воспользоваться методами идентификации, в особенности ИФ. Равным образом и у собак, погибших в результате отравления змеиным ядом или поражения электрическим током, можно найти тельца-включения, напоминающие тельца Бабеша - Негри. Тельца Бабеша - Негри выявляют лишь в 65-85% 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 высококвалифицированном выполнении получают в 99-100% совпадения с методом биопробы. Обычно в диагностической практике используют прямой метод ИФ, который проводят с применением антирабического флюоресцирующего Ig. Фиксацию препаратов в охлажденном (8-10°C) ацетоне проводят не менее 4-х ч. В качестве отрицательного контроля используют маки-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 мельчайших 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 нефлюоресцирующими АТ, вторично не вступать в соединение с флюоресцирующими специфическими АТ. Для этого на фиксированные препараты, приготовленные из исследуемого головного 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 глаза и предварительно поставить диагноз прижизненно: во время болезни животных, а также за 1-2 дня и более до клинического её проявления. Ме-

тод может быть использован для исследования подозреваемых в заболевании Б животных, а также клинически здоровых собак и кошек, покусавших 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 мусора на стекле остается мало материала.

Показана возможность идентификации ВБ в коже методом ИФ. С этой целью берут пробы кожи головы, а также фолликулы сенсорных и тактильных волос морды или латеральных сенсорных сосочков (на щеке собаки). Пробы хранят при -20 или -70°C. Из них делают криосрезы, которые обрабатывают флюоресцирующим глобулином. Результаты ИФ анализа, полученные при идентификации ВБ в коже, в высокой степени коррелируют с результатами ИФ анализа слюны.

связаны 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 ВБ в неконсервированном головном мозге животных, павших от уличного бешенства, или мышат, 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 использовании 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 разведением специфического иммуноглобулина 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 соответственно

Из каждого отдела головного мозга с помощью пинцета готовят однородную 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 2-3 линий 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 телца Бабеша - Негри, специфической флюоресценции и отрицательная РДП не дают основания исключить наличие вируса. В этом случае окончательный диагноз ставят по результатам биопробы на белых мышах с последующей идентификацией вируса.

Биопроба. Принято считать, что биопроба является более эффективным методом, чем обнаружение телца Бабеша - Негри, ИФ и др. Однако и она в отдельных случаях оказывалась отрицательной, несмотря на подтверждение диагноза Б путем обнаружения телца-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 и опыта, 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 скунсов, 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 скунсов 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 обработке препаратов, заключенных в парафин, пепсином.

В отличие от РН на мышах и в культуре клеток ИФА позволяет выявить АГ у животных в течение нескольких часов, ИФА - наиболее перспективный лабораторный метод обнаружения АГ и индикации самого вируса. Экспресс-методом диагностики бешенства является техника захвата и метод ИФ для выявления АГ ВБ. Доказано, что метод выявления АГ ВБ в парафинизированных срезах пероксидазо-антипероксидазным методом значительно превосходит метод ИФА. В 1987 г. создан набор для быстрой энзимиммунодиагностики бешенства (RREID), приемлемый для эпидемиологических и лабораторных исследований.

РН. Используется редко. Рекомендуется модификация с разведением ВВ и постоянной дозы γ -глобулина. ИИ 2 указывает на АГ специфичность выделенного вируса.

Вариантная идентификация с помощью монАТ. С помощью монАТ к гликопротеинам ВВ селективированы АГ варианты, среди которых выделены фенотипически термолабильные (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 удастся 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 комплемента и нейтрализуют вирус. В связи с возможной АГ вариабельностью поверхностного гликопротеина ВВ из различных географических зон в качестве 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 ВНК-21 была более чувствительной, чем непрямая ИФ при выявлении АТ в сыворотках вакцинированных лис. Кроме того, предложены РТГА и ELISA.

РТГА. Пока еще не нашла широкого применения в диагностической практике из-за наличия в сыворотках крови неспецифических ингибиторов, к которым ВВ высокочувствителен, а главное, ГА АГ, не подвергавшиеся достаточной очистке, обладали низкой чувствительностью. Для приготовления ГА АГ ВВ 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 трансфузию гусиных эритроцитов для их сенсibilизации. При исследовании 0,25%-ной взвеси трипси-лизированных 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 панели встряхивают, заклеивают прозрачной пленкой и ставят на лед. Результаты РТГА учитывают через 40-50 мин, а с эритроцитами 2-дн цыпят 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 гибридных супернатантах.

Дифференциальная диагностика. Необходимо исключить болезни Ауески, при которой больные животные неагрессивны, не бывает извращения аппетита. У собак исключают нервную форму чумы. Подозрение на бешенство может возникнуть при инфекционном энцефаломиелите 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) – остропротекающая контагиозная болезнь КРС, характеризующаяся преимущественно катаральными некротическими поражениями дыхательного тракта, лихорадкой, общим 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 РИ 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 (I и II), 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 сывороток 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 брыжеечные 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 последовательных 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 тельца-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 гематоксилин-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 флюоресценция 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 флюоресценцию отмечали через 24 ч, из препуция - через 48, из носа и трахеи-через 72 ч после заражения. Присутствие специфического антигена удается подтвердить заражением культуры клеток почки телят, в которой обнаруживается специфическая перинуклеарная и диффузная цитоплазматическая флюоресценция, свойственная ринотрахеитной инфекции. Использование культуры клеток почки кролика позволяет освободиться от неспецифического свечения.

Совпадение результатов РИФ и патогистологических изменений составляет 87%, а иммунофлюоресценции и вирусологических исследований - 44%. При параллельном исследовании сывороток в РН 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 иммуофлюоресценции 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 lg ТЦД₅₀/мл.

Затем вычисляют индекс нейтрализации (И) по формуле $I = T_1 / T_2$

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 lg. При индексе нейтрализации от 1 lg до 2 lg реакцию считают сомнительной, в этом случае ее повторяют. Индекс нейтрализации менее 1 lg 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 0,2% 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.

Иммунопероксидазная идентификация вируса. Иммунопероксидазная метод можно использовать для исследования прижизненно взятых носовых фарингиальных мазков-отпечатков в клетках, полученных из легочных смывов.

Кроме того, рекомендован непрямой антикомплементарный иммунопероксидазный метод (НАИП) для лабораторной идентификации вируса ИРТ. Методика заключается в следующем: на покровных стеклах, в пробирках готовят чувствительную культуру клеток к вирусу ИРТ (ПЭК, ТБ и др.) по общепринятой методике. Монослой заражаемым 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 гетерологичными 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 40-60 мин, затем промывают проточной водой 5-10 мин, слегка подсушивают и обрабатывают меченной пероксидазой антикомплементарной 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 иммунопероксидажной 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 (РНФ, 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 °С, 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 ТПД₅₀/мл. Титры 1:32, 1:64 обнаруживаются редко. В неблагополучных по данной болезни стадах ВНА выявляются у 12% клинически здорового скота. Ретроспек-

тивный диагноз на ИРГ 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 диагностикум. 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 титрование 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, в то время как ВНА длительно циркулируют в организме, и заболевание можно уловить по парным сывороткам. При выявлении ПА кровь лучше 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 ИРГ 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 ИРГ 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 коров с целью диагностики скрытого вирусносительства.

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, приви-

тых 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 антибиотиками 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 РНГА 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 во всех географических регионах 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 павших 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. Её целесообразно применять в лабораторных условиях для экспресс-диагностики. Поскольку полипептид VP5 содержит перекрестный групповой АГ, локализованный в консервативном домене, который является общим для всех РВ группы А. Показана возможность индикации рота- и коронавирусам 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 постоянством вирус удается обнаружить в пробах фекалий, взятых в первые дни болезни, поэтому для исследования пригодны фекалии, взятые от 2-14-дневных 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 2 сут, при -20°C - до 1 мес. Для вирусологических или электронно-микроскопических исследований готовят 10%-ную суспензию фекалий на 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 (трипин) 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 ресуспандируют 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 концен-

трации 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 АТ 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 частицы связаны специфическими иммунными глобулинами. Чаще используют три модификации иммуноэлектронной микроскопии.

При положительном результате РВ частицы выявляются в препаратах в виде специфических скоплений (иммунных комплексов). Оценку специфичности реакции проводят путем подсчета числа и размеров подобных скоплений, а также по степени покрытия отдельных вирионов АТ сыворотки. Выраженность этого эффекта при определенном навике можно оценивать по шкале условных единиц от 0 до 4-х плюсов.

ИФ. Для обнаружения вирусного АГ в замороженных срезах тонкого 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 ч 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 специфический - культуральный

ную 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 АТ 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%-ную суспензию фекалий в фосфатно-буферном солевом р-ре прогревают 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 0,2 мл концентрата соответствует 1 г исходного материала фекалий. Источником специфических АТ служат сыворотки реконвалесцентов после ротавирусного 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(гидроксиэтил)-аминметана и 0,001 М этилендиаминтетраацетата. Компоненты реакции помещают в вырезанные в слос 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 холерика 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 безмолозив-

ных 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 антикомплементарности многих проб фекалий. Однако при обработке фекалий комплементом, фетальной сывороткой, фреонном, 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. Кишечник 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 веронал-мединаловом 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, освещают центрифугированием и обрабатывают смесью Твина-20 с антоном 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

стью и специфичностью. В Российской Федерации разработан иммуноферментный диагностикум, выпускаемый ВИЭВ. Набор включает: специфический лиофилизированный РВ АГ - вирусодержащая суспензия, полученная на культуре клеток МА-104, концентрированная ПЭГ 6000 и центрифугированная при 6000g, контрольный АГ, лиофилизированная специфическая антиротавирусная сыворотка, полученная путем гипериммунизации телят или кроликов вирусом, очищенным в градиенте плотности хлористого рубидия; сухие иммуноглобулины, выделенные из гипериммунной 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 стафилококки, 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 1%-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 в шт. R1T4237 (серотип 1) РВ КРС. Нейтрализация АГ выявила вариативную 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 АГ 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 О или эритроциты морской свинки. Исследуемые сыворотки обрабатывают каолином и эритроцитарной массой (последнее - при использовании эритроцитов человека). Все разведения готовят на физиологическом солевом р-ре с добавлением 0,04 % альбумина сыворотки КРС.

Непрямая ИФ, РН, радиоиммунологический метод ставятся по общепринятым 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 4, полученными с помощью амплификации в ПЦР гипердивергентных областей гена белка VP4 (нуклеотиды 211-686) к ДНК шт. ИК, IND, NCDV и Сг с использованием олигонуклеотидных праймеров. Зонды 3 типоспецифичны (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 аборты. 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. Имеются 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 специфический АТ в крови, хотя остальных 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 патологиче-

ского 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 и 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 сывороток. Предварительный диагноз ставят в ветеринарных 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 3 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, взятые жесткими ватно-марлевыми тампонами или скальпелем. Тампоны с материя лом помещают в стерильные пенициллиновые флаконы или пробирки с 2-3 мл стерильной физиологического р-ра или р-ра Хенкса, содержащего 500-1000 ЕД/мл антибиотике (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 закрывающуюся посуду. Легче вирус выделить в начале болезни и в период обострения из крови, легких, различных участков тонкого кишечника (в особенно

ности 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 носовых смывов и фекалий в этих случаях также дает отрицательные результаты, хотя в отдельных случаях вирус выделяли из фекалий даже через 5 мес после болезни. В начале болезни в период поднимается температура от больных животных берут пробы крови в р-р цитрата натрия или геля рина и помещают их в термос со льдом. Из крови экспериментально зараженных животных выделяли вирус с 1-14-го дня 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 ЦПД не 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 дней 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 кариорексисе. 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 эквалитации 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 исследова-

ния 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 ГИАХ 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 экзальтации.

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 тenezмы. 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

остром и хроническом течении болезни. В лимфоидных тканях АГ распространяется в клетках системы фагоцитирующих мононуклеаров. Между первоначальным обнаружением АГ в слизистой кишечника, кератинизированном эпителии верхних отделов пищеварительной системы и кожи 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 смывов - надежный и быстрый способ выявления животных, персистоно инфицированных вирусом. При исследовании препаратов обращают внимание на свечение АГ в цитоплазме не разрушенных клеток. Яркая зеленая флюоресценция 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 не прямой 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 ЦИД 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 экзальтации вируса ИБ, 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 сег-

мента 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 (S'-НТ) и область р80) до разведения молока 1:640. ПЦР оказалась в 14,6 раза чувствительнее других методов выделения 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 раза. 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 ПБО). 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 (р80К и р120-130К). 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 (р125/р80) 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 стабилизируют, и вирусный АГ выявляют при использовании биотинилированных Ig из антисыворотки свиной с последующей инкубацией с ФИТЦем, конъюгированным авидином.

ИФА. ИФА позволяет легко идентифицировать культуры клеток, инфицированные ВД. Идентификация с помощью монАТ в практическом диагностическом применении не разработана. Однако получено 5 монАТ (XI А9, АЕЗЕ2, АМ2G5, ВТ48, ВТ6G9) против вируса ВД-БС КРС с III

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 гликопротеин, 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 вирусносительство 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 ЮРС. 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 наблюдают 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 2 раза и более. При экспери-

ментальном 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 суши зию отсасывают и наносят на культуру 15 мл агара. После застывания агара на его повед ности раскладывают кружки фильтровальной бумаги, насыщенной неразведенной иссм дуемой сывороткой. После 4 дн инкубации при 37°C учитывают результаты. Доказательством того, что исследуемая сыворотка содержит АТ, служит отсутствие повреждения слоя клеток вокруг насыщенного ею кружка фильтровальной бумаги, что обнаруживается в виде венка клеток.

РСК. Ставят микрометодом с использованием микротитратора Такачи 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 появляются 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 выполняем. В качесм АГ использовали вирус, концентрированный ПЭГ и очищенный градиентным равновесии ультрацентрифугированием. Оптимальная концентрация АГ составляла 1 мкг на лунку.

Дифференциальная диагностика. При постановке диагноза на ВД-БС необходимо исключить ИРТ, аденовирусную инфекцию, ПГ-3, злокачественную катаральную лихорадку, ящур, паратуберкулезный энтерит 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 качесд 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, параинфицированного 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 проводят 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 диагноз 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 однотипное 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 удается 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 ядрышек. 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 дн 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 гемагглютинаина в титре, достаточном для выбора 4 ГАЕ. Следует иметь в виду, что вирус парририппа, 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 pH: эритроциты гусей при 5,7; индюка 5,7-7,2; морской свинки 6,8-7,2. Иммунные сыворотки, используемые в РТГА, должны быть освобождены от термолабильных и термостабильных ингибиторов, для этого сыворотки прогревают при 56°C 30 мин и обрабатывают иононом или фильтратом холерного вибриона. РТГА ставят общепринятым методом.

Иммуноферментная идентификация. Сотрудниками ВНИТИБЛ 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

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, матке, скелетных мышцах, диафрагме и других органах.

Взятие и подготовка материала. Для гематологического исследования кровь берут из венозной вены в пробирки с антикоагулянтом в 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 синцития 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 представлены разнообразными клетками, среди которых находили лимфоциты и лимфоциты, продуцирующие вирусные частицы типа С. Зрелые вирусные частицы находили, в основном, в межклеточных пространствах и на внешней мембране лимфоидных клеток. Методом ЭМ у больных лейкозом животных обнаруживают в лимфоцитах ядерные "карманы" в виде периферического кольца и петли. Как правило, они обладают связью с оболочкой ядра и содержат цитоплазматическое вещество клетки. Иногда центральная часть их заполнена электронноплотными гранулами диаметром 4 нм, расположенными группами и напоминающими гранулы гликогена. Ядер-

ные "карманы" отсутствуют в дифференцированных гранулоцитах, моноцитах 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^TL. 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 лимфоидный 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 гемогаммой 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 все 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, мегакарициты, 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 клеток или полиморфноклеточную пролиферацию, склеротические изменения 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 причины 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 кровотоковых органов позволило разделить все клетки на 4 группы, из которых патогномичное значение имеют клетки 3-й группы - молодые и мало дифференцированные 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 лейкоза повторными 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 моноклеарных 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 моноклеарных 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 ВЛКР 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 используются пары праймеров, соответствующих определенным участкам генов *env* р24, *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 *pX*. 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 лимфоузлов. Фрагменты провирусной ДНК метят биотипом. Разработан метод ПЦР с последующей нерадиоактивной блот-гибридизацией для тестирования провируса лейкоза КРС в исследуемом материале.

Серологическая идентификация

ИФ. Используют прямой и непрямой варианты при исследовании мазков крови и измененных органов, краткосрочных и персистирующих 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 пунтиров. 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, выпавших на 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 p24 ВБЛ. Количественные соотношения АТ анти-p24 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 p24 и, следовательно, серологические реакции, направленные на выявление анти-gp51 - АТ по своей чувствительности будут превосходить аналоги, в которых выявляется в качестве АГ p24.

В научно-исследовательских лабораториях для обнаружения специфических АТ используются РН, подавления раннего и позднего поликарпирования, нейтрализации псевдотипов и радиоиммуноанализ (РИА). Однако, для эпизоотологического обследования, контроля и борьбы с ВБЛ-инфекцией широко применяют РИД и ИФА, для постановки которых выделены соответствующие коммерческие диагностические наборы. Все

вышеперечисленные методы предназначены для выявления АТ в индивидуальных пробах сыворотки. Для обнаружения АТ в низких титрах, например, в индивидуальных пробах молока или в сывороточных пулах, 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 псевдотипа (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 гликопротеидным АГ - более чувствительный метод выявления инфицированных ВЛКРС животных, чем РДП с полипептидным АГ. РДП (РИД) в геле агара, направленная на выявление *aimi-gpSI* АТ, 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: качество АГ и контрольных сывороток, количественные соотношения АГ и АТ, качество агара, pH и ионная сила буфера, температура, диаметр лунок и расстояние между ними. Для постановки РИД выпускают диагностические наборы: Государственная Курская биофабрика (Россия); RIT-MAN-MOORE INC., Вашингтон (США), BEHRINGWERKE AG., Марбург (ФРГ), MERIEUX6 Лион (Франция), BIO-VETA NITRAA (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 Соренгаген) и предназначены для стандартизации всех диагностических наборов для постановки РИД и ИФА.

Реакцию учитывают через 48 ч и при следующих показаниях контроля: 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 танном 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, сохраняя 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 раза выше, чем в пробах сыворотки крови; исследовать необходимо первые порции молозива. Аналогичные данные получены сотрудниками ВИНВ. 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 сыворотках крови инфицированных животных. При этом используют в качестве клеточ-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 гематологических показателей с результатами серологических исследований был отмечен в РНГА.

ELISA. Широко применяют в США, Бельгии с использованием мнАТ для широкомасштабного выявления энзоотического лейкоза в стадах КРС. Чувствительность его выше, чем РДП. Метод ELISA при диагностике лейкоза КРС может существенно повысить чувствительность серодиагностики.

тности 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, снятые 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+р24) КРС. Этап 2. Антиген: а) надосадочная жидкость после культивирования клеток FLK-BLV; б) культуральная жидкость, содержащая продукты генов env или gag ВЛКРС, экспрессируемые рекомбинантными 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 использованных 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 микропанель

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 D9 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 р24, р15, р12, р10, gp30, и gp51. В иммуноблоттинге оказались активными монАТ к р24 и gp51. Данный метод оказался более чувствительным, чем иммунодиффузия в агаровом геле и ИФА. В ИФА возможно использование синтетических пептидов и 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, заглоточные, околушные и др.). Они плотной конси-

стенции, 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 гигантоцитов 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 и 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 с 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, индикации, 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 мягкой конечностей; общий объем испытуемого материала 2-3 мл. Появление афт на месте введения материала с последующим подтверждением в 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, щитовидной железы КРС и перевиваемые клетки - ВНК-21, IB-RS-2. Биопроба на мышах удобна и экономична. ИД₅₀ испытуемого штамма на мышатах-сосунках и крупном рогатом скоте одинаковы. Мышата-сосунки 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 лап 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 штормами, адаптированными к морским свинкам.

Для выделения вируса чаще всего используют культуру первично трипсинизированных клеток почек свиней или телят. Наблюдение за по-

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 быстры 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 клеток типа ВЯ его относят к тому типу, сыворотка против которого предотвращает ЦПД. Разработан вариант

универсальный эритроиммуноадсорбции (УЭИА), позволяющий определять АГ ВЯ в более высоких титрах, чем в РСК и РПГА.

ИФА. Высокоэффективен для выявления как 146S-, так и 125S-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 ВЯ 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 АТ к 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 мышатах и РН в культуре клеток.

Для достоверного выявления АТ и определения их типовой специфичности пробы сыворотки крови должны быть взяты не ранее 7 дней с момента появления у животных признаков везикулярного заболевания или проведения вакцинации. На исследование следует направлять 5-10 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 НИФ 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 АТ-АГ, не адсорбирующий комплемент. Связываясь с АГ быстрее полного 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 лапнированного 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, ВС Индиана и Нью-Джерси); 3) агар белый или импортный фирм "Серва" или "Дифко", азид пикриновая или кислота карболовая, 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, с которым 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 АТ 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 1 г.

ВЯ, вызвавший заболевание животных, относят к тому типу, при заражении которым привитые сывороткой мышата остались живы. Необходимым условием достоверной оценки реакции серозащиты является обязательная 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 АГ против данного типа ВЯ. Специфичность ЦПД можно установить путем последования в РСК культуральной жидкости, полученной из пробирок с выраженным ЦПД.

Дифференциальная диагностика. При дифференциальной диагностике ящура необходимо исключить ВС, ВЕС, БЭС, катаральную форму радку. Для дифференциальной диагностики в лабораториях используют диагностические наборы, выпускаемые биологической промышленностью, для ящура и ВЕС.

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 буivolами 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 оболочки 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 идентификация 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 унифицированного 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 $2-4^{\circ}\text{C}$ - не более 7 дн. В кусочках размером 1-2 см, помещенных в 10%-ный NaCl, вирус сохраняется при 2°C 15-30 дн. Вирусосодержащая нитратная кровь в условиях комнатной температуры сохраняет 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 $2-4^{\circ}\text{C}$ - 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°C , 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 млочодняк КРС или телят буйволов кровью или 10-20%-ной суспензией лимфоузлов, полученной от больных животных в первые 5 дн после забора

вания. 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 гибридизационного зонда. С помощью его (точной 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 эозинфильные 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 клетках, в том числе и в симпластах, образуются внутриядерные оксифильные включения в количестве 2-4. Хроматиновая сеть ядра нарушается лишь 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 неза-
раженной культурами клеток.

Предложена упрощенная модификация РСК для определения растворимых АГ ВЧ КРС. АГ готовят из лимфоузлов или селезенки КРС, коз и 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 лапинизированным, авинизированным или ЛТ-вирусами. Такие сыворотки нужны для обнаружения испытуемого АГ в РСК. Положительные сыворотки и соответствующие им контроли (нормальные сыворотки) получают на 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 4-6 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 диарси. 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 есте-

ственных 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 АГ остается неизменным. В этой реакции используют родство АГ ВЧ КРС и ВК. Особую ценность она имеет для диагностики случаев заболевания, вызванных штаммами с ослабленной вирулентностью.

ИФ. В качестве исследуемого материала используют мазки-отпечатки и гистологические срезы (селезенка, лимфоузлы, печень, слизистые оболочки ротовой полости и кишечника) из органов и тканей больных животных или инфицированные этими материалами культуры клеток. Возможно применение непрямого ИФ для обнаружения специфического АГ. Четкие результаты получают в случаях, если ФИТЦ-конъюгат изготовлен на основе гамма-глобулина, выделенного ионообменной хроматографией из специфической сыворотки. Прямая ИФ позволяет обнаруживать АГ в более ранние сроки: в мазках-отпечатках из органов больных животных через 2 ч, в зараженной культуре клеток - на 1 пассаж ранее появления ЦПД - т.е. раньше на 8-10 дн. С помощью прямой ИФ возможно оценивать результаты РН в культуре клеток через 24-48 ч после постановки опыта, тогда как для оценки реакции по ЦПД вируса требуется 6-8 сут. Поэтому прямой метод ИФ признан высоко-специфичным, чувствительным и пригодным для экспресс-диагностики чумы КРС.

РНГА и РЗГА. Обе реакции позволяют дифференцировать сыворотки и АГ при использовании обработанных дубильной кислотой эритроцитов крови коз. Реакции основаны на адсорбции перекрестных АТ из сыворотки, которая используется в РТГА.

ИФА. ИФА позволяет быстро выявлять АГ ВЧ КРС в патматериале. Наиболее часто АГ выявляли в мазках из пораженной слизистой роговой полости и лимфоузлов. АГ ВЧ наиболее часто выявляли у КРС моложе 3 лет, а у буйволов - в более старшем возрасте. В РДП и ИФА результаты совпадали, но последний позволял получить результат через 2-3 ч. Успешно вирус определяли в назальных и глазных секретах через 4 дня несмотря на то, что он там содержался в количестве не более 1,75lg ТЦД₅₀/мл. ИФА оказался более чувствительным по сравнению с выделением ВЧ КРС. Получены компоненты набора для диагностики чумы КРС методом твердофазного ИФА, которые обеспечивают обнаружение вирусспецифического АГ (нуклеопротеина) ВЧ КРС в лизатах зараженных клеточных культур и пробах органов больных животных, а также обеспечивали обнаружение АТ в сыворотках больных и переболевших животных. Чувствительность ТФ ИФА при выявлении специфических антител в сыворотках крови больных и иммунных животных (метод ингибирования) сравнима с чувствительностью РТНГА с использованием эритроцитарного диагностикума на основе моАТ к ВЧ КРС.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Для обнаружения АТ используют РН, ВИЭОФ, РРГ и ЕЛИЗА. Для серологического исследования берут кровь как можно раньше после установления клинических проявлений и повторно через 10-14 дней. Исследуют парные сыворотки крови не менее чем от 10 животных. ВНА и КСА у животных-реконвалесцентов обнаруживаются через 3-5 дней, поэтому чаще всего применяют РСК и РН. Ретроспективную диагностику чумы КРС проводят в очагах инфекции или при атипичном её течении на вакцинированном поголовье животных, имевших слабый поствакцинальный иммунитет. 4-кратное увеличение титра КСА и ВНА свидетельствует о наличии прошлой инфекции.

РСК. Применяют чаще всего. На 3-4-й день после снижения температуры у животных обнаруживают КСА в титре от 1:10 до 1:40. На 21-30-й день достигают максимума и удерживаются в течение 3 мес на уровне 1:80-1:160. Через 8 мес титр их составляет 1:20-1:40.

РН. Можно ставить на кроликах, имея лапцинизированный штамм. Учитывая дороговизну этого метода, его используют крайне редко. Реакция в культурах клеток с использованием адаптированных к ним штаммов - метод более простой и дешевой. Для выявления и титрования ВНА метод микротитрования не уступает пробирочному, но выгодно отличается

ся от него меньшей чувствительностью к колебаниям дозы. Чтобы избежать цитотоксического и ингибирующего проявления, рекомендуется делать первоначальное разведение сыворотки 1:5. Количественную РН можно проводить в двух вариантах: 1) с постоянной дозой вируса (200-500 ТЦД₅₀) и двукратно возрастающими разведениями сыворотки; 2) с постоянной дозой сыворотки (разведение 1:5-1:10) и 10-кратными разведениями вируса 10⁻¹-10⁻⁶.

РТГА. В качестве АГ в этой реакции используют вирус кори.

ELISA. Непрямой твердофазный микрометод позволяет обнаруживать АТ к ВЧ КРС. Данные его коррелируют с результатами РН. Считают, что указанный метод можно успешно применять для оценки эпизоотической ситуации и при проведении кампаний по вакцинации животных.

Проведена сравнительная оценка эффективности использования ИФ, ИФА и ВИЭОФ для выявления АТ против чумы КРС у телят, вакцинированных культуральной вирус-вакциной против чумы КРС. Исследования проведены с использованием первичных культур бычьей почки, выращенных на покровных стеклах и инфицированных шт. К90 ВЧ КРС, или с использованием мазков-отпечатков ткани лимфоузлов КРС, зараженного шт. Гиссар. При применении ИФА мазки-отпечатки предварительно обрабатывали антипероксидазной сывороткой для удаления эндогенной пероксидазной активности клеток лимфоузлов. Установлено, что в первые 7 нед после вакцинации у телят удавалось выявить АТ в 100% случаев всеми испытуемыми методами. В последующий период (с 8 до 12 нед после вакцинации) наиболее эффективным был метод ИФ (АТ выявлены у 84,6-100% 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 *micro ELISA*. Показаны преимущества конкурентного ЕБЗА со специфически 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 компонента.

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 ката-

ральная 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, срезах), 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 ППД, 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 пато-

логическим 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 непрямой 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, полученный 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, её 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 удастся четко выявить перекрестную АГ-связь между ними. В качестве испытуемого АГ используют культуральную вируссодержащую 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 РИ 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 ВНА 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 (ВAV1 и ВAV3) и 2-й подгруппы (ВAV7), которые были рекомендованы при разработке иммуоферментного 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 РИГА.

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 и 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 |
|-------------|-------------|---|
| HA | G1 | A/WS/33; A/FM/1/47; A/свинья/Айова15/30 |
| | G2 | A/Сингапур/1/68 |
| | G3 | A/Гонконг/1/68; A/лошадь/Майами1/63; A/утка/Украина1/63 |
| | G4 | A/утка/Чехословакия/56 |
| | G5 | A/крачка/Ю. Африка/61 |
| | G6 | A/индюк/Массачусетс 3440/65 |
| | G7 | A/лошадь/Прага1/56; A/FPV/Dutch/27 |
| | G8 | A/индюк/Онтарио 6118/68 |
| | G9 | A/индюк/Висконсин/66 |
| | G10 | A/цыпленок/Германия/49 |
| | G11 G12 | A/утка/Англия/56; A/утка/Альберта 60/76 |
| NA | H1 | A/WS/33; A/PR/8/34 |
| | H2 | A/Сингапур/1/57 |
| | H3 | A/крачка/Ю. Африка/61; A/индюк/Англия/63 |
| | H4 | A/индюк/Онтарио 6118/68 |
| | H5 | A/буревестник/Австралия/72 |
| | H6 | A/утка/Англия/56 |
| | H7 | A/лошадь/Прага1/56 |
| | H8 | A/лошадь/Майами 1/63 |
| | H9 | A/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 туха - 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(H1N1). Вирионы представляют собой частицы плеоморфной, 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 (NA, NA, M1) входят в состав липопротеидной оболочки, причем 2 из них (NA и NA) являются гликопротеинами. Гликопротеины образуют 2 вида выступов наружной оболочки вирионов. Выступы 1-го вида образованы гемоглаутинином (NA) с мол.м. 75-80 кД (около 500 а.к.). Каждый выступ состоит из 3-х молекул NA, 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 (НА) с мол.м. 60-70 кД (450-470 а.к.). Все подтипы НА и НА вируса гриппа А обозначают последовательными номерами независимо от происхождения вируса. Установлено 14 АГ подтипов по НА и 9 подтипов по НА. 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 тогоподобные 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 Н1N1, выявлено не менее 4 АГ детерминант нейраминидазы. Четкие различия выявлены также у НА штаммов вируса гриппа А птиц с АГ формулой Н3N8, следовательно, НА штаммов вируса гриппа А птиц с АГ харак-

теристиками H1N1 и H3N8 имеет на своей поверхности не менее 4-х АГ различных детерминант: 1 общую для вирусов, имеющих одинаковый серо-подтип, 2 - перекрестно реагирующих и 1 - штаммоспецифическую.

Таблица 106 - Обозначения серотипов вируса гриппа А птиц

| Серовариант | Наименование штамма | Формула |
|-------------|--|---------|
| 1. | А/утка/ Ал ьберта/3 5/7 6/ | H1N1 |
| 2. | А/утка/Германия/ 1215/73 | H2N3 |
| 3. | А/утка/Украина 1/63 | H3N8 |
| 4. | А/утка/ЧССР/56 | H4N6 |
| 5. | А/крачка/Ю . Африка/6 1 | H5N3 |
| 6. | А/индюк/Массачусетс/3 740/65 | H6N2 |
| 7. | А/вирус чумы птиц/Росток/34 | H7N1 |
| 8. | А/утка/Онтарио/б 1 1 8/68 | H8N4 |
| 9. | А/индюк/Висконсин(1 /66) | H9N2 |
| 10. | А/цыпл енок/Германия/4 9 | H10N7 |
| 11. | А/Утка/ Англ ия/5 6 | H11N6 |
| 12. | А/утка/ Альберта/60/ 1 6 | H12N5 |
| 13. | А/черноголовый хохотун/ Астрахань/ 142/7 | H13N2 |

Кроме 13 подтипов ГА, все штаммы ВГП содержат в своей структуре НА или птичьего, или человеческого, или лошадиного происхождения. Собственно птичьей НА известно 6 типов, Подтиповая классификация ВГП продолжается и по сегодняшний день, т.к. новые факты выделения их от птиц различных видов регистрируются ежегодно в различных регионах земного шара. В 1971 г. была опубликована номенклатура вирусов гриппа А, рекомендованная группой экспертов ВОЗ. Согласно этой рекомендации каждый штамм обозначается по месту и времени выделения, а в скобках указывается его АГ формула. Эта номенклатура себя оправдала, однако накопившиеся за последние годы данные требуют ее пересмотра. В 1980 г. ВОЗ предложила новую номенклатуру ВГП. Предложено обозначать серотипы ГА и НА последовательными номерами, независимо от происхождения вирусов. Таблица эталонных штаммов ВГП свидетельствует о том, что изменения нуклеотидной последовательности и, как следствие, замена аминокислотных остатков сопряжено с изменением патогенности вируса гриппа в отношении птиц и КЭ. Так, например, изолят А/индюк/Висконсин/68

| Серовариант | Наименование штамма | Формула |
|-------------|--|---------|
| 1. | А/утка/Альберта/35/76/ | H1N1 |
| 2. | А/утка/Германия/1215/73 | H2N3 |
| 3. | А/утка/Украина/1/63 | H3N8 |
| 4. | А/утка/СССР/58 | H4N6 |
| 5. | А/храчки/Ю. Африка/61 | H5N3 |
| 6. | А/индюк/Массачусетс/3740/65 | H6N2 |
| 7. | А/вирус чумы птиц/Росток/34 | H7N1 |
| 8. | А/утка/Онтарио/6118/68 | H8N4 |
| 9. | А/индюк/Висконсин/1/66) | H9N2 |
| 10. | А/шыпленок/Германия/49 | H10N7 |
| 11. | А/Утка/Англия/56 | H11N6 |
| 12. | А/утка/Альберта/60/16 | H12N5 |
| 13. | А/черноголовый хохотун/Астрахань/142/7 | H13N2 |

(H5N9) ВГП состоит из 2-х популяций вируса, имеющих разные гены NS и вызывающих разные биологические реакции. Анализ АГ свойствами методами ИФА и РТГА свидетельствует о родстве внутренних белков "человеческих" и "птичьих" вирусов гриппа и различиях в структуре поверхностного гликопротеина - ГА.

Спектр патогенности в естественных условиях. Он неоднороден и зависит от АГ подтипа. Известны 2 подтипа ВГП; А5 и А7, вызывающих заболевание типа КЧП. Грипп А7 КЧП чаще поражает птиц семейства куриных, менее восприимчивы водоплавающие птицы.

Дикис утки и др. виды водоплавающей птицы также чувствительны даже к самым слабопатогенным штаммам ВГП и являются не только переносчиками инфекции, но и резервуаром. Сезонные миграции диких птиц вызывают сезонные заболевания болотных птиц.

Из 14 подтипов вируса гриппа А только 3 обнаруживаются у человека (Н1, Н2 и Н3). Прошло уже 25 лет с тех пор как из человеческой популяции исчез подтип Н2 вируса гриппа. Однако ген ГА Н2 циркулирует среди птичьих штаммов вируса гриппа.

Лабораторная диагностика гриппа птиц

Поставить диагноз на грипп птиц можно путём выделения вируса и идентификации его в РСК, РИ и РТГА, а также выявления специфических АТ в процессе эпизоотии или по прошествии её (ретроспективная диагностика). В нашей стране биопромышленность выпускает 2 диагностических набора:

а) набор специфических АГ и сывороток к ним для диагностики гриппа птиц 13-и серотипов;

б) диагностический набор для идентификации вируса НВ 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 ЭИДзо/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 аллантоисную 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 рег ос с кормом и водой удаётся 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 не 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 моАТ 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 установить родственных связей между выделенным и эталонными штаммами вируса гриппа по антисывороткам к ним. В этом случае в РСК с эталон-

ными 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 свежепавшей 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 РЕГ-1 или фрагментами селезенки гипериммунных животных. МонАТ дают возможность точно проследить филогенетические взаимоотношения между вирусными штаммами в составе субтипа, а в сочетании с методами пентидного 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 противогриппоз-

ных 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 реакции 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 анти-ГА.

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 РИФ. 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 (H7N1) | КЧП | Вирус НБ |
|--|--------------|------------|------------|
| Экспресс-диагностика (РГА) | | | |
| взрослых кур | + | - | - |
| цыплят | + | + | + |
| РГА с эритроцитами: | | | |
| петуха | + | + | + |
| лошади | + | - | - |
| 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 КЭ | + | + | + |
| <i>Сроки гибели заражённых:</i> | | | |
| эмбрионов (зависит от дозы) | До 30 ч | Более 30 ч | Более 30 ч |
| птицы | 48 ч | 96 ч | 96 ч |
| Патогенность для: мышей - | + | - | - |
| голубей - | - | + | + |
| Титр ГА в ХАО/титр ГА в аллантоисной жидкости | >1 | <1 | <1 |
| Чувствительность к фотодинамическому 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-

А 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 (Н7N1) 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 животных. 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 аллантаисную или амниотическую 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 поросята - универсальная биологическая система, применяя которую можно выделить вирус от больных свиней. Для быстрой индикации вируса гриппа в 1-слойных культурах почечного эпителия поросят используют РГАД 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 дня 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 удается 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 аллантаисного АГ не требует титрования комплемента

в их присутствии, так как они не обладают антикомплементарными свойствами. При идентификации вирусов гриппа РСК не заменяет РТГА, позволяя установить типичную 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 реализации 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

ки, 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 излятов 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 запатентован 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 сыво-

ротки 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 свежееотмытых 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 аллантоисной 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 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 свинных 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 антинейраминидазных 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 в 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 сывороток 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. Птицы 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 одно-

го 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 по 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. Кролик 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 РИ. Вирулентные штаммы вируса образуют типичные симпласты. Штаммы, многократно пассированные в культуре куриных фибробластов, вызывают менее выраженного симпластообразование 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 тельца-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 РИ в культуре клеток или на кроликах, метод флюоресцирующих антител. РДП, РИГА, 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.

РИ. 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 антибиотики, 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°С). Перед постановкой реакции их размораживают, инактивируют прогреванием в водяной бане при 56 Г. 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 полосы 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 диастимула 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 адьювантом Фрейнда. Через 9 дней инъекцию повторяют. Иммунопероксидазный метод по чувствительности равен иммунофлюоресцентному, превосходит метод выделения 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 эпителии слизистой оболочки фарингиальной области. Эндогенная пероксидазная активность была небольшой в мазках из мозга и значительной в фарингиальных препаратах за счет воспалительных клеток и эритроцитов. Фиксированные препараты-отпечатки из мозга и фаринкса выдерживают, хранение при комнатной температуре в течение 144 ч, что важно при транспортировке материала в лабораторию.

Метод рестрикционного анализа и гибридизации. Разработана экспресс-диагностика болезни Ауески у свиней с помощью специфических

гибридизационных зондов. Предложен метод точечной гибридизации (ДНК-зонда) для выявления вируса в материалах из органов свиней. Данный метод позволит выявлять геном вируса при латентной инфекции. Гибридизационные 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 положительно 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 вакцинированных.

Диагноз на инфекцию ставят обычно при помощи РН в культуре клеток, определяя титры вируснейтрализующих антител к вирусу Ауески в сыворотках крови реконвалесцентов.

Для серологического исследования животных берут не менее 5 мл крови. Сыворотку получают методом отстоя, хранить ее можно до 10 сут при 4°C. При длительном хранении следует заморозить.

Для более точной диагностики лучше исследовать парные сыворотки, взятые с интервалом в 3-4 нед. Титры антител у переболевших животных могут колебаться в широких пределах - от 1:32 до 1:256. У поросят и подсвинков, зараженных вирусом Ауески, специфические вируснейтрализующие антитела появляются к 6-8-му дню после заражения, достигая максимума через 3-4 нед. Через 100 дней после заражения титры вируснейтрализующих антител начинают снижаться, а через 135 дней антител уже обычно не находят. У естественно больных и переболевших подсвинков вируснейтрализующие антитела удается установить примерно в те же сроки, хотя в сыворотках переболевших свиней их иногда удается обнаруживать 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 ПЦД₅₀/0,1 мл) и разными разведениями сыворотки (от 1:2 до 1:16) по об-

щепринятой 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 в 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 телят. Перед постановкой реакции культуральный вирус размораживают, центрифугируют в течение 30 мин при 2500-3000 об/мин, после чего надосадочную жидкость собирают и в соответствии 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°С 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 об-

наруживали 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 агаревом геле с сыворотками в титре 1 : 4 в 100% случаях.

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 рН 9,6 адсорбируют в течение ночи при 4 °С в луночках микропанели. После этого луночки промывают, вносят пробы испытываемых сывороток в разведении 1:160 в твин-20-фосфатно-буферном растворе и инкубируют 2 ч при комнатной температуре. Фиксацию антител на антигене определяют добавлением антисвинных 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 рН 5 при комнатной температуре. Реакцию прекращают через 15 мин добавлением 50 мкл 2NH₂SO₄.

Метод ELISA оказался более чувствительным и быстро выполнимым тестом, чем РН в культуре клеток. После ультрафиолетового облучения луночки с иммуносорбентом можно хранить при 4 °С 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%.

РИД. 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 Бич 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, уду-

шь, 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 хорионалантоиса. Узелковые поражения обнаруживаются по всей поверхности хорионалантоиса, очаговые — только на 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 интраэсального 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 $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ 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 промывают, 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^{11} 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 эпителии 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 мединала. 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 внутрибрюшинно инъецируют 10 мл вируса, а на следующий день — кролику внутрибрюшинно 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 переболе-

нии 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. Надсадочную 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: вируссодержащий материал концентрируют полиэтиленгликолем с мол. массой 6000; конечная концентрация его в вируссодержащей 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 четырем куриным эмбрионам 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. Её впервые диагностировал и описал Кранвелл 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 тщательно 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 в 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 удается 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 позволяет 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 аллантоисную 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 партия

зараженных убивают, оставляя их при 4°C на ночь. Остальные 5 КЭ инкубируют до 120 ч и затем убивают. Аллантоисную 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.

Неудачным оказался метод выделения вируса от зараженных иммунных кур: чем выше иммунитет у несушек, тем меньше вероятность выделения 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 вируссодержащей 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 вирусов 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 кровякапельной реакцией гемагглютинации (ККРА). Простота постановки её, совмещение исследований на НБ и пуллороз позволяют включить ее в технологический процесс ветообработки 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 (аллантаическая жидкость). РТГА ставят общепринятым методом в макро- и микровариантах. Идентификацию вируса считают завершённой, 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 аллантаической жидкости и 1%-ную суспензию куриных эритроцитов. Затем ставят пробу на нейтрализацию ГА-активности. Для этого на предметное стекло наносят каплю той же аллантаической 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 везикулярных 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.

РИГА. Во ВНИВИП разработана методика получения высушенных стандартных высокочувствительных и специфических эритроцитарных тест-препаратов с АТ 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 B₁, 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 везикулярных 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 - везикулярные 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. Диагност ставят в течение 3 дн после получения проб. Самое слабое связывание комплемента вызывают везикулярные дикие штаммы, самое сильное - летогенные (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 диагностические 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 крупозно-дифтерийским 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 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 плема, фибринозный плеврит и перикардит, некроз миндалин. Хрониче-

ская 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 гибридационного зонда используют комплементарную ДНК (меченую ^{32}P) 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 пестивирусы. 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, оборачивают 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 телят. 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 флюоресцирующими 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 включения, 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 обнаруживается картину глубокого цитоллиза 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, цен-

трифугируют и надосадочную жидкость используют для заражения животных. Трем пороссятам вводят подкожно по 1 мл крови или по 2 мл суспензии органов. Двум животным исследуемый материал не инокулируют, содержат их отдельно для контроля. Двум пороссятам, 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, подсыпки 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

Иммунофлюоресценция. 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 pH 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 pH 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 большой 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 трудоемкость, 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 клеток.

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) АГ-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 ИЭОФ необходим специальный прибор для электрофореза, дающий регулируемое напряжение постоянного тока до 300В. ИЭОФ 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 лимфоузлах 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 NERES. 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 коли-

честве 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 инкубируют при 37°C. Реакцию учитывают через 48 ч инкубации. Препараты вынимают из пробирок, ополаскивают в 0,01 М ФБР рН 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 АГ, но требует значительно меньшего труда. Предлагаемый метод обладает рядом преимуществ: исключает необходимость использования ИФ; учет результатов можно проводить без микроскопа; реакцию ставят микрометодом; используемый вирус аттенуирован. Для постановки РИ необходимо вначале провести титрование ВКЧС.

Титрование ВКЧС. Поскольку титрование на чувствительных подсвинках 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 флуоресцирующих 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 флуоресцирующие 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 типами вируса по ЦПД, ИФ и титром патогенным для свиней.

ИЗОФ. Используется в 1%-ной агарозе как диагностический при выявлении АГ к ВКЧС в сыворотках зараженных свиней. Для исследования применяется АГ, экстрагированный из зараженных ВКЧС клеток

PK-15. Показано, что этот культуральный АГ ВКЧС идентичен пресципирующему 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 PK-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 PK-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

ре 5% CO₂. Продуцирующую специфические АТ культуру дважды субклонировали и после определения изотипа АТ инокулировали интранспиронеально мышам BALB/c. Образующаяся асцитная жидкость содержала высокие концентрации монАТ, которые после соответствующей очистки конъюгировали пероксидазой хрена.

Разработали способ изготовления иммуоферментных конъюгатов для ИФА с использованием монАТ к ВКЧС с сохранением активности фермента и высокой специфической активностью иммуноглобулина, а также метод флуоресцирующих 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, паратифа и гриппа. При африканской чуме ярче выражен геморрагический диатез, увеличена и размягчена селезенка, полнокровие и кровоизлияния в почках. Чаще поражаются, имея вид кровяных сгустков, портальные, 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 струпуев 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 вирусосодержащего 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 gm.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 Доул 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, иннапаратным источником для восприимчивых свиней.

Вирус инфекционного гастроэнтерита свиней (ВИГС) – сем. *Coronaviridae*, род *Coronavirus*. ВИГС впервые выделил и описал японский исследователь Тайма (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 сли-

зистой 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); органичные 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°С. При -28°С вирус остаётся активным около 3,5 лет. При 4°С 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°С и использовать по мере надобности в течение 2-3,5 лет. Для вирусологических исследований оттаиванию подвергают лишь необходимую часть патологического материала. Исходный материал старается постоянно 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 паренхимы

маточных 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 монослоя. 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 - надежный метод выделения вируса. У зараженных животных вирус сравнительно легко удается 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 удается 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 сыпороток, 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 супоросная 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 коронавирусов. 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 дня 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 просмотреть 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 пилорического 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 плазм-

матрической 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 перитонеальной жидкости больной 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, полу-

чены 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 моАТ 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 моАТ, 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 моАТ и поликлональных АТ для выявления АГ ВТГС 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 моАТ. Показано существование 6 различных эпитетов ВИГС (шт. ТО-163). Антигенная вариабельность вируса имеет эпизоотологическое значение и должна подтверждаться с помощью моАТ. Метод гибридизации нуклеиновых кислот недавно разра-

ботан для обнаружения ВИГС по геномной последовательности в образцах кала или инфицированных тканей. Остатки (фрагменты) РНК 5'-конца ВИГС пепломерного гена не отличаются от ВГГС 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 свиней - 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 свиней 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 АГ 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 АГ 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. АГ у заражённых поросят выявляются на 4-й день. РНГА используют как для подтверждения клинического диагноза, так и для выявления скрытых форм болезни и вирусоносительства. Реакция позволяет выявлять антитела к ВИГС в 2 раза чаще, чем РН. В бывшем СССР разработан эритроцитный диагностикум, с помощью которого можно выявить специфические АГ у вакцинированных и больных ИГС.

ИФ. Описана модификация этого метода, обеспечивающая быстрое выявление и титрование АГ к ВИГС. Сущность её заключается в приготвлении большого количества тефлонизированных стёклышек с лунками, содержащими АГ ВИГС. Их получают путём посева в лунки смеси инфицированных и неинфицированных клеток перививаемой линии свиньи 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 флуоресценцию 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 АГ к ВИГС. АГ в данной реакции служит щелочной экстракт содержимого кишечника поросят, заражённых ВИГС.

ELISA. Успешно используется для выявления и количественного определения сывороточных АГ к ВИГС. При исследовании сывороток от поросят, инокулированных культуральным или кишечным ВИГС, ELISA выявлял АГ к вирусу в среднем на 3 дня раньше, чем РН при исследовании проб сывороток от поросят, заражённых культуральным вирусом, и

на 1 день раньше при обследовании сывороток от поросят, заражённых 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 прямой (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 свиней. 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 свиней доминируют рота- 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 их способностью вызывать тяжелые гастроэнтериты и атрофию ворсинок в экспериментальных условиях у поросят-протобиотов 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 инфицированных 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 гипоспецифическими 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 (гиперестезия, 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 РН 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 определения 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 контагиозное 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 перикардальной 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, репро-

дуцированного в культуре клеток MARC-145 и FL. Предварительно вирусосодержащая 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 не прямой 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 могут 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 и вирусологических исследованиях. Для изолирования вируса суспензию из головного мозга, лимфоузлов глотки и легких, подозреваемых особей, инокулируют в первичную культуру клеток почки поросенка (или, переносимую 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 вирусспе-

цифического АГ вируса в клетках срезов органов, замороженных в криостате). Для определения вирусспецифических АТ используют РЗГА, РИ 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 вирусосодержащего 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°С.

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 | Гидропирическая листрофия | Гиперплазия | Внутриклеточные включения | Клеточная инфльтрация | 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 поросятах. 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 кож-

ной 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" околоядерной зоны в пораженных эпителиальных клетках является патогномоничным для ВОС.

Оспу у свиней следует дифференцировать от экзантем, появляющихся при авитаминозах, аллергии и нарушении обмена веществ, энзоотической бронхопневмонии, стрептококковом сепсисе, паратифе, чесотке, лишае, ВВС 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 соответствующих возбудителей.

Таблица 109 – Дифференциальная диагностика оспы овец

| Заболевание | Восприимчивость | Заражение | ИП | Морфология оспин | Вторичн осп. | Течение бол. | ДБ | Срок появл. имм. | X А О | Чувств. культ. кл. |
|-----------------|--|-------------------|--------------|--|---------------------|------------------------|-------|------------------|-------|---------------------------|
| Натуральная ВОС | Часто в легких, преимуществ. мезентрик | Накожно, в/к; в/в | 4-7 10-14 | Центр чаше, окантована возвышенностью с корочками | Через 15-20 дн | Медленное с лихорадкой | 20-60 | 21-22 | 0 | Только в культ. кл. ВОС |
| Оспенная | Легко, всех возрастов | То же | 2-3 4-5 | Пузырьки со средн. кор. Возвыш. пупырышек неяркая | Быстро, 1-2 хоралка | + | 9-14 | 10-14 | + | В культ. кл. Рядких видов |
| Оспа коз | Редко, оспин любого возраста | Накожно | 4-5 | Быстро подсыхающие пузырьки меньшего размера чем при ВОС | - | Обычно без лихорадки | 6-8 | 10-14 | + | То же |
| Оспа свиней | Редко, обычно подсыхают до 6-й мес. | | 4-5 | Крупн. с пузырьками поперек в углублении по краям, вторичн. пузырьки, а далее в центре корочки | Быстро, 1 хоралка | То же | 6-8 | 12-16 | + | То же |

Обозначения: + наличие репродукции на ХАО; 0 - отсутствие таковой. ИП - 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" КЛЮ) - 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. неблагополучными 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 пробами 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 КЛО проводят иммобилизацию *Culicoides* триэтиламинол, 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 КЛО используют перевиваемую линию клеток С 6/36, полученную из личинки *Aedes albopictus*. Эта линия высоко чувствительна, пригодна для первичной изоляции вируса КЛО 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 КЛО.

Установлена высокая чувствительность метода выделения вируса и 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 КЛО, которая часто протекает субклинически у домашних и диких животных, может быть прове-

дена 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 КЛО. РН в культуре клеток служит наиболее общепринятым методом выявления типоспецифических АТ. Во ВНИИЗЖ также получены монАТ для постановки ингибирования ТФ ИФА.

КЛО 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 оспу 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 розеола, 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 наименьших молодых овцах. Испытуемую суспензию, приготовленную общепринятым методом в разведениях 1:20 и 1:200, инокулируют внутрикожно 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, некроз), специфичность которого подтверждают методом вирусоскопии мазков, приготовленных из срезанного эпителия розеола, 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 овинной, 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 иммуоэлектрофорез
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
ГЛЕ – гемагглютинирующая единица
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИФ – иммунофлуоресценция
ИФА – иммуноферментный анализ
ИОЭФ – иммуоэлектроосмофорез
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 – хориоалантоисная 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 иерсиниозов..... | 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 браззота 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 нокаридиоза..... | 275 |
| Лабораторная диагностика бруцеллеза..... | 278 |
| Лабораторная диагностика туляремии..... | 296 |
| Лабораторная диагностика пастереллеза..... | 302 |
| Лабораторная диагностика гемофильного полисерозита поросят..... | 309 |
| Лабораторная диагностика гемофилеза кур..... | 312 |

РГА – реакция гемагглютинации
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
РПГА – реакция пассивной гемагглютинации
РВИЭОФ – реакция встречного иммуноэлектроосмофореза
РНИФ – реакция непрямой иммунофлуоресценции
РИФ – реакция иммунофлуоресценции
РРГ – реакция радиального гемолиза
РИД – реакция иммунодиффузии
РРСС – респираторный и репродуктивный синдром свиней
СТГС – синдром «голубой глаз»
ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза
ТФИФА – твердофазный иммуноферментный анализ
ТГС – трансмиссивный гастроэнтерит свиней
ХАО – хориоалантоисная 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 нокаридиоза..... | 275 |
| Лабораторная диагностика бруцеллеза..... | 278 |
| Лабораторная диагностика туляремии..... | 296 |
| Лабораторная диагностика пастереллеза..... | 302 |
| Лабораторная диагностика гемофильного полисерозита поросят..... | 309 |
| Лабораторная диагностика гемофильеза кур..... | 312 |

| | |
|---|-----|
| Лабораторная диагностика актинобациллезной пневмонии свиней..... | 315 |
| Лабораторная диагностика бортелиоза..... | 321 |
| Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота..... | 326 |
| Лабораторная диагностика инфекционного тромбоэмболического 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 диарси 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 |

| | |
|---|-----|
| 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 гидрперикардита 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. Антонов 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. Бабич 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 коагулирования 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. Копловский Е. В, Емельяненко П.А. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник. - М. Агропромиздат 1989.
19. Кошачев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.
20. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родионова 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.

