

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ**

**А.А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ,  
Л.В. ШЕВЧЕНКО, Г.А. ДЖАИЛИДИ,  
Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ. Е.А. ГОРПИНЧЕНКО**

**ДИАГНОСТИКА АКТИНОМИКОЗА**

**Учебное пособие**

**г. Краснодар, 2013**

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**А. А. ШЕВЧЕНКО,  
О. Ю. ЧЕРНЫХ,  
Л.В. ШЕВЧЕНКО,  
Г.А. ДЖАИЛИДИ,  
Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ,  
Е.А. ГОРПИНЧЕНКО**

**ДИАГНОСТИКА АКТИНОМИКОЗА**

**Учебное пособие**

**Для студентов высших учебных заведений факультета  
ветеринарной медицины по направлению подготовки  
«Ветеринария»**

**КРАСНОДАР, 2013**

УДК 619:616.992.28А-07(075)

ББК 48.73

Д 44

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,  
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев, Е.А. Горпинченко

Учебное пособие «Диагностика актиномикоза».

Краснодар: КубГАУ, 2013. 12 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителей актиномикоза; описаны бактериоскопические, бактериологические, биохимические, биологические и серологические методы диагностики и дифференциальной диагностики заболевания.

#### РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Лысенко А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, декан факультета ветеринарной медицины КубГАУ.

Куриннов В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии.

Рекомендовано методической комиссией факультета ветеринарной медицины КубГАУ протокол №3 от 19 ноября 2012 года.

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

## Диагностика актиномикоза

**Цель занятия:** изучить правила отбора патологического материала и отправки в ветеринарную лабораторию, основные свойства возбудителей актиномикоза, методы лабораторной диагностики.

Диагностика актиномикоза животных проводится комплексно, учитывают эпизоотологические данные, клинические признаки, патологоанатомические изменения и лабораторные исследования.

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 или кишечника; *A. suis* вызывает у свиней актиномикоз молочной железы; *A. israelii* — основной возбудитель актиномикоза человека, может быть причиной эндометритов, цервицитов и конъюнктивитов, ассоциируется с актиномикозом крупного рогатого скота и свиней, естественное место обитания — ротовая полость, слизистые кишечника людей; *A. pyogenes* — вызывает гнойные процессы у животных, в том числе маститы коров, перитониты у свиней, естественной средой обитания являются слизистые оболочки; *A. viscosus* — возбудитель актиномикоза собак; *A. hordeovulneris* — вызывает у собак абсцессы, плевриты, перитониты, артриты.

**Лабораторная диагностика** болезней, вызываемых перечисленными видами бактерий, основана на результатах бактериологического исследования.

### **Бактериологическое исследование**

Объектом исследования является гной, экссудат, содержимое абсцессов, пораженные лимфатические узлы. Тканевый материал в случае необходимости консервируют в 30%-ном водном растворе глицерина.

### **Микроскопическое исследование исходного материала**

При диагностике болезней, вызываемых *A. bovis* и *A. viscosus*, существенное диагностическое значение имеет микроскопия зернистых 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 дифтероидные формы.

### **Выделение и идентификация патогенных видов рода *Actinomyces***

**Культивирование.** Посев исследуемого материала производят на кровяной агар (кровь овец, крупного рогатого скота). Посевы материала, предположительно содержащего *A. bovis*, культивируют в аэробных условиях в атмосфере 10% CO<sub>2</sub>; *A. hordeovulneris* растет в аэробных и анаэробных условиях с содержанием в атмосфере 10% CO<sub>2</sub>. *A. pyogenes* и *A. viscosus* растут в аэробных условиях с 10% CO<sub>2</sub>. Контаминированный материал высевают на селективные среды. Для выделения *A. israelii* из контаминированного материала на неселективных средах следующую его предварительную обработку. Материал суспендируют в транспортной среде Syed: раствор 1-0,6% раствор K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, раствор 2-1,2% раствор NaCl, 1,2% раствор (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,6% раствор KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25% раствор MgSO<sub>4</sub>. Готовая среда содержит 75 мл раствора №1, 75 мл раствора № 2, 10 мл 1М раствора этилендиаминотетраацетата, 20 мл свежего 1%-ного рас-

твора дитиотреитола, 5 мл 8%-ного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1 мл 1%-ного раствора резазурина, 814 мл дистиллированной воды, рН 8,0. Среду стерилизуют фильтрацией. Исследуемый материал суспендируют в транспортной среде. 1 мл суспензии смешивают с 1 мл толуола и встряхивают 20 минут. Водную фазу отсасывают пипеткой, добавляют к ней 10 мл транспортной среды, центрифугируют и осадок высевают на неселективные питательные среды.

Эффект обработки основан на ингибирующем действии толуола на грамотрицательные бактерии. Посевы культивируют при 36-37° С от 2-4 до 14 дней.

**Особенности роста актиномицетов на питательных средах.** *A. bovis* на плотных питательных средах образует нитевидные микроколонии через 24 часа; позднее — макроколонии диаметром около 2 мм, непрозрачные, белые, серо-белые, кремово-белые, шероховатые или гладкие, без зоны гемолиза, мягкой консистенции. Рост медленный, типичные колонии формируются к 14-15 дню культивирования. Возбудитель хорошо растет (диффузно) в тиогликолатном бульоне к 7-10 дню инкубирования.

*A. pyogenes*. Нитевидных микроколоний не образует, через 48 часов инкубирования формирует колонии размером около 1 мм с узкой зоной β-гемолиза, выпуклые, с ровными краями, непрозрачные, белые или 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 микроколонии, позднее (14 дней культивирования) формируются колонии размером около 2 мм, приподнятые, с волнистым краем, с нитевидными отростками, непрозрачные, белые, серо-белые, кремово-белые, шероховатые, сухие или мягкой консистенции, обычно без зоны гемолиза.

*A. suis*. Образует колонии размером до 2 мм, гладкие, непрозрачные, выпуклые, центр может иметь углубление, края волнистые с отростками, белого или серо-белого цвета. Колонии могут быть шероховатыми или гладкими, сухими или мягкими.

*A. israelii*. Образует нитевидные микроколонии на плотных средах, к 14 дню - макроколонии R- формы, диаметром около 2 мм, выпуклые, центр может иметь углубление, края волнообразные и нитевидные, непрозрачные, белого, серо-белого, кремово-белого цвета, по консистенции сухие, крошкообразные или мягкие.

**Морфология клеток актиномицетов в культуре.** Морфология клеток в культуре у ряда актиномицетов отличается от таковой в исследуемом материале.

*A. bovis*. В препаратах, окрашенных по Граму, клетки имеют форму грамположительных палочек, коккобактерий, палочек с утолщенными или разветвляющимися концами, могут присутствовать нити различной длины.

*A. pyogenes*. В препаратах находят типичные для рода полиморфные грамположительные палочки.

*A. viscosus*. В мазках из крупных колоний обнаруживают грамположительные дифтероидные палочковидные клетки, в мелких колониях — 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 клеток, рост на грибных средах, наличие воздушных гиф, образование спор, фрагментацию гиф наличие запаха у колоний, тип утилизации углеводов (оксидация, ферментация в тесте Хью - Ляйфсона).

На основании перечисленных признаков для дальнейшего изучения отбирают культуры бактерий, типичные по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам для *Actinomyces*, растущие в анаэробных или капнофильных (CO<sub>2</sub>) ус-

ловиях атмосферы, не имеющие запаха, дающие отрицательную (чаще) или положительную (реже) реакцию на каталазу, не проявляющие при окраске по модифицированному методу Циля — Нильсена кислотоустойчивое™, не растущие на средах для культивирования грибов, не образующие воздушных гиф, спор, не проявляющие склонности к фрагментации нитей (гиф), расщепляющие углеводы (глюкоза) в тесте Хью — Ляйфсона путем ферментации.

**Таблица 1 - Родовые признаки Actinomyces**

Признаки	Actinomyces	Nocardia	Streptomy-	Dermatophilus
Отношение к кислороду	Анаэробы или капнофилы	Строгие аэробы	Аэробы	Аэробы/ капнофилы
Каталаза	- (+)	+	+	+
Частичная кислотоустойчивость при окраске по модифицированному методу Циля-Нильсена	-	+	-	-
Подвижность	-	-	-	+ (зооспоры)
Рост на декстрозном агаре Сабуро	-	+	+	-
Воздушные гифы	-	+	+	-
Споры	-	+ (конидии)	+ (конидии)	+ (зооспоры)
Фрагментация гиф (нитей)	-	+	+	+
Запах культуры	-	-	Острый, почвенный	-
Метаболизм	Ферментация	Оксидация	Оксидация	Слабая ферментация
Резервуар	Слизистые рта и носоглотки	Почва	Почва	Больные и животные-носители
Ветеринарное значение	Локальные и системные болезни, характеризующиеся образованием гранул на коже, под кожей и в органах		Не патогены	Вызывают поражение кожи

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



**Идентификация представителей рода *Actinomyces* на видовом уровне.** У выделенных культур, отвечающих родовым признакам *Actinomyces*, изучают с целью определения их видовой принадлежности более широкий круг ферментативных свойств.

**Таблица 2 - Свойства основных патогенных для животных видов рода *Actinomyces***

Признаки	Вид			
	<i>A. bovis</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. hordeovulneris</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 каталазы	-	+ (слабая реакция)	-	+ (слабая реакция)
САМР - тест с <i>S. aureus</i>	-	-	+	-
Разжижение сыроворотки в среде Леффлера	-	-	+ (через 24-48 ч)	-

**Биопроба.** Заражение лабораторных животных в диагностике болезней этой группы обычно не применяют. *A. pyogenes*, например, проявляет слабую и вариабельную патогенность. При подкожном заражении *A. pyogenes* у животных развиваются подкожные абсцессы, 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 (су-

хой) — 12,5 г, сердечного отвара — 5,0 г, протеозопептона — 10,0 г, декстрозы — 2,0 г, натрия хлорида — 5,0 г, динатриевого фосфата — 2,5 г. Устанавливают рН 7,4, стерилизуют при 121° С 15 минут.

**Сердечно-мозговой агар.** Готовят на основе сердечно-мозгового бульона, добавляя 2% агара. Среды пригодны для культивирования *A. Israeli* и *A. bovis*.

**Czapek Dox-agar** (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют натрия нитрата — 2,0 г, калия хлорида — 0,5 г, железа сульфата — 0,35 г, калия сульфата — 0,35 г, сахарозы-30 г, агара — 12 г. Стерилизуют при 115° С 20 минут, рН 6,8. Данная синтетическая среда рекомендуется для культивирования актиномицетов.

**Мальтозный (глюкозный) агар Сабуро.** В 1000 мл дистиллированной воды растворяют мальтозы (или глюкозы) — 4 г, пептона — 1 г, агар-агара — 1,8 г. Среду фильтруют, разливают по колбам, пробиркам и стерилизуют при 110° С 15 минут. Для культивирования актиномицетов можно применять кровяной агар, среду Леффлера, тиогликолевые среды и среды, предназначенные для культивирования анаэробов, не содержащие специальных селективных добавок. Например, агар и бульон Шадлера (см. «Питательные среды для культивирования клостридий»). Во всех случаях надо учитывать, что *A. pyogenes* лучше растет на средах с кровью (сывороткой крови) и утилизируемыми углеводами, *A. hordeovulneris* — на средах с 15-20% фетальной сыворотки. Для изоляции ряда актиномицетов применяют питательные среды с селективными добавками.

**Среда Бейгтона и Колмана.** Состав питательной среды: сердечно-мозговой бульон — 3,7 г, дрожжевой экстракт (порошок) — 0,5 г, поливинилпироллидон — 1,0 г, цистеин солянокислый — 0,1 г, агар — 1,5 г, вода дистиллированная — 100 мл. Компоненты растворяют, стерилизуют при 115° С 30 минут, охлаждают до 45° С и вносят 5 мл стерильной сыворотки крови кролика. Затем к 100 мл готовой питательной среды добавляют 1 мл раствора NaF (25 мг/мл), 0,5 мл стерильного раствора колистина 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*.

**Контрольные вопросы.** 1. Правила взятия, оформления и отправки в лабораторию патматериала для исследования? 2. Как ставят диагноз на браздот? 3. Дифференциальная диагностика браздота. 4. Методы лабораторной диагностики браздота. 5. На чем основана лабораторная диагностика на браздот?

#### Список использованной литературы

1. Бакулов И.А., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. Особо опасные болезни животных. Покров.: ВНИИВВиМ, 1998.
2. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред. проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.
3. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.
4. Колычев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.
5. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родионова В.Б, Скородумов Д.И. М.: Колос, 2001.
6. Сидоров М.А, Скородумов Д.И, Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995.
7. Скородумов Д.И, В.В. Субботин, Сидоров М.А, Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: ИзографЪ, 2005.
8. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных. – Краснодар. - 2009, 575 с.

9. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Литвинова А.Р., Брилев Р.О., Злищева М.А. Совершенствование специфической профилактики крупного рогатого скота//Труды Кубанского государственного аграрного университета. Серия: Ветеринарные науки, 2009. – №1 (ч.1). - С. 127-129.

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,  
Г.А. Джаилиди, Зеркалев Д.Ю., Е.А. Горпинченко

Учебное пособие «Диагностика актиномикоза».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13