

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

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

ДИАГНОСТИКА ПАСТЕРЕЛЛЕЗА

Учебное пособие

г. Краснодар, 2013

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

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

ДИАГНОСТИКА ПАСТЕРЕЛЛЕЗА

Учебное пособие

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

КРАСНОДАР, 2013

УДК 619:98-07:579.843.95п(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 пастереллеза».

Краснодар: КубГАУ, 2013. 12 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителей пастереллеза; 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 пастереллеза

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

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

Пастереллез — болезнь многих сельскохозяйственных, диких животных и птиц. Возбудителями пастереллеза являются различные виды бактерий рода *Pasteurella*, семейства *Pasteurellaceae*. Патогенные свойства доказаны не у всех пастерелл, наибольшее значение в патологии животных имеют следующие виды.

P. multocida серовара В является первичным возбудителем геморрагической септицемии различных видов жвачных животных. *P. multocida* серовара D обуславливает, обычно как вторичный агент, пневмонии и атрофический ринит свиней. *P. multocida* серовара А у крупного рогатого скота участвует в развитии пневмонии телят, иногда — маститов коров, у овец этот серовар пастерелл является причиной пневмоний и маститов, у свиней — пневмоний (часто как первичный агент), у кроликов — плевропневмоний (заразного насморка), генитальных инфекций, у птицы — «холеры» (первичная инфекция). *P. multocida* серовара Е является этиологическим агентом эпизоотической геморрагической септицемии крупного рогатого скота и буйволов в Африке. У индеек изолирована *P. multocida* типа F, но ее этиологическая роль до сих пор не выяснена.

P. haemolytica биотипа А известна как первичный или вторичный агент пневмоний, участвует в развитии синдрома «транспортной лихорадки» крупного рогатого скота. *P. haemolytica* биотипа Т вызывает септицемию ягнят 5-12-месячного возраста. У свиней в кишечном тракте обитает *P. aerogenes*, которую иногда выделяют при абортах данного вида животных.

P. anatipestifer рассматривают как возбудитель фибринозного полисерозита у 1-8-недельных уток. У лошадей респираторную па-

тологию, 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 пастереллеза основана на результатах бактериологического и серологических исследований.

Бактериологическое исследование

Характер материала определяется наблюдаемым синдромом болезни. При септических явлениях объектом исследования являются части селезенки, печени, почек, сердце с перевязанными сосудами, лимфатические узлы, трубчатая кость. Трупы мелких животных направляют в лаборатории 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, трубчатую 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 пастереллы видны 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 клеток пастерелл, но следует иметь в виду, что ряд энтеробактерий, а также актинобациллы проявляют склонность к биполярной окраске. Для выявления биполярности рекомендуется окрашивать мазки водно-спиртовым раствором пиоктанина в течение 1 минуты с подогреванием до отхожде-

ния паров. Микроскопическая картина: фон светло-синий, Полюса клеток темно-синие, центр клетки не окрашен. Приготовление раствора пиоктанина: пиоктанина — 0,12 г, этанола (96° С) — 6 мл, дис-тилированной воды — 20 мл.

Выделение и идентификация культур пастерелл

Культивирование. Пастереллы — факультативные анаэробы, температурный оптимум 37° С (диапазон 25-40° С), птичьих 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 появление наряду с колониями S-формы шероховатых колоний R-формы.

P. haemolytica при росте на жидких питательных средах вызывает равномерное помутнение, обычно без формирования пристеночного кольца. На плотных средах через 24 часа культивирования формирует круглые, выпуклые, с ровными краями полупрозрачные

колонии. В результате культивирования на кровяном агаре с кровью крупного рогатого скота вокруг колоний образуется зона β -гемолиза, на агаре с кровью кролика, барана гемолитические свойства обнаруживаются только после снятия колонии с поверхности питательной среды.

Морфология клеток пастерелл в культуре. В мазках из культур клетки пастерелл обычно полиморфны, выглядят как мелкие грамтрицательные 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 1.

Таблица 1 - Дифференцирующие признаки родов семейства *Pasteurellaceae* и рода *Yersinia*

Признаки	Роды			
	<i>Actinobacillus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Yersinia</i>
Вязкость колонии	+	-	-	-
Подвижность при 22° С	-	-	-	P
Каталаза	P	P	+	+
Оксидаза	P	P	P	-
Фосфатаза	+	+ ¹⁾	+	-
Рост на агаре Мак-Конки	+	-	P	+
Тест метилрот (37°С)	-	P	-	+
Тест Фогес-Проскауера	P	н.д.	-	
Рост на среде с 0,5% NaCl	-	-	-	+
Ферментация с образованием кислоты:				
Глюкозы	+	+	+	+
Фруктозы	+	P	+	+
Ксилозы	+	P	P	P
Дульцита	-	-	- ²⁾	-

Инозита	-	- ³⁾	P	P
Инулина	-	- ⁴⁾	-	-
Гидролиз твина - 80	-	-	-	P
Г + Д в ДНК, моль%	40-43	38-44	40-45	46-50

- 1) Исключение — *H. haemoglobinophilus*; P — признак различен в
2) Исключение — *P. multocida* и *P. haemolytica*; таксонах рангов (виды рода,
3) Исключение — *H. agrophilus* и *H. parasuis*; роды семейства); нд — нет данных
4) Исключение — *H. parasuis*

Идентификация пастерелл на уровне вида

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

Таблица 2 - Основные дифференцирующие признаки видов рода *Pasteurella*

Вид пастерелл	Признаки									
	Гемолиз	Рост на агаре Мак-Конки	Индол	Уреаза	Орнитин декарбоксилаза	Кислота (24-48 ч.)				
						Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Маннит
<i>P. multocida</i>	-	-	+	-	(+)	+	(-)	+	(-)	(+)
<i>P. haemolytica</i>	+	(+)	-	-	(-)	+	(+)	+	+	+
<i>P. pneumotropica</i>	-	(-)	(+)	+	+	+	(+)	+	+	-
<i>P. canis</i>	-	-	+	-	+	+	н.	н.	-	-
<i>P. dagmatis</i>	-	-	+	+	-	+*	-	-	+	-
<i>P. caballi</i>	-	-	-	-	+/-	+*	+	н.	(+)	+
<i>P. aerogenes</i>	-	+	-	+	(+)	+*	(-)	+	+	-
<i>P. gallinamm</i>	-	(-)	-	-	+/-	+	-	+	+	-

(+) — преимущественно положительный результат; (-) — преимущественно негативный результат; +* — газ и кислота из глюкозы; нд — нет данных; ¹⁾ - *P. avium* требует для роста на питательных средах НАД.

После установления видовой принадлежности пастерелл, если выделены культуры *P. multocida* и *P. haemolytica*, можно установить подвид *P. multocida* или биовар *P. haemolytica*, что позволяет, используя эти признаки в качестве маркера возбудителя, более детально проводить анализ эпизоотической ситуации.

Идентификация серовариантов *P. multocida*

Определение сероваров возбудителя является обоснованием для использования вакцин, включающих конкретный серовар *P. multocida*. Серотипирование основано на антигенных различиях капсульного вещества (полисахарид), в соответствии с чем *P. multocida* подразделяют в РНГА на 5 сероваров (А, В, D, Е и F). По особенностям соматического антигена *P. multocida* также дифференцируют на серовары, которые обозначают цифрами.

В практических условиях дифференциация сероваров возбудителя в РНГА, из-за отсутствия коммерческих реагентов, пока недоступна, и поэтому прибегают к не серологическим методам, основанным на иных особенностях клеток пастерелл.

Поскольку серовар Е встречается в Африке, а серовар F выделен у индеек, то реально речь идет об установлении сероваров А, В и D. С этой исследуемую культуру пастерелл засевают на агар Хоттингера в шинках Петри с таким расчетом, чтобы был получен достаточно густой слой 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 3 - 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>septica</i>	+	+	-	-	-
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	-	+	V	+	+

V — варьирующий признак.

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

Колонии *P. multocida* серовара А, из-за расщепления гиалуронидазой стафилококка гиалуроновой кислоты в капсуле пастерелл, в отличие от колоний от сероваров В и D, тусклые, имеют серый или голубой цвет и не флуоресцируют.

Если испытуемая культура не относится к серовару А, то ее исследуют в трипафлавиновой пробе, которая, в принципе, предназначена для выявления у бактерий признаков диссоциации. Испытуемую культуру выращивают 24 часа при 37° С в 3-5 мл бульона Хоттингера, центрифугируют, осадок удаляют, седимент ресуспендируют в оставшейся жидкости и добавляют в пробирку 0,5 мл свежеприготовленного раствора трипафлавина (акрифлавин) 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 4 - Критерии дифференциации биоваров *P. haemolytica*

Признаки	Биовары	
	А	Г
Образование кислоты из: Арабинозы	+	-
Ксилозы	+	-
Трегалозы	-	+
Салицина	-	+
Чувствительность к пенициллину	Высокая	Слабая
сероварианты	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12	3, 4, 10
Локализация в организме естественных хозяев	Носоглотка	Миндалины
Ассоциация с патологией	Пневмонии крупного рогатого скота и овец, септицемия новорожденных ягнят	Септицемия новорожденных ягнят

Биопроба

Проводят с целью выделения культуры возбудителя из исследуемого материала и определения патогенности выделенной культуры возбудителя. С целью выделения пастерелл из исследуемого

материала готовят суспензию (1:10) и вводят подкожно в объеме 0,2 мл белым мышам. Приданном способе заражения удается определить наличие вирулентных штаммов *P. multocida*. За животными наблюдают в течение недели. Для проверки патогенных свойств выделенных культур *P. multocida* суточной 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 D — в пределах семи суток. Патогенность культур, выделенных от птицы проверяют на мышях или цыплятах. В последнем случае используют 90-120-дневных цыплят, которым культуру в дозе 0,1 мл вводят внутримышечно. Культуры *P. haemolytica* вызывают гибель белых мышей только при внутрибрюшинном заражении. Апробирована ПЦР для детекции *P. multocida* в материале.

Питательные среды

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

Модифицированная элективная питательная среда Моррис. К кровяному агару с 5% крови овцы или крупного рогатого скота добавляют селективные компоненты в одной из следующих комбинаций: а) неоминим 0,0025, теллурид калия — 0,0025, тиротрицин — 0,01, актидион — 0,1; б) неомицин — 0,0015, новобиоцин — 0,002, актидион — 0,1 (г/л).

Контрольные вопросы:

1. Как и какой патматериал отбирают для лабораторных исследований на пастереллез?
2. Возбудители пастереллеза животных?
3. Как проводится диагностика пастереллеза у животных?
4. Методы лабораторной диагностики пастереллеза животных?
5. Питательные среды для выращивания возбудителей пастереллеза животных?

Список использованной литературы

1. Антонов Б.И, Борисова В.В, Волкова П.М. и др. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986.
2. Бакулов И.А., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. Особо опасные болезни животных. Покров.: ВНИИВВиМ, 1998.
3. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред. проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.
4. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.
5. Колычев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.
6. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родионова В.Б, Скородумов Д.И. М.: Колос, 2001.
7. Сидоров М.А, Скородумов Д.И, Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995.
8. Скородумов Д.И, В.В. Субботин, Сидоров М.А, Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: ИзографЪ, 2005.
9. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных. – Краснодар. - 2009, 575 с.
10. 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 пастереллеза».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13