

**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 ветеринарная лаборатория»**

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

ДИАГНОСТИКА ГЕМОФИЛЕЗОВ ЖИВОТНЫХ

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 ветеринарная лаборатория»**

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

ДИАГНОСТИКА ГЕМОФИЛЕЗОВ ЖИВОТНЫХ

Учебное пособие

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

КРАСНОДАР, 2013

УДК 619:616.98:578.843.94(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, А.В. Скориков
Учебное пособие «Диагностика гемофилезов животных».
Краснодар: КубГАУ, 2013. 20 с.

В учебном пособии изложены патматериал, отбираемый для лабораторных исследований, основные свойства возбудителей гемофилезов животных; 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 гемофилезов животных

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

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

Диагностика гемофилезного полисерозита

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) — инфекционная болезнь поросят, проявляющаяся генерализованным серозно-фибринозным воспалением серозных оболочек (плевра, перикард, брюшина), менингитами, артритами. У свиней более старшего возраста вызывает артриты и пневмонии или выступает как вторичный агент при энзоотической (микоплазмозной) 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.

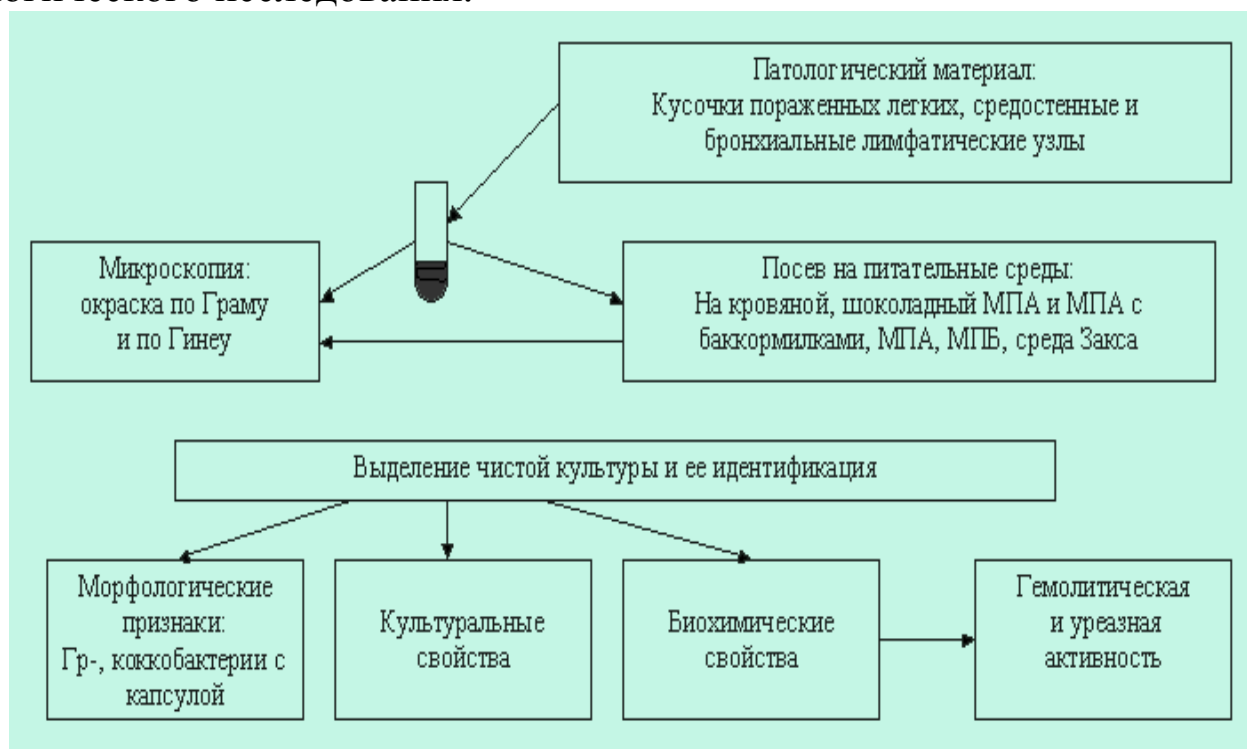


Схема лабораторной диагностики

Бактериологическое исследование

Стерильно 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 и здоровой ткани. Материал транспортируют в термосе со льдом.

Микроскопическое исследование исходного материала

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

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *H. parasuis* — факультативный аэроб, температурный оптимум 37-38°C, рН 7,2-7,4. На обычных средах возбудитель не растет, требует добавления в среду готового фактора роста — V-фактор (NAD-никотинамидаденин-динуклеотид или NAD-фосфат NADP). В качестве источника V-фактора используют дрожжевой экстракт, энзиматически чистой 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» сателлитных мелких колоний *H. parasuis*. Стерильные дрожжевой экстракт и чистый NAD добавляют в МПА, МПБ, 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 «бактерией-кормилкой». При исследовании контаминированного материала применяют среды Contronі.

Кровяной агар слегка подсушивают. Исследуемый материал засевают шпателем (бактериологической петлей) по всей поверхности среды. Затем по диаметру чашки в виде двух прямых линий под углом 90° засевают бактериологической петлей культуру негемо-

литического штамма стафилококка или *E. coli* («бактерия-кормилка»).

На плотные и жидкие питательные среды, содержащие готовые ростовые факторы (NAD, дрожжевой экстракт, гретую кровь), материал засевают обычным способом. Посевы культивируют при 37-38°C в течение 24 - 48 часов в аэробных условиях.

Характер роста *H. parasuis* на питательных средах. На кровяном МПА возбудитель растет в виде мельчайших не гемолитических колоний на расстоянии не более 1,0-3 см от штриха «бактерии-кормилки» (зона диффузии V-фактора). Вблизи «кормилки» колонии возбудителя крупнее, по мере удаления — мельче, так как снижается концентрация ростового фактора. Такой рост *H. parasuis* на кровяном агаре называют «сателлитным».

На прозрачном сывороточном МПА с «бактерией-кормилкой» колонии прозрачные, круглые, выпуклые, с ровными краями, слизистой консистенции, флуоресцирующие в косопадающем 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 косопадающем свете. В процессе пассажирования возбудителя на питательных средах в результате диссоциации колонии могут терять свойство флуоресценции.

В жидких питательных средах (бульон Левинталя, сывороточно-дрожжевой бульон) *H. parasuis* растет с легким равномерным помутнением среды, через 48-72 часа среда просветляется, на дне пробирки формируется слизистый осадок.

Морфология клеток возбудителя в культуре. Из выросших культур готовят и микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, на капсулы — по 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 *N.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 средах с 0,5% NaCl, агаре Мак-Конки, образовывать каталазу, оксидазу, фосфатазу, ферментировать глюкозу, дульцит, гидролизовать твин-80. На практике идентификацию возбудителя, исходя из патологоанатомических данных, сразу ведут на видовом уровне, придавая первостепенное значение определению NAD-зависимости.

Идентификация *N.parasuis* на видовом уровне. При видовой идентификации, исходя из происхождения исследуемого материала (свинья), *N. parasuis* приходится дифференцировать от NAD-зависимых культур *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Биопроба. Для определения патогенных свойств выделенной культуры используют внутрибрюшинный способ заражения морских свинок. Исследуемую культуру выращивают 24 часа на «шоколадном агаре», смывают стерильным физиологическим раствором, устанавливают концентрацию бактерий по оптическому стандарту мутности на уровне 20 ед. Взвесь в дозе 1 мл вводят трем морским свинкам внутрибрюшинно. Гибель в течение 5 суток хотя бы части животных, выявление у погибших морских свинок поражения серозных оболочек и выделение в результате бактериологического исследования исходной культуры позволяют рассматривать ее как вирулентную.

Таблица 1 - Критерии дифференциации *N. parasuis* и *A. pleuropneumoniae*

Признаки	<i>N. parasuis</i>	<i>A. pleuropneumoniae</i>
Морфология клетки	Преимущественно палочковидные	Преимущественно коккобактерии
Уреаза	-	+
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.

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 материала *H.paragailinarum* имеет форму небольших, нередко коккоподобных грамотрицательных палочек, окруженных капсулой.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37-38°C, рН 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 (кровь овцы, 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 штриха 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. paragallinarum* имеют форму коккобактерии, полиморфных палочек, нитей, грамтрицательные, жгутиков нет. При окраске по методу Гинса или другими методами обнаруживается капсула.

Идентификация *H. paragallinarum* на уровне рода и вида. Для отнесения выделенной культуры к роду *Haemophilus* используют те же критерии, что и для *H. parasuis*. Основную сложность в процессе идентификации представляет дифференциация *H. paragallinarum* и *Pasteurella avium* (прежнее наименование *Haemophilus avium*). *P. avium* по морфологическим, тинкториальным, культуральным признакам сходна с *H. paragallinarum* и также зависит от V-фактора.

С целью дифференциации двух указанных видов бактерий у выделенных культур исследуют зависимость роста от наличия сыворотки крови, образование пигмента, способность синтезировать каталазу, фосфатазу, расщеплять трегалозу, галактозу, мальтозу, маннит, сорбит, сахарозу, патогенность для кур (см. табл. 2).

Таблица 2 - Дифференциальные признаки *H. paragallinarum* и *P. avium*

Признаки	<i>H. paragallinarum</i>	<i>P. avium</i>
Потребность в NAD	+	D
Каталаза	-	+ ¹⁾
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 высевам «бак-кормилки» 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 желточном мешке 6-7-дневных развивающихся куриных эмбрионов или на оптимальной плотной питательной среде. Био-

пробу проводят на 2-3 клинически здоровых врах восприимчивого возраста. Содержимое желточного 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 же как и при лабораторной диагностике актинобациллезной пневмонии свиней.

Диагностика актинобациллезной пневмонии свиней

Актинобациллезная пневмония свиней - инфекционная болезнь свиней преимущественно 2-3х-месячного возраста и откормочных животных, характеризуется развитием фибринозногеморрагической некротизирующей 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 плевру. Материал транспортируют в термосе со льдом или в замороженном виде.

Микроскопическое исследование исходного материала

Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из методов для выявления капсул. В положительных случаях в препарате обнаруживают короткие, вплоть до кокковидных, грамотрицательные палочки с закругленными концами, чаще располагающиеся парно, единично, реже — в виде коротких цепочек, обладают капсулой. Типичные по морфологии коккобактерии имеют средние размеры 0,3-0,4 x 0,4-0,5 мкм.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *A. pleuropneumoniae* — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37-38°C, 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 (кровь барана) или сывороточный питательный агар (МПА, агар Хоттингера, и т.д.) в чашках Петри с размещением дисков, пропитанных ДПН, либо с последующим крестообразным посевом в виде линии по диаметру чашки Петри культуры «бактерии-кормилки». Можно высевать материал на агар Левинталя, «шоколадный» и сывороточно-дрожжевой МПА и МПБ с 5% сыворотки крови крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта. Контаминированный 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 сателлитных колоний вблизи источника ДПН. В непосредственной близости от ростового фактора изолированные колонии имеют диаметр 0,25-0,35 мм, по мере удаления размер колоний уменьшается до 0,1-0,15 мм вплоть до неразличимых невооруженным глазом. Радиус зоны сателлитного роста обычно не шире 1,5-3 см. Колонии на кровяном агаре окружены четкой зоной β-гемолиза. На сывороточно-дрожжевом МПА, агаре Левинталя, «шоколадном» агаре через 24-48 часов инкубирования культуры первого биовара формируют по всей поверхности среды колонии правильной круглой формы, с ровными краями, слабовыпуклые, серо-белые, прозрачные, диаметром до 1,5-2 мм. Колонии тенденции к слиянию не проявляют. Консистенция бактериальной массы пастообразная, чаще слизистая. В последнем случае бактериальная

Масса с трудом снимается шпателем с поверхности плотной питательной среды и плохо суспендируется в 0,85%-ном растворе натрия хлорида. Нередко возбудитель образует колонии «резиноподобной» консистенции. Молодые культуры *A. pleuropneumoniae* в косопадающем 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 Левинталя, сывороточно-дрожжевой МПБ) недиссоциированные культуры растут со слабым равномерным помутнением среды, без образования пристеночного кольца и поверхностной пленки, через 72 часа на дне пробирки формируется слизистый осадок (Скородумов Д.И., 1997).

Культуры *A. pleuropneumoniae* 2-го биовара не требуют для своего роста ДПН, поэтому растут на обычном кровяном и сывороточном МПА, МПБ, то есть не дают феномена сателлитного роста. Колонии по своим характеристикам аналогичны колониям культур 1-го биовара, но более крупные, а рост на жидких питательных средах несколько интенсивнее.

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

Идентификация *A. pleuropneumoniae* на уровне рода. Дифференциация представителей родов семейства *Pasteurellaceae* представляет определенные трудности в случае использования общепринятых фенотипических признаков. К роду *Actinobacillus* относят культуры грамотрицательных палочковидных бактерий, проявляющих тенденцию к образованию вязких колоний, клетки которых не имеют жгутиков, обладающие способностью к росту на агаре

Мак-Конки, ферментирующие с образованием кислоты глюкозу, фруктозу, ксилозу, образующие фосфатазу, дающие варьирующие результаты в тестах на каталазу, оксидазу, Фогес-Проскауэра, отрицательный результат в пробе с метиловым красным, негидролизующие твин-80, не ферментирующие дульцит, инозит, инулин. При идентификации *A. pleuropneumoniae* важнейшим признаком является обнаружение NAD-зависимости, поэтому перечисленные признаки более существенны при идентификации культур NAD-независимого биовара.

Идентификация *A. pleuropneumoniae* на видовом уровне. На первом этапе посевом испытуемой культуры на кровяной или сывороточный питательный агар с экзогенным источником NAD («бактерия-кормилка», диски, пропитанные NAD) определяют ее NAD-зависимость. Культуры, показавшие зависимость от ростового фактора, имеющие характерные для *A. pleuropneumoniae* культуральные, морфологические и тинкториальные признаки, отбирают для дальнейшего изучения. Практически, с учетом происхождения материала, их приходится дифференцировать от единственного NAD-зависимого вида бактерий, который можно выделить при пневмониях свиней — *H. parasuis*. Основные отличительные признаки *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 кислоты D-маннит; *H. parasuis* не образует уреазу, *A. pleuropneumoniae* всегда продуцирует этот фермент; *H. parasuis* растет на «шоколадном», сывороточно-дрожжевом агаре, агаре Левинталя более скудно, чем *A. pleuropneumoniae*, колонии образует более мелкие, клетки преимущественно палочковидные, а не в виде коккобактерий в отличие от *A. pleuropneumoniae*. В случае выделения культур бактерий, не зависимых от NAD, но сходных с *A. pleuropneumoniae* (что позволяет предполагать возможную их принадлежность ко второму биовару *A. pleuropneumoniae*), возникает необходимость дифференциации от более широкого круга бактерий.

Сходные признаки с *A. pleuropneumoniae*, включая гемолитическую и уреазную активность, имеет *B. bronchiseptica*. Для их дифференциации у культур определяют способность к утилизации цитратов в качестве единственного источника углерода (посев на среду Кристенсен), а также 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 3, а также по антигенной структуре и патогенности.

Серологическая идентификация культур возбудителя. Вид *A. pleuropneumoniae* антигенно гетерогенен, представлен двенадцатью сероварами с подразделением некоторых из них на подтипы.

Таблица 3 - Дифференцирующие признаки некоторых видов актинобацилл

Признаки	Вид бактерий			
	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. ligniereisi</i>	<i>A. equili</i>
Способность к росту на агаре Мак-Конки	-	+	+	+
Образование H ₂ S	+	-	+	V ²⁾
Гидролиз эскулина	V	+	-	-
β-гемолиз	+ ¹⁾	+	-	-
Образование кислоты из: маннита	+	-	+	+
Мслибиозы	-	+	-	+
млицина	-	+	-	-
трегалозы	-	+	-	+

¹⁾— регистрируется не у всех штаммов; ²⁾— варьирующий признак.

Антигенная обособленность сероваров выражена у недиссоциированных культур достаточно четко, хотя имеется тесное антигенное родство у Некоторых сероваров. В РФ диагностические иммунные сыворотки против *A. pleuropneumoniae* как коммерческие препараты не выпускают. При наличии антисывороток серовариантную идентификацию штаммов *A. pleuropneumoniae* проводят в РА на стекле, в реакции коаггутинации, непрямой иммунофлуоресценции, РДП.

Биопроба. Проводят с целью определения патогенных свойств изолированной культуры бактерий. Наиболее подходящей лабораторной моделью являются морские свинки живой массой 250-300 г. Заражение проводят интрана-зально под легким эфирным наркозом 18-24-часовой агаровой культурой в дозе $0,5-1,0 \times 10^9$ м.к. Вирулентные штаммы возбудителя вызывают гибель животных в течение 1-4 суток после заражения при симптомах поражения легких. На вскрытии у павших животных обнаруживают геморрагическую пневмонию, при достаточно длительном переболевании — фибринозный плеврит. Белые мыши несколько устойчивее к *A. pleuropneumoniae*.

Серологическая диагностика

Естественное переболевание свиней актинобациллезной пневмонией приводит к образованию типоспецифических антител. Обычно серологические реакции (РСК, РА с 2-меркаптоэтанолом, иммуноферментный метод) оценивают как методы групповой диагностики, которые могут найти применение при комплектовании благополучных стад. Как метод индивидуальной диагностики РСК применим только к мелким хозяйствам, где число реагирующих невелико. Большинство авторов считают, что титр РСК 1:10 как диагностический. В РФ диагностические антигены 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 дефибрированной или нитрированной крови лошади, барана или кролика. После охлаждения питательной среды до 55-60°C ее перемешивают и разливают по чашкам Петри или пробиркам.

Агар Левинталя. Содержит V- и X-ростовые факторы. К расплавленной и затем охлажденной до 60° С агаровой среде добавля-

ют, встряхивая, 10% (объем/объем) дефибрированной 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 Левинталя. Готовят так же, как и агар Левинталя, но на основе жидкой питательной среды.

Сывороточно-дрожжевой агар. Содержит V-фактор. К расплавленному и остуженному до 45° С МПА Или агару Хоттингера добавляют 5-10% сыворотки крови лошади, крупного рогатого скота, овцы или кролика и такое же количество дрожжевого экстракта.

Приготовление дрожжевого экстракта. Пекарские прессованные дрожжи (250 г) суспендируют до образования гомогенной взвеси в 1000 мл дистиллированной воды, кипятят на огне в течение 4-5 минут. Микробную массу осаждают центрифугированием, надосадочную жидкость пропускают через стерилизующие пластины фильтра Зейтца. Стерильный дрожжевой экстракт хранят при 4-5° С и используют в течение 8-10 суток.

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-ростовых факторов. В основную питательную среду (плотную, жидкую) вносят раствор NAD или протогема (X-фактор) или эти оба фактора, в зависимости от ростовых потребностей микроорганизма. При этом необходимо учитывать, что NAD термолабилен, его необходимо стерилизовать фильтрацией и добавлять в охлажденную до 45°С среду.

Приготовление раствора NAD. Один грамм препарата растворяют в 100 мл дистиллированной воды, стерилизуют фильтрацией, добавляют в базовую питательную среду до конечной концентрации 1 мг/мл.

Приготовление раствора протогема. Вещество в количестве 0,1 г растворяют в 100 мл 1%-ного раствора Na_2CO_3 , стерилизуют автоклавируванием. Растворы выдерживают длительное хранение при 4-6° С.

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

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

Контрольные вопросы:

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

Список использованной литературы

1. Акатов А.К., Зуева В.К. Стафилококки. М.: «Медицина», 1983.
2. Антонов Б.И, Борисова В.В, Волкова П.М. и др. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986.
3. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва. Владимир: «Посад», 2001.

4. Бакулов И.А., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. Особо опасные болезни животных. Покров.: ВНИИВВиМ, 1998.
5. Белоусов В.И., Каврук Л.С, Малахов Ю.А. и др. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. М., 2000.
6. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонозы. М.: «Медицина», 1990.
7. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред. проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.
8. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.
9. Колычев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.
10. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родионова В.Б, Скородумов Д.И. М.: Колос, 2001.
12. Сидоров М.А, Скородумов Д.И, Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995.
13. Скородумов Д.И, В.В. Субботин, Сидоров М.А, Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: ИзографЪ, 2005.
14. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных. – Краснодар. - 2009, 575 с.

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Зеркалев Д.Ю., Е.А. Горпинченко, А.В. Скориков
Учебное пособие «Диагностика гемофилезов животных»

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

