

**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. БАЖЕНОВА,  
А.В. СКОРИКОВ, Е.В. ЯКУБЕНКО**

**ДИАГНОСТИКА ПСЕВДОМОНОЗА  
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 краевая ветеринарная лаборатория»**

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

**ДИАГНОСТИКА ПСЕВДОМОНОЗА  
ЖИВОТНЫХ**

**Учебное пособие**

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

**КРАСНОДАР, 2013**

УДК 619:616.98-07:579.841.11(075)

ББК 48.73

Д 44

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

Учебное пособие «Диагностика псевдомоноза животных».

Краснодар: КубГАУ, 2013. 12 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителей псевдомоноза; 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 псевдомоноза

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

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

*P. aeruginosa* относится к категории условно патогенных бактерий, часто обнаруживается на слизистых оболочках животных, на фоне снижения резистентности макроорганизма может вызывать септицемию, бронхопневмонию, абсцессы, маститы, аборт, поражения мочевого тракта, постхирургические осложнения. *P. aeruginosa* является возбудителем псевдомоноза норок, нутрий, кроликов. *Pseudomonas aeruginosa* является аэробной, грамотрицательной бактерией, относящейся к семейству *Pseudomonadaceae*, роду *Pseudomonas*, который объединяет более двадцати видов.

**Лабораторная диагностика** основана на результатах бактериологического и серологического исследований

### **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, располагающихся одиночно, парами, в виде коротких цепочек. Ви-

рулентные 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 селективную среду, 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 неровными, волнистыми распространяющимися плоскими краями, полупрозрачные, с гладкой поверхностью и приподнятым центром колонии, часто отливающие металлическим блеском, кроме того, могут быть мелкие, шероховатые колонии, напоминающие маргаритки. Штаммы, выделенные из респираторного и мочеполового тракта, могут образовывать слизистые или мукоидные колонии. На кровяном агаре колонии часто окружены зоной β-гемолиза. Культуры *P. aeruginosa* имеют фруктовый запах, прозрачные среды в процессе роста окрашивают в зеленоватый или зеленовато-желтый 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 синезеленый 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 синееет. Окра-

шенный хлороформ переносят пипеткой в пробирку и вносят 1-2 капли IN HC1, после чего пиоцианин розовеет (кислая среда). Пиоцианин наиболее часто образуют вирулентные штаммы *P.aeruginosa*. Пигмент флуоресцеин (пиовердин) — зеленый пигмент, растворим в воде, но не хлороформе, флуоресцирует при освещении культуры, выращенной на среде «В» в темноте, ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 254 нм, его вырабатывают большинство штаммов. Синтез пиовердина стимулирует среда «В», а также культивирование при 25° С. Цвет пигмента пиорубина 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 свойств культуры. Спектр пигментов, образуемых *P.aeruginosa* и другими псевдомонадами, представлен в таблице 79. Определение наличия пигмента и его типа — важный этап в идентификации *P. aeruginosa*.

В МПБ рост *P.aeruginosa* проявляется образованием поверхностной серебристо-белой пленки, что считается характерным признаком. Позднее среда мутнеет (вначале в верхней части столбика среды, далее — в нижней), формируется серовато-белый осадок. За счет пигмента среда приобретает сине-зеленый цвет, который позднее становится бурым.

**Морфология клеток *P. aeruginosa* в культуре.** Морфология клеток в культуре идентична таковой в препаратах из патологического материала. Клетки подвижные, имеют один, иногда два полярных жгутика, способность к слизиобразованию в процессе пассивирования на питательных средах быстро утрачивают, спор не образуют. Подвижность исследуют микроскопически у бульонных культур, выращенных при 18-20° С.

**Идентификация *P.aeruginosa* с учетом температурного диапазона роста, пигментообразования и ферментативных признаков**

При обнаружении в материале культур, способных расти на цетримидном агаре, образующих колонии с признаками, характерными для *P. aeruginosa*, проводят микроскопическое исследование мазков, окрашенных по Граму. Исследуют способность к слизиобразованию, пигментообразованию и тип пигмента.

**Таблица 1 - Пигментообразование у *P.aeruginosa* и некоторых других псевдомонад**

Вид бактерий	Тип пигмента		
	Диффундирующие флуоресцирующие	Диффундирующие нефлуоресцирующие	Недиффундирующие нефлуоресцирующие
<i>P.aeruginosa</i>	+	+ сине-зеленый	-
<i>P.alcaligenes</i>	-	-	d желто-оранжевый
<i>P.caryophylli</i>	-	+ желто-зеленый	-
<i>P.ceracia</i>	-	+ различные	-
<i>P.chlorarphis</i>	+	-	+ зеленый или оранжевый
<i>P.cichorii</i>	+	-	
<i>P.delafieldii</i>	-	-	
<i>P.diminuta</i>	-	-	
<i>P.facilis</i>	-	-	
<i>P.fluorescens</i> биотип I	+		
биотип II	+	-	
биотип III	+	-	
биотип IV	+	-	
биотип V	+	-	+ синий
<i>P.gladioli</i>	-	+ желто-зеленый	-
<i>P.mendocina</i>	-	-	+ желто-оранжевый
<i>P.pickettii</i>	-	-	
<i>P.pseudoalcaligenes</i>	-	-	-
<i>P.putida</i> биотип A	+	-	-
биотип B	+	-	
<i>P.saccharophila</i>	-	-	-
<i>P.solancearum</i>	-	d коричневый	-
<i>P.stutzeri</i>	-	-	
<i>P.sviringae</i>	+	-	
<i>P.vesicularis</i>	-	-	+ желто-оранжевый
<i>P.viridiflava</i>	+	d сине-зеленый	

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

Для дальнейшего исследования отбирают колонии оксидазо- и каталазопозитивных бактерий. Исследуют у выделенных культур подвижность, способность к восстановлению нитратов, образова-

нию газа из нитрата, пептонизации молока, гидролизу желатины, утилизации цитратов, синтезу пигментов (см. выше), аргининдигидролазы, способность к росту при 25° С, 35° С, 42° С, в МПБ без NaCl, образованию кислоты из D-глюкозы, D-ксилозы, D-маннита. Для *P.aeruginosa* характерны свойства, отраженные в таблице 1. 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 2. Строение O-антигенов возбудителя внутри этих групп отражено в таблице 3.

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 псевдо-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, инактивированных кипячением в водяной бане в течение 1,5 часов. Культуру (антиген) первоначально исследуют с поливалентными сыворотками (№ 1 — 03, 04, 05, 06, 07; № 2 — 02, 08, 09; № 3 — 010, 011, 012) и при получении положительного результата — с моновалентными, входящими в состав той или иной поливалентной сыворотки. РА проводят в капельном варианте на стекле, результат учитывают через 3-6 минут.

**Питательные среды. Цетримидный агар.** Цетримид (цетилметиламмония бромид) — 0,3 г; пептон — 20,0 г; магний хлори-



стый — 1,4 г; калий сернокислый — 10,0 г; глицерин — 10,0 г; агар — 13,0 г; вода дистиллированная — до 1000,0 мл; рН среды — 7,2.

**Таблица 2 - Свойства *P. aeruginosa***

Признаки	% положительных реакций
Образование кислоты из: D-глюкозы	97
D-ксилозы	90
D-маннита	70
Лактозы	<1
Сахарозы	0
Мальтозы	<1
Каталаза	100
Оксидаза	99
Рост на среде: Мак-Конки	100
SS-агаре	96
Цстримид-агаре	94
Утилизация цитрата	95
Уреаза на среде Кристенсен	48
Восстановление нитратов	98
Газ из нитрата	93
Индол	0
Скошенный агар TSI, кислота	0
Столбик TSI, кислота	0
H <sub>2</sub> S (столбик TSI)	0
H <sub>2</sub> S (бумага с ацетатом РЬ)	4
Желатиназа	82
Лакмусовое молоко	89 (пептонизация)
Пигмент: Пиовердин	65
Пиоцианин	46
Пиорубин	25
Другие	23 (пиомеланин)
Рост при 25° С	100
35° С	100
42° С	100
Гидролиз эскулина	0
Лизиндекарбоксилаза	0
Аргининдигидролаза	100
Орнитиндекарбоксилаза	0
МПБ, 0% NaCl	100

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

**Таблица 3 - Соответствие схем обозначения O-антигенов  
*P.aeruginosa* (Беляков В.Д. и соавт., 1990)**

Международная	Habs	Homma	Lanyi	Verder-Evans	Fiseher	Meitert
1	1	10	6	4	4	13
2	2	2	3	-	3,7	2
3	3	1	1	6	-	5
4	4	6	11	-	-	8
5	5	7	3	1	7	6
6	6	8	4	2	1	1,4
7	7	3	5	8	6	3
8	8	3	5	8	6	3
9	9	4	10	9	-	14
10	10	9	2	-	5	11
11	11	5	7	3	2	15
12	12	14	13	7	-	7
13	-	12	-	-	-	-
14	-	12	-	5	-	-
15	-	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. Бакто-пептон (Difko) — 20 г; глицерол — 10; хлористый магний — 1,4 г; сернокислый калий — 10 г; агар — 15 г; дистиллированная вода — 1000 мл, рН доводят до 7,2, автоклавируют в пробирках при 121°C 15 минут.

**Среда В («Flo»)** для выявления пигментообразования. Протеозо-пептон № 3 (Difko) — 20 г; глицерол — 10 мл; фосфорнокислый калий двухзамещенный безводный — 1,5 г; MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O —

1,5 г; дистиллированная вода — до 1000 мл. Стерилизуют в пробирках при 121°C 15 минут.

**Таблица 4 - 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	Па	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; хлористый натрий — 5 г; Васто-агар — 15 г; дистиллированная вода — до 1000 мл.

**Контрольные вопросы:**

1. Правила взятия и отправки патматериала для лабораторных исследований на псевдомоноз?
2. Возбудители псевдомоноза животных?
3. Как проводится диагностика псевдомоноза у животных?
4. Методы лабораторной диагностики псевдомоноза у животных?
5. Питательные среды для выращивания возбудителя псевдомоноза животных?

### Список использованной литературы

1. 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. 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. Баженова Е.А., Шевченко Л.В., Бадеева Ш.М. Профилактика псевдомоноза//Студенчество и наука, 2011. - №1.
10. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Баженова Е.А., Брилев Р.О. Совершенствование специфической профилактики и лечение псевдомоноза нутрий//Труды Кубанского государственного аграрного

университета. Серия: Ветеринарные науки, 2009. – №1 (ч.1). - С. 125-127.

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

Учебное пособие «Диагностика псевдомоноза».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13