

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ

ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет им. А.А.
Ежевского»

ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория»
ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия
последипломного образования»
Служба ветеринария Иркутской области

**Бактериозы крупного рогатого скота.
Лабораторная диагностика**

Учебно-методическое пособие

Иркутск, 2018

УДК 619:616.9:519.23(072)

П 764

Рекомендованы к изданию методической комиссией факультета биотехнологии и ветеринарной медицины
(протокол № 9 от 15 мая 2018 г.)

Рекомендованы к изданию Научно-методическим советом Иркутского ГАУ
(протокол № 9 от 28 мая 2018 г.)

Составители:

Батомункуев А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры специальных ветеринарных дисциплин

Анганова Е.В., доктор биологических наук, профессор кафедры эпидемиологии и микробиологии ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»;

Аблов А.М., кандидат ветеринарных наук, заместитель директора ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория».

Батомункуев А.С. Бактериозы крупного рогатого скота. Лабораторная диагностика [Текст]: уч.-метод. пос. / А.С. Батомункуев, Е.В. Анганова, А.М. Аблов.– Иркутск: Изд-во ИрГАУ, 2018.– 121 с.

Рецензент:

Чхенкели В.А., доктор биологических наук, профессор кафедры анатомии, физиологии и микробиологии ФГБОУ ВПО Иркутской ГСХА

Цыдыпов В.Ц., доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ВСЭ, микробиологии и патоморфологии ФГБОУ ВО «Бурятская государственная сельскохозяйственная академия им В.Р. Филиппова»

В учебно-методическом пособии изложены этиологические факторы, краткие эпизоотологические данные, основные клинические признаки и патологоанатомические изменения при сибирской язве, туберкулеза, бруцеллеза, лептоспироза, листериоза, сальмонеллеза, эмфизематозного карбункула, пастереллеза. Приведены краткие сведения о болезнях у человека. Подробно описана лабораторная диагностика инфекционных болезней.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальности 36.05.01 Ветеринария и направлению подготовки 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза

© ФГБОУ ВО Иркутский ГАУ, 2018

© ФГБУ «Иркутская МВЛ», 2018

© ГБОУ ДПО «Иркутская ГМАПО», 2018

© Служба ветеринарии Иркутской области, 2018

ВВЕДЕНИЕ

Среди инфекционных болезней животных и птиц важнейшее значение имеют бактериозы – обширная группа болезней, обусловленных бактериями различной таксономической принадлежности. Так, в инфекционной патологии животных существенное место занимают бруцеллез, лептоспироз, листериоз, туберкулез, сальмонеллез, некробактериоз, колибактериоз и другие нозоформы, представляющие угрозу населению и имеющие большое социальное значение. Лептоспирозы в РФ относятся к числу широко распространенных природно-очаговых инфекций человека, что обусловлено наличием в сельской местности и в городах природных и хозяйственных очагов. За последние годы эпизоотическая ситуация по бруцеллезу и лептоспирозу в ряде регионов усложнилась: ежегодно регистрируется до 70-80 неблагополучных пунктов.

Одной из наиболее сложных проблем инфекционной патологии является туберкулез, экономический ущерб от которого в РФ за последние 40 лет составил около 84,9 млрд. руб. Ежегодно в стране регистрируют сотни неблагополучных пунктов по туберкулезу на более чем 40 территориях, где болеет до 20-30 тыс. голов скота.

Для животноводства более 80 стран мира, в т.ч. и России, актуальным является и листериоз, характеризующийся значительной летальностью и тяжестью клинического течения. Опасность для животных также представляет некробактериоз, распространенный в различных регионах РФ, в частности, на территории Сибирского региона, Республики Татарстан, Европейской части страны. Существенный экономический ущерб животноводству наносит сальмонеллез. Во всех регионах РФ регистрируется колибактериоз животных и птиц. Актуальными инфекциями остаются пастереллез домашних и диких животных, птиц и человека и псевдомоноз сельскохозяйственных животных и птиц. На ряде территорий РФ установлена эмерджентная эволюция инфекционной анаэробной энтеротоксемии. Учитывая широкую распространенность бактериальных инфекционных болезней, результативность современного животноводства и птицеводства во многом определяется его эпизоотическим состоянием и уровнем противоэпизоотических мероприятий.

Решающая роль в системе противоэпизоотических мероприятий отводится диагностике инфекционных болезней животных. Из многочисленных методов лабораторной диагностики важное значение имеет бактериологическая, основанная на индикации возбудителей из организма животных и внешней среды. Как правило, по результатам бактериологического исследования ставится первичный диагноз, на основе которого разрабатываются планы противоэпизоотических мероприятий против инфекционных болезней.

1. СИБИРСКАЯ ЯЗВА

(лат. – *Febris carbunculosa*; англ., фр. – *Anthrax*; нем. – *Milzbrand*)

В настоящее время сибирская язва продолжает представлять серьезную проблему для здравоохранения и сельского хозяйства многих стран мира, а также для Российской Федерации. В нынешнем столетии сибирская язва привлекла к себе пристальное внимание научных кругов и общественности в связи с фактом применения спор возбудителя с террористической целью. Однако не меньшую бессрочную опасность представляют и территории, на которых были проведены захоронения домашнего скота, погибшего от сибирской язвы. В России заболевания сибирской язвой возникали постоянно и носили массовый характер, особенно в районах с высокоразвитым животноводством.

Сибирская язва – инфекционная, зооантропонозная, не высококонтагиозная, остропротекающая болезнь многих видов животных, характеризующаяся признаками септицемии, тяжелой интоксикации, а также образованием карбункулов, вызываемое спорообразующими микробами *Bacillus anthracis*. Передается человеку при контакте с больными животными, их трупами, сырьем животного происхождения, контаминированными объектами внешней среды и, возможно, кровососущими членистоногими.

Сибирская язва известна человечеству еще с глубокой древности. Эпизоотии и эпидемии сибирской язвы в Средние века наносили огромные опустошения, вызывая гибель животных, заболевание и смерть людей во многих странах Европы. С. С. Андриевский на Урале в 1786–1789 гг. установил тождественность сибирской язвы у человека и животных, доказал заразность болезни и дал ей название «сибирская язва», принимая во внимание ее широкое в то время распространение на Урале и в Сибири. Приоритет открытия возбудителя сибирской язвы принадлежит Ф. Полендеру (1849) в Германии, П. Райе и К. Давену (1850) во Франции. В 1876 г. Р. Кох выделил культуру возбудителя и выявил феномен спорообразования. В 1881 г. Л. Пастер провел первые успешные опыты вакцинации животных ослабленными культурами.

1.1. Этиология

Возбудитель сибирской язвы – *B. anthracis*, относится к семейству спорообразующих микроорганизмов *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, в котором насчитывается 101 вид. Из данного рода выделяют группу видов *Bacillus cereus*, в которую входят близкородственные *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* и недавно признанный новым видом психротолерантный микроб *B. weichenstephanensis*.

Возбудитель болезни является *Bacillus anthracis* – это неподвижная, грамположительная, споро- и капсулообразующая аэробная палочка размером 1-1,5×3-10 мкм. В организме восприимчивых животных и человека, а также при росте на богатых белком искусственных питательных средах образует капсулу, что характерно для вирулентных штаммов. Споры образуются при неблагоприятных для жизнедеятельности вегетативной формы условиях – вне организма, они овальной формы размером 0,8-1×1,2-1,5 мкм. В мазках из патологического материала бациллы располагаются одиночно или парно, реже – короткими цепочками, а в мазках из культур часто обнаруживают длинные цепочки, напоминающими бамбуковую трость. В организме восприимчивых животных и человека они продуцируют специфический экзотоксин, включающий иммуногенный (протективный) антиген, воспалительный и летальный факторы. Вегетативные формы микроба малоустойчивы.

Важнейшим фактором вирулентности сибиреязвенной палочки является капсула. Утрата капсулы приводит к потере вирулентности. Капсула предохраняет *B. anthracis* от фагоцитоза. Наличие капсулы необходимо на первых этапах инфекционного процесса для предотвращения опсонизации и фагоцитирования микроорганизма. Типичные вирулентные штаммы *B. anthracis* образуют капсулу в организме больных людей и животных, а также при культивировании на 1%-м бикарбонатно-сывороточном агаре в

атмосфере, содержащей 5-50% углекислоты или на жидкой среде ГКИ, содержащей 40% инактивированной бычьей (лошадиной) сыворотки и 60% раствора Хенкса. На 1%-м бикарбонатном агаре микроб растет в SM-форме в виде гладких, блестящих, влажных, слизистых колоний с неровными краями

Другим важным фактором вирулентности, который ответствен за смерть животных, является сложный комплекс экзотоксина, содержащего 3 различных компонента: фактор I, состоящий из белка и углевода и два фактора белковой природы (факторы II и III).

ген *суа* - фактора отечности (ОФ);

ген *раг* - протективного антигена (ПА);

ген *lef* - летального фактора (ЛФ).

Фактор отечности вызывает повышение проницаемости сосудов. Протективный антиген индуцирует синтез защитных антител. Летальный фактор вызывает смерть животных. Все три компонента токсина действуют синергидно.

Геном типичных штаммов сибиреязвенного микроба представлен одной кольцевой хромосомой и двумя плазмидами. Токсинообразование и капсулообразование детерминированы плазмидами *pXO1* и *pXO2*. В составе плазмиды *pXO1* есть три вышеуказанных гена, определяющих синтез основных компонентов экзотоксина. Отсутствие хотя бы одной из этих плазмид приводит к снижению вирулентности вплоть до полной ее утраты.

В природе, наряду с "классическими" диплазмидными штаммами, с меньшей частотой встречаются атипичные моно- и бесплазмидные варианты возбудителя.

При посевах на чашки Петри с питательным агаром после суточной инкубации при (36 ± 1) °С микроб формирует крупные шероховатые сухие матовые колонии в R-форме, с «шагреновой» поверхностью, с неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками. При малом увеличении под микроскопом (7x10) они напоминают локоны волос или львиную гриву. Характерный придонный рост сибиреязвенного микроба в МПБ или 1%-й пептонной воде похож на комочек ваты, с трудом разбивающийся при встряхивании, при этом бульон остается прозрачным. Сибиреязвенный микроб способен разлагать с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу и некоторые другие сахара, но не разлагает лактозу. Обладает относительно низкой протеолитической активностью и при посеве уколом в столбик 10-12%-го мясопептонного желатина и выращивании при 22°С рост микроба напоминает елочку, опрокинутую верхушкой вниз; на 3-5 день желатин разжижается в виде воронки. Большинство сапрофитов полностью разжижает желатин в более короткие сроки. При росте на кровяном агаре с 3-5% дефибринированной крови барана через 20-24 ч гемолиз не наблюдается, в то время как многие сапрофиты дают быстрый гемолиз (через 12-18 ч при 37 °С). Большинство штаммов сибиреязвенного микроба не образует фермент лецитиназу. При росте на агаре с куриным желтком вокруг колоний не происходит помутнения среды в виде беловатой зоны, а при посеве на жидкую желточную среду желток не свертывается даже при 5-6-суточном инкубировании. Сапрофиты свертывают желток в течение 6-10 ч. Сибиреязвенный микроб, в отличие от сапрофитных бацилл, обладает низкой фосфатазной активностью и не способен разлагать фосфаты, добавляемые в питательную среду (тест на фосфатазу). Большинство штаммов сибиреязвенного микроба чувствительны к пенициллину и при выращивании на МПА или МПБ в присутствии 0,5-0,05 ЕД/мл бензилпенициллина через 3 ч инкубирования образуют цепочки из шарообразных клеток – «жемчужное ожерелье»

Вегетативные формы микроба малоустойчивы. В мягких тканях не вскрытого трупа они разрушаются под действием протеолитических ферментов через 7 суток, свежее молоко обладает бактериостатическими свойствами в течение 24 часов. При 60°С погибают через 15 мин, при 100°С – мгновенно, под действием прямых лучей солнца – через несколько часов, быстро гибнут при воздействии общепринятыми

дезинфицирующими средствами. При -10°C вегетативные клетки выживают 24 дня, в замороженном мясе при -15°C – до 15 дней.

Споры возбудителя сибирской язвы чрезвычайно устойчивы – не погибают в разлагающемся трупном материале, годами сохраняются в воде, десятками лет – в почве. Сухой жар при $120-140^{\circ}\text{C}$ убивает их через 2-4 ч, а автоклавирование при 120°C – через 5-10 мин, кипячение – через 15-30 мин. По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам споры возбудителя сибирской язвы относятся к особо устойчивым (4-я группа). Для дезинфекции применяют растворы хлорной извести, нейтрального гипохлорита кальция или препарата ДП-2 с содержанием активного хлора 8 %; 10%-ный горячий гидроксид натрия, 10%-ный одно-хлористый йод, 37%-ный формальдегид в форме аэрозоля, 20%-ный раствор пероксида водорода с добавлением 5%-ной уксусной кислоты в форме аэрозоля, 7%-ный раствор пероксида водорода, 3%-ный раствор йодеза, бромистый метил, ОКЭБМ (окись этилена бромметан).

1.2 Эпизоотология

Наиболее восприимчивы к сибирской язве крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, лошади, олени, верблюды, буйволы, менее восприимчивы свиньи. Источник возбудителя – больное животное, из организма которых возбудители выделяется с калом, мочой, слюной. Дикие копытные (лоси, горные бараны, косули, зубры, дикие кабаны, антилопы, жирафы) чувствительны к сибирской язве. Малочувствительны плотоядные – лисицы, шакалы, койоты, собаки, кошки и птицы (грифы, ястребы, кобчики). Зарегистрирована болезнь среди грызунов (зайцы, крысы, мыши и др.). Не болеют пресмыкающиеся, земноводные, рыбы и беспозвоночные. Молодые животные более восприимчивы, чем взрослые.

Основной путь заражения – алиментарный. Заражению способствует наличие повреждений слизистых оболочек ротовой полости и глотки, смена зубов и т.д. Нельзя исключить аэрогенное заражение животных (особенно овец) при вдыхании пыли. Возможен и трансмиссивный путь заражения при обилии кровососущих насекомых (слепни, мухи-жигалки, комары). Пути выделения возбудителя – с секретами и экскретами. Факторы передачи возбудителя – контаминированные сибиреязвенными спорами объекты внешней среды (навоз, подстилка, корма, помещения, предметы ухода, сырье и продукты животноводства, почва). Самый опасный фактор передачи – труп погибшего животного. Спорадическая интенсивность проявления.

1.3 Клинические признаки

Течение и характер проявления болезни, как и продолжительность инкубационного периода, зависят от степени резистентности животного, дозы и вирулентности возбудителя, пути его проникновения в организм. Инкубационный период составляет от нескольких часов до 14 дней.

При сверхостром или молниеносном течении наблюдают гибель животных через 1-1,5 часа. Внезапно появляются явления апоплексии мозга, судороги, ускоренное дыхание, частый слабый пульс, синюшность слизистых оболочек, потеря сознания. Животные стонут, упираются головой в стену, наблюдается понос, метеоризм, судороги мышц, моча с кровью. Животное шатается, падает. Из ротовой полости, ануса выделяется кровь.

При остром течении болезнь длится от нескольких часов до 1-2 дней. У животных наблюдают признаки беспокойства. Животное ложится, вскакивает, стонет, мычит, скрежещет зубами, ударяется о стены, затем наступает угнетение, дыхание ускоренное, тяжёлое, пульс едва уловим, слизистые оболочки цианотичны, на конъюнктиве геморрагии. Аппетит понижен, секреция молока прекращается, температура тела $40,4 - 41,4-42^{\circ}\text{C}$.

Подострое течение болезни длится до 7 дней, иногда – до 2-3 месяцев. Чаще наблюдается у лошадей, симптомы такие же, как и при остром течении, но не так резко

выражены. У животных бывают периоды ремиссий - состояние улучшается, но затем вновь рецидив болезни. В месте внедрения возбудителя образуется карбункул, ткань его отечна, вначале твердая, безболезненная, затем происходит её омертвление в центре, затем - язва, покрытая струпом черного цвета.

Сибирская язва у свиней протекает как геморрагический лимфаденит с поражением подчелюстных, заглоточных и поверхностных шейных лимфатических узлов.

1.4 Патологоанатомические признаки

Трупы павших животных вскрывать категорически запрещено. Труп вздут, трупное окоченение выражено слабо или отсутствует. Из естественных отверстий выделяется пенистое кровянистое истечение, слизистые оболочки цианотичны. Кровь не свернувшаяся, дегтеобразная. Трупы быстро разлагаются. У крупного рогатого скота наблюдают геморрагическое воспаление брыжеечных лимфатических узлов. Селезенка увеличена в 4-5 раз, переполнена кровью, консистенция дряблая, пульпа при разрезе стекает в виде дегтеподобной массы. Почти всегда обнаруживают изменения в двенадцатиперстной и тощей кишках – многочисленные кровоизлияния, иногда даже карбункулы. В сердечной сумке, брюшной и грудной полостях скопление кровянистой жидкости. Кровоизлияния в веществе мозга и оболочках.

У свиней студенисто-кровяные отеки с желтоватым оттенком располагаются под кожей в межчелюстной области. Лимфатические узлы увеличены, сочны, на разрезе видны многочисленные кровоизлияния, геморрагический лимфаденит. Находят изменения в миндалинах – дифтеритические струпа, геморрагическое воспаление. Процесс распространяется на нёбную занавеску, клетчатку гортани, шеи, головы, подгрудка.

1.5. Сибирская язва у человека

Человек может заразиться при непосредственном взаимодействии с такими продуктами жизнедеятельности животных как: мясо, шерсть, кожа, конский волос и др.

Наиболее часто сибирская язва у человека протекает в виде кожной формы (95-99% случаев), у 5% больных в виде легочной и лишь в 1% – кишечной.

Различают следующие клинические разновидности кожной формы: сибирезвенный карбункул, эдематозная, буллезная и эризипелоидная. Чаще других встречается *сибирезвенный карбункул*. Около 80% случаев кожной формы сибирской язвы протекает в виде самоограничивающейся локализованной инфекции, которая через несколько недель даже при отсутствии лечения заканчивается выздоровлением. Типичные проявления кожной формы сибирской язвы возникают в зоне ворот инфекции. Вначале появляется красное зудящее пятнышко, которое быстро превращается в папулу, а последняя – везикулу с прозрачным или геморрагическим содержимым. Больной при зуде срывает пузырек, на его месте образуется язвочка с темным дном и обильным серозным отделяемым. По периферии язвочки развивается воспалительный валик, в зоне которого образуются дочерние пузырьки. Одновременно с этим вокруг язвочки развивается отек (*может быть весьма обширным*) и регионарный лимфаденит. К моменту образования язвочки появляется лихорадка, которая продолжается в течение 5-7 дней, общая слабость, разбитость, головная боль, адинамия. При любой из указанных форм сибирской язвы может развиваться сепсис с бактериемией и вторичными очагами (поражение печени, селезенки, почек, мозговых оболочек). Для этиотропной терапии применяют антибиотики и специфический иммуноглобулин

1.6 Лабораторная диагностика

Лабораторную диагностику и обнаружение возбудителя сибирской язвы осуществляют на основании МУК 4.2.2413-08, утвержденных и введенных в действие руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г. Онищенко 29 июля 2008 года.

Исследование на сибирскую язву включает микроскопию мазков из исходного материала, высевы на питательные среды, постановку основных и дополнительных тестов

идентификации, использование МФА для обнаружения антигенов и антител к ним, постановку ПЦР, биопробы и реакции преципитации. У человека и свиней, в случае невозможности установить диагноз вышеперечисленными методами, обязательна постановка клинической кожно-аллергической пробы с сибиреязвенным аллергеном.

Материал для исследования, взятие, пересылка материала и подготовка проб для исследования. Все работы по забору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала от людей и животных, из объектов окружающей среды осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)", СП 1.2.036-95 "Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности", МУ 1.3.1794-03 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности",

1.6.1 Подготовка к исследованию

1.6.1.1 Материал для исследования:

а) от больных или подозрительных на заболевание людей, в зависимости от формы заболевания - содержимое везикул, отделяемое карбункула или язвы, струнья, мокрота, кровь, спинномозговая жидкость, моча, испражнения, экссудаты;

б) трупный материал - кровь, экссудаты, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов и др.);

в) материал от животных;

г) продовольственное сырье и продукты животного происхождения;

д) объекты окружающей среды - почва, трава, фураж, подстилка, вода и т. д. Забор всех видов материала осуществляется в стерильную стеклянную или пластиковую посуду, соответствующую объему проб.

Иммунофлуоресцентным, серологическим и бактериологическим методами исследуется соответствующий материал из общей пробы.

1.6.1.2 Взятие материала от животных.

Для бактериологического исследования в случае падежа животного в лабораторию направляют ухо и мазок, полученный из надреза уха. Ухо отрезают с той стороны, на которой лежит труп. Предварительно ухо туго перевязывают шпагатом у основания в двух местах и отрезают между лигатурами. Место отреза уха на трупе прижигают. Отрезанное ухо заворачивают в пергаментную бумагу, смоченную в дезинфицирующем растворе. Если подозрение на сибирскую язву возникло при вскрытии трупа животного или в ходе вынужденного убоя, все манипуляции по вскрытию прекращают и на исследование направляют кровь, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов, в которых имеются характерные патологоанатомические изменения), костный мозг (из грудины или канала бедренной кости). Материалы от трупа необходимо брать и исследовать как можно раньше, так как из-за развития посторонней микрофлоры трудно выделить чистую культуру возбудителя сибирской язвы. От трупов свиней в обязательном порядке отбирают заглочные лимфатические узлы и участки отечной соединительной ткани. У животных с подозрением на заболевание или больных берут на исследование кровь с помощью шприца из яремной вены или из вены уха, а у свиней - из вены хвоста. В отдельных случаях у животных берут на исследования пробы каловых масс.

Для исследования методом ПЦР.

Микробиоптат/микроаутоптат (пунктат) помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-1,7 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками, содержащие 0,1-0,2 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида или транспортной среды №1. Макробиоптат/макроаутоптат (кусочки тканей массой 0,1-1,0 г) помещают в контейнер с 0,9%-м раствором натрия хлорида или транспортной средой №2

1.6.1.3. Взятие материала из сырья животного происхождения и объектов окружающей среды.

Взятие материала из сырья животного происхождения и из объектов внешней среды проводится в тех случаях, когда необходимо установить источник инфекции или фактор передачи, для выявления обсемененности спорами возбудителя сибирской язвы отдельных объектов, а также в целях обнаружения микроба в местах старых скотомогильников при проведении строительных, мелиоративных, гидротехнических и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта.

Для бактериологического исследования

Мясо и мясные продукты. Из материала, доставленного на исследование, отбирают образцы весом 10-30 г, из мяса - участки с лимфоидной тканью или кровоизлияниями.

Шерсть для исследования отбирают из разных мест, не менее 5 образцов массой около 2 г каждый (лучше брать пучки загрязненной шерсти). Если шерсть упакована в кипы, берут не менее 10 образцов из разных мест каждой кипы, а также скопившуюся внутри обшивки пыль. Образцы от одной кипы объединяют и упаковывают вместе.

Кожа и кожсырье. Берут кусочки кожи размером 3х3 см с периферических незагнивших и незаплесневевших участков шкур. При наличии на внутренней стороне шкурки кровоподтеков или инфильтратов пробы берут и в этих местах.

Почва. При отборе проб почвы следует руководствоваться "Методическими рекомендациями по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителей сибирской язвы и актиномицетов-антагонистов" (М., 1984). Пробы почвы с мест вероятного обсеменения спорами возбудителя (мест вынужденного убоя скота, стоянок и водопоя животных) берут на глубине до 15 см, на территории скотомогильников - на глубине до 2 м с помощью почвенных буров. При этом при заборе проб с большой территории обследуемую площадь разбивают на квадратные участки со стороной не более 4 м. В каждом квадрате намечают 5 точек по диагонали или 4 точки по краям и одну посередине, откуда производят отбор проб почвенным буром. Перед взятием почвы на территории скотомогильника верхний ее слой снимают на 2-3 см и пробы берут на глубину до 1,5-2,0 м через каждые 25 см не менее 200 г в пробе. Особое внимание обращают на костные и другие животные остатки, которые также отбираются для исследования. Пробы упаковываются в том же порядке. Каждую пробу весом около 100-200 г помещают в мешочек из плотной ткани с завязками или в лабораторную посуду (широкогорлый флакон, банку), закрытую такой же тканью. Нельзя помещать пробы почвы в полиэтиленовые мешочки или в плотно закрытую посуду, так как в этих условиях происходит бурное развитие актиномицетов, губительно действующих на возбудитель сибирской язвы. Вынутую из глубины и не использованную для проб почву с целью обеззараживания смешивают с сухой хлорной известью, содержащей 25% активного хлора, в соотношении 1 часть хлорной извести на 3 части почвы, слегка увлажняют и сбрасывают в шурф. Место отбора проб дезинфицируют раствором хлорной извести, содержащей 5% активного хлора, инструменты - огнем паяльной лампы.

4.4.1.5. Вода

Пробы воды из естественных и искусственных водоемов берут у поверхности (на глубине 10-15 см) и у дна при помощи батометра или специально приспособленной бутылки. Объем каждой пробы не менее 0,5 л, общий объем не менее 1 л. Кроме того, берут пробы придонного осадка у береговой кромки, которые исследуют так же как пробы почвы.

Смывы с объектов внешней среды. Смывы делают с мест наиболее вероятного обсеменения спорами возбудителя с помощью стерильного тампона, смоченного стерильной дистиллированной водой. Площадь смыва одним тампоном около 100 см². Затем тампоны помещают в пробирки, заливают стерильной дистиллированной водой (15 мл) и закрывают пробкой.

Корма. Концентрированные корма (зерно, отруби, комбикорм) отбирают в зависимости от условий хранения. При наличии незатаренных кормов первичные пробы отбирают из расчета 1 проба не менее 400 г на 4 м поверхности, но не менее 5 проб от

каждого закрома, партии. Первичные пробы берут как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма равномерно по всей площади. При наличии затаренных кормов отбор проводят от каждой упаковочной единицы. Отбор проб проводят сухим стерильным пробным щупом. После взятия проб от каждого объекта (партии) щуп очищают и обжигают огнем паяльной лампы. Пробы грубых кормов (сено, солома) берут из разных мест скирды при помощи ножниц и пинцета из расчета 1 проба (40 г) на 4 м площади скирды. Зеленую массу отбирают, как грубые корма. Корнеплоды, в зависимости от величины, отбирают из расчета 1-3 штуки на 4 м площади бурта, отсека. С отобранных корнеплодов скальпелем в местах, где имеются остатки земли, срезают поверхностный слой, который используют для исследования. В лабораторию направляют среднюю пробу, которую составляют из хорошо перемешанных первичных проб данной партии, емкости и т.п. Масса средней пробы должна быть не менее 500 г.

Воздух. Пробы воздуха отбирают с помощью специальных приборов, снаряженных сорбирующей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 3-5 м.

Для исследования методом ПЦР

Для исследования методом ПЦР отбирают пробы из объектов окружающей среды, пищевых продуктов (мясо и продукты животного происхождения), сухих и сочных кормов, подстилки, шкур, шерсти, почвы, воды, смывов с поверхностей. Отбор проб осуществляют так же, как и для бактериологических исследований.

1.6.1.4 Направление материала на исследование.

Транспортирование и хранение биологического материала для исследования методом ПЦР должны осуществляться с соблюдением "холодовой цепи": образцы цельной крови - при температуре 2-8 °С - в течение 1 сут; образцы плазмы и сыворотки крови - при температуре 2-8 °С - в течение 5 сут, при температуре -70 °С - длительно. Образцы остальных видов биологических материалов - при температуре 2-8 °С - в течение 1 сут, при температуре -20 °С - в течение 1 недели, при температуре -70 °С - длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Патологический материал для исследования помещают в стерильную посуду (пробирки, банки или другую лабораторную посуду). Высушенные на воздухе мазки кладут в стерильные чашки Петри, которые обертывают плотной бумагой с надписью "мазок не фиксирован". В направлении к материалу от больного человека или трупа указывают фамилию, имя, отчество больного (умершего), место и время взятия материала, его наименование и предположительный диагноз. Пробы почвы, кормов и других сыпучих объектов помещают в сухую стеклянную банку и закрывают стерильной крышкой, пробкой или пергаментом, можно использовать полиэтиленовые мешочки (кроме проб почвы), которые завязывают шпагатом. Пробы воды наливают в стерильные стеклянные бутылки и закрывают стерильными резиновыми пробками. Допускается использование одноразовых стерильных или многоразовых автоклавируемых пластиковых флаконов. Все пробы нумеруют, емкости заворачивают в лигнин или гигроскопическую вату в количестве, достаточном для сорбции всей жидкости в случае повреждения упаковки. Пробы упаковывают во влагонепроницаемую тару, которую обвязывают, пломбируют или опечатывают, делают надпись "верх, осторожно". Пробы материала и сопроводительные документы доставляются нарочным на спецтранспорте. В сопроводительной к пробам указывают причину проведения исследования, какой материал и в каком количестве направляют, место и дату отбора материала. Для проб шерсти и кормов дополнительно указывают происхождение, объем партии, вид упаковки и количество упаковочных единиц. К сопроводительной прилагают опись с указанием места отбора каждой пробы.

1.6.1.5 Подготовка проб к бактериологическому исследованию.

Кусочки проб мяса, органов и тканей от трупов помещают в ступку, измельчают ножницами или пестиком, затем заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида

в соотношении 1:10, суспензию через марлевый тампон набирают в шприц или пипетку и переносят в пробирку или колбочку. Воду с илстыми частицами фильтруют через 3 слоя марли. Чистую воду исследуют без предварительной подготовки. С целью концентрирования микробов пробы воды можно профильтровать через мембранные фильтры (N 3) или осадить центрифугированием при 6000 об./мин в течение 15 мин. Осадок с каждого фильтра соскабливают скальпелем (или фильтры измельчают стерильными ножницами), затем заливают 1-2 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. Осадок после центрифугирования также ресуспендируют в 1-2 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. Полученную микробную взвесь используют для исследования. Отфильтрованную воду обеззараживают добавлением сухой хлорной извести из расчета 200 г на 1 л. Тампоны, которыми делают смывы с объектов окружающей среды, отжимают о стенки пробирки и удаляют, а оставшуюся жидкость исследуют. Пробы почвы освобождают от корней, камешков и тщательно перемешивают. От каждой пробы берут 90-100 г почвы, помещают в колбу, заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида или 0,5% пиродифосфата натрия из расчета получения 15-20 мл суспензии. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5-10 мин, дают отстояться 3-5 мин и надосадочную жидкость переносят в пробирку для исследования. Для повышения эффективности выявления спор *B. anthracis* целесообразно проводить двукратную обработку образцов почвы диспергирующей жидкостью с 0,5% пиродифосфата натрия. Для этого навеску почвы помещают в стерильный стеклянный или пластиковый флакон и заливают диспергирующей жидкостью из расчета получения 15-20 мл суспензии. Суспензию тщательно перемешивают вращательными круговыми движениями в течение 5-10 мин, дают отстояться 3-5 мин, надосадочную жидкость аккуратно переливают в стерильный пластиковый или стеклянный центрифужный стакан. К образцу почвы вновь добавляют диспергирующую жидкость в половинном объеме и повторяют процедуру элюции. Надосадочные жидкости после первой и второй элюций объединяют в одном центрифужном стакане и центрифугированием при 1000 об./мин в течение 15 мин удаляют механические примеси. Надосадок переносят в стерильный центрифужный стакан и микробную взвесь концентрируют центрифугированием при 6000 об./мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость декантируют, а осадок ресуспендируют в 1 мл стерильного 0,9%-го раствора натрия хлорида и используют для дальнейшего исследования. Процедуру центрифугирования проводят в отдельных боксовых помещениях или в боксах биологической безопасности III класса ESCO Airstream Class III, либо их аналогах производства других фирм, оборудованных электрическими розетками и УФ-лампами. Различные порошкообразные вещества, в том числе пищевые продукты и корма, обрабатывают аналогично почве, используя в дальнейшем надосадочную жидкость или раствор в случае растворения вещества. Для проб из шкур кусочки массой в 1 г помещают в фарфоровую ступку и заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида из расчета 1:10. Кусочки измельчают ножницами и оставляют при 20 °С на 2-3 ч для размягчения материала. После этого пробы хорошо растирают пестиком в той же жидкости до получения волокнистой мезги, мезгу удаляют, предварительно отжав ее пестиком на внутренней боковой поверхности ступки. От каждой пробы шерсти отбирают наиболее загрязненные части, измельчают ножницами, вместе с пылью помещают в колбу и заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5-10 мин. Для освобождения от грубых частиц взвесь можно профильтровать через 2-3 слоя марли. Для избавления от посторонней микрофлоры, подготовленные по описанной выше процедуре пробы из объектов внешней среды, шерсти и кожи, пищевых продуктов делят на две части, одну из которых подвергают термической обработке на водяной бане при 80 °С в течение 20 мин. Пробы от больного человека и животного, из патологического материала и мяса животных, где возбудитель сибирской язвы находится в вегетативной форме, не прогревают.

1.6.1.6 Предварительная обработка проб для исследования методом ПЦР.

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. После этого сгусток обводят пастеровской пипеткой и оставляют при комнатной температуре до образования сыворотки. Затем сыворотку в объеме 1 мл переносят отдельными наконечниками с аэрозольным барьером (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Микроаутопаты, сыворотка, содержимое везикул, отделяемое язв, фрагменты отторгнутого струпа, мазки из полости носа и спинномозговая жидкость не требуют предварительной обработки. Макроаутопаты массой 0,1-1 г помещают в стерильную фарфоровую ступку, добавляют стерильный 0,9%-й раствор хлорида натрия в соотношении 1:10, измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Полученную 10%-ю суспензию центрифугируют или через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость (0,1-0,2 мл) стерильным наконечником с аэрозольным барьером в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2,0 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками. Воду, смывы с объектов внешней среды, пробы почвы, пищевых продуктов или кормов, шкур, шерсти предварительно обрабатывают так же, как и для бактериологического исследования, отбирая для исследования методом ПЦР 0,1-0,2 мл водной фазы образцов.

1.6.2. Порядок проведения исследования

Все работы по проведению исследования материала подозрительного на наличие возбудителя сибирской язвы проводят с соблюдением требований СП 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)".

1.6.2.1 Бактериоскопия.

Световая микроскопия.

Из поступившего патологического материала (от людей и животных) готовят несколько мазков, которые подсушивают на воздухе, фиксируют в спирте с добавлением 3% перекиси водорода не более 30 мин, после этого окрашивают по Граму и на капсулу одним из методов (по Ребигеру, Михину, Романовскому-Гимза). В окрашенных мазках из патологического материала сибиреязвенный микроб представляет собой грамположительные палочки, располагающиеся короткими цепочками или попарно. Концы палочек, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы обычно закруглены. В отдельных случаях (чаще в мазках от человека или свиней) форма возбудителя сибирской язвы может быть нехарактерной (короткие, толстые или изогнутые, иногда зернистые палочки с вздутием посередине или на конце, возможно наличие "теней" микробов). Для обнаружения капсул лучшей краской является раствор Ребигера. На всю поверхность фиксированного мазка пипеткой наносят раствор Ребигера и выдерживают 30-60 сек, затем промывают водой и высушивают. В мазках из свежего патологического материала капсула вокруг микроба окрашивается в розовый или красно-фиолетовый цвет, тело микробной клетки - в темно-фиолетовый. В мазках из крови и спинномозговой жидкости палочки с капсулой увеличены, края микроба закруглены. При окраске мазков из несвежего патологического материала микробы могут быть также несколько увеличены, концы закруглены, морфологическая стройность бацилл нарушена, они как бы "изъедены", иногда остаются "тени", а от капсулы могут оставаться одни обрывки, которые окрашиваются очень слабо. Для обнаружения спор в некоторых образцах внешней среды после фиксации мазки окрашивают карболовым фуксином по Цилю-Нильсену. После фиксации мазка на стекло кладут полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый фуксин Циля. Мазок с краской подогревают на пламени спиртовки до появления паров (но не до кипения) и краску оставляют на препарате без подогревания еще на 2-3 мин. Бумажку удаляют пинцетом, краску сливают, препарат промывают водой. Затем обесцвечивают 5%-й серной кислотой до желтоватого оттенка (в течение 3-5 с). Тщательно отмывают препарат водой, ополаскивают 5-10 с 96°-

м спиртом, а потом - водой. Докрашивают мазок метиленовой синью Леффлера 2-3 мин, смывают водой и просушивают. Препарат просматривают в микроскопе с иммерсионной системой. В мазках наблюдают палочки синего цвета. Споры, в зависимости от степени их жизнеспособности, могут окрашиваться следующим образом: 1) розовые с более интенсивной окраской по периферии - жизнеспособные; 2) равномерно окрашенные в красный цвет - слабо жизнеспособные; 3) синие - не жизнеспособные. По результатам микроскопического исследования немедленно дают предварительный ответ.

Люминесцентная микроскопия – МФА.

Для люминесцентной микроскопии делают мазки-отпечатки из экссудата брюшной полости и органов биопробных животных, мазки-отпечатки из отечной жидкости и внутренних органов людей и животных, мазки из подозрительных колоний, выросших из посевов проб на чашках с питательными средами. Мазки подсушивают на воздухе и фиксируют в этиловом спирте с 3% перекиси водорода в течение 30 мин. На высохшие фиксированные мазки наносят в рабочих разведениях, указанных на этикетке, диагностические сибирязвенные люминесцирующие адсорбированные соматические иммуноглобулины. В исходных пробах могут быть обнаружены сибирязвенные микробы в вегетативной или споровой форме. Мазки из смывов, суспензий, вытяжек из материалов, подозрительных на высокую контаминацию возбудителем сибирской язвы, обрабатывают диагностическими люминесцирующими адсорбированными антиспоровыми иммуноглобулинами. В случае приготовления мазков непосредственно из нативного материала их окрашивают для увеличения контрастности смесью диагностических иммуноглобулинов и бычьего альбумина, меченого родамином. Для этого готовят отдельно разведения иммуноглобулинов и альбумина в 2 раза меньшие, чем указано на этикетках, смешивают их в соотношении 1:1 и наносят на мазки. Например, рабочее разведение люминесцирующих антиспоровых иммуноглобулинов (1) составляет 1:16, а альбумина (2) - 1:8. Смесью составляют из разведения (1) 1:8 и (2) 1:4. Дальнейшую обработку окрашенных таким образом мазков проводят аналогично мазкам, окрашенным только люминесцирующими иммуноглобулинами. Мазки с нанесенными на них люминесцирующими иммуноглобулинами помещают во влажную камеру (чашку Петри или эксикатор с увлажненной 0,9%-м раствором натрия хлорида или дистиллированной водой фильтровальной бумагой или комочком ваты), выдерживают для окрашивания при 37 °С в течение 20 мин. После этого их тщательно промывают два раза по 10 мин в 0,9%-м растворе натрия хлорида, затем в дистиллированной воде и высушивают на воздухе. Препараты покрывают покровными стеклами или просматривают без покровных стекол. Мазки микроскопируют в люминесцентном микроскопе с системой подобранных светофильтров и иммерсионным объективом. При этом необходимо пользоваться нефлуоресцирующим иммерсионным маслом. В случае его отсутствия применяют смесь, содержащую 1 часть 0,9%-го раствора натрия хлорида и 9 частей химически чистого глицерина. Споры и вегетативные клетки сибирязвенного микроба, окрашенные люминесцирующими иммуноглобулинами, дают яркое свечение периферии клеток, имеющих характерную для данного вида морфологию. Такое свечение называется специфическим, в отличие от неспецифического, характеризующегося равномерным неярым свечением всей поверхности клеток.

Для учета результатов используется арбитражная система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток:

- 4⁺ - большое количество специфически светящихся клеток, расположенных длинными цепочками (вегетативная форма), очень яркая флуоресценция по периферии споры или вегетативной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки;
- 3⁺ - яркая флуоресценция периферии клетки, клетки расположены отдельными группами (цепочками) и единично;
- 2⁺ или 1⁺ - слабое свечение периферии клетки, не контрастирующее с ее телом.

Свечение спор и вегетативных клеток на 4⁺ и 3⁺ позволяет подозревать наличие в

исследуемом материале возбудителя сибирской язвы и может служить основанием для выдачи предварительного положительного ответа. Необходимо учитывать, что специфичность данного метода составляет не более 70%, ввиду наличия перекрестно-реагирующих антигенов у представителей группы *Bacillus cereus*.

1.6.2.2 Посев на питательные среды, бактериологический метод.

Подготовленный для исследования материал ("Подготовка проб к бактериологическому исследованию") засевают на чашки Петри с МПА, агаром Хоттингера (рН 7,2), селективную дифференциально-диагностическую среду с 0,01% натрия фенол-фталеинфосфата (прилож.1.1) и пробирку с МПБ. Для засева одной пробы желательно использовать не менее 5 чашек. Поверхность агара перед посевом должна быть совершенно сухой. Посев необходимо производить с помощью шпателя, предварительно нанося на поверхность агара 1-2 капли (0,1 мл) исследуемого материала. Если материал значительно загрязнен посторонней микрофлорой (почва, корма, смывы с поверхностей и пр.), делают посевы методом истощения, распределяя материал шпателем по поверхности агара с переносом на 2-3 чашки. При исследовании материала, слабо загрязненного посторонней микрофлорой (кровь, пунктаты из карбункула, органы биопробных животных), посев можно проводить петлей без истощения, используя при этом МПА, агар Хоттингера, кровяной агар и МПБ. Посевы помещают в термостат при (36 ± 1) °С на 18-20 ч и при отсутствии роста выдерживают при той же температуре 48 ч.

После суточного роста сибирезвеного микроба МПБ остается прозрачным, на дне образуется рыхлый осадок в виде "комочка ваты". При встряхивании пробирки бульон не мутнеет, осадок разбивается с трудом на мелкие хлопья. В отдельных случаях в МПБ появляется диффузный рост культуры (легкое помутнение), при встряхивании образуются муаровые волны, на поверхности бульона может наблюдаться рост в виде пристеночного кольца. Из бульонной культуры делают мазки, окрашивают по Граму и исследуют под микроскопом. В мазках из бульонной культуры обнаруживают типичные цепочки, состоящие из сибирезвеновых палочек, из бульонной культуры с диффузным ростом - отдельные или парно расположенные палочки. Для получения чистой культуры из бульона делают высевы на плотные питательные среды петлей для получения изолированных колоний.

На следующий день плотные питательные среды просматривают визуально и под микроскопом при малом увеличении. Кроме колоний сибирезвеного микроба на средах может наблюдаться рост спорообразующих сапрофитов, морфологически трудно отличимых от *B. anthracis*. Возбудитель сибирской язвы образует плоские матово-серые шероховатые (R-форма) колонии. Центр их иногда затемнен, периферия бахромчатая с локонообразными отростками. Встречаются колонии с менее выраженной шероховатостью и без отростков, которые также подлежат дальнейшей идентификации. Колонии *B. anthracis* трудно снимаются петлей с поверхности агара, в то время как колонии близкородственных сапрофитов снимаются легко. Для выделения чистой культуры с питательного агара отбирают не менее 10 шероховатых колоний, при отсутствии такого количества - все шероховатые колонии. Примечание: при оценке морфологии колоний следует учитывать существование редких вариантов сибирезвеного микроба II типа, формирующих слизистые колонии в SM-форме на обычных питательных средах.

Посевы на селективной дифференциально-диагностической среде с фенолфталеинфосфатом натрия перед просмотром обрабатывают парами аммиака. Для этого в отдельную крышку от чашки Петри помещают фильтровальную бумагу и наливают на нее 1-2 мл аммиака водного (29%-го, концентрированного). Затем чашку с посевами (агаром вверх), без крышки, помещают на несколько секунд (пока не порозовеют колонии сапрофитов) в крышку с аммиаком. Таким образом обрабатывают все посевы. В силу того, что сибирезвеновый микроб не образует или продуцирует фосфатазу слабо, его колонии, как правило, не изменяют своего цвета. Колонии

спорообразующих сапрофитов, в том числе и *V. cereus*, под действием паров аммиака приобретают розовый или красный цвет. С дифференциально-диагностической среды для выделения чистой культуры отбирают визуально и с помощью микроскопа при малом увеличении все колонии, не изменившие своего цвета после обработки парами аммиака или слабо порозовевшие.

Из всех отобранных колоний делают мазки на двух или более предметных стеклах. Мазки фиксируют и окрашивают двумя способами - по Ребигеру (или по Граму) и сибирезвенной люминесцирующей соматической сывороткой. При просмотре мазков учитывают характерную для сибирезвенного микроба морфологию (длинные нити, концы палочек обрублены), при окраске люминесцирующими сыворотками - специфическое свечение на 4 или 3. Для идентификации отбирают только колонии чистой культуры, которые состоят из характерных для сибирезвенного микроба палочек. Их отсеивают на секторы МПА или агара Хоттингера. Материал из всех других отобранных колоний засевают петлей на отдельных чашках Петри с МПА или агаром Хоттингера для получения изолированных колоний. На этом этапе исследования для получения чистой культуры сибирезвенного микроба важно проводить рассев на неселективной среде. Посевы помещают в термостат на 18-20 ч, после чего проводят учет и отбор колоний для дальнейшей идентификации по полной схеме лабораторного исследования. Из изолированных колоний повторно делают мазки, их фиксируют и окрашивают, как описано выше. При отсутствии достаточного количества культуры исследование проводят на следующие сутки после накопления биомассы.

1.6.2.3. Биологический метод.

В день поступления материала, одновременно с бактериоскопией и посевами на питательные среды с целью выделения возбудителя сибирской язвы, в обязательном порядке проводят биологическую пробу на восприимчивых лабораторных животных. Для постановки биологической пробы используют белых беспородных мышей (массой 18-2 г), морских свинок (массой 350-400 г) или золотистых хомяков (массой 60-80 г). Исследуемый материал, подготовленный соответствующим образом (раздел "Подготовка проб к исследованию"), суспендируют в небольшом объеме стерильного 0,9%-го раствора хлорида натрия и вводят подкожно во внутреннюю поверхность бедра 2 мышам в объеме 0,2-0,5 мл, 2 морским свинкам или 2 золотистым хомякам в объеме 0,5-1,0 мл. Гибель зараженных животных наступает через 1-3 сут., иногда позже. При вскрытии трупов биопробных животных, павших от сибирской язвы, отмечают характерный для сибирезвенной инфекции студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки на месте введения материала, гиперемию внутренних органов, увеличение селезенки и несвернувшуюся кровь. Из тканей и органов павших животных делают мазки-отпечатки, а также посевы на МПА или агар Хоттингера и селективную среду. Мазки-отпечатки фиксируют в спирте с 3% перекиси водорода в течение 30 мин, а затем окрашивают раствором Ребигера или метиленовой синькой. В мазках при микроскопии сибирезвенные бациллы расположены короткими цепочками, попарно или поодиночке, окружены розовой капсулой, зачастую сливающейся вокруг групп микробов. В посевах при просмотре чашек вырастают крупные шероховатые колонии с бахромчатой периферией. Идентификацию выросших колоний проводят выше описанными методами. В случаях, когда чистая культура возбудителя из посевов исходного материала на питательные среды получена раньше, чем наступает гибель зараженных этим материалом животных, суточной бульонной культурой заражают дополнительно двух мышей или морских свинок в дозах, указанных выше. Наблюдение за животными ведут в течение 10 сут., после чего их исследуют, как описано выше. В целях ускорения исследования количество заражаемых белых мышей увеличивают до 6-10 особей и по одной мышке от каждой пробы забивают через 2-3 сут. после введения исходного инокуляма. В этом случае при вскрытии особое внимание уделяют месту введения. Если в исходном материале имеется достаточное количество сибирезвенного микроба, то на месте

введения можно обнаружить отек подкожной клетчатки. В мазках-отпечатках с места введения выявляются капсульные формы микроба, а в посевах - рост типичных колоний.

1.6.2.4. Иммуно-серологические и аллергологические методы исследования.

Реакция преципитации по Асколи

Реакция позволяет в короткие сроки обнаружить сибирезвенный антиген в экстрактах из струпьев язв больных, органов умерших от сибирской язвы людей, шкур и органов павших животных. Исследованию в реакции Асколи подвергают в том числе и загнивший биоматериал. Для постановки реакции необходимы: преципитирующая сибирезвенная сыворотка, экстракт из исследуемого материала и сибирезвенный бактериальный антиген для контроля. Перед постановкой реакции свежий биоматериал выдерживают в термостате в течение 18-20 ч. Экстрагирование проводят горячим и холодным способами. При этом следует учитывать, что в экстрактах, полученных горячим способом, меньше преципитиногенов. Для получения экстракта из патологического материала и струпьев горячим способом материал измельчают, заливают 0,9%-м раствором натрия хлорида с 0,3%-м раствором карболовой кислоты в соотношении 1:10 и кипятят в течение 30-40 мин, при холодном способе - оставляют для экстрагирования на 16-18 ч при комнатной температуре. Полученные экстракты фильтруют до полной прозрачности через фильтровальную бумагу или вату, предварительно смоченные 0,9%-м раствором хлорида натрия. В узкие пробирки наливают 0,2-0,3 мл прозрачной сибирезвенной преципитирующей сыворотки, а затем пастеровской пипеткой осторожно наслаивают на нее такое же количество полученного экстракта. Если реакция положительная, то на границе соприкосновения жидкостей не позднее 15 мин должно появиться мутно-белое кольцо. Реакция оценивается знаком (+). При сомнительной реакции появление кольца наблюдается позднее 15 мин (\pm). Если кольцо отсутствует, то реакция оценивается как отрицательная (-). Одновременно необходимо ставить три контрольных пробы: преципитирующая сыворотка плюс коммерческий стандартный сибирезвенный антиген; преципитирующая сыворотка плюс экстрагирующая жидкость; нормальная лошадиная сыворотка плюс коммерческий стандартный сибирезвенный антиген. Все контроли, кроме первого, должны быть отрицательными. Исследование кожевенного и мехового сырья на сибирскую язву в реакции преципитации по Асколи проводят в соответствии с "Наставлением по исследованию кожевенного и мехового сырья реакцией преципитации", утвержденным Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 25 мая 1971 г. Необходимо учитывать, что применяемые в настоящее время различные виды кислот и щелочей для выделки кожевенного сырья могут влиять на результаты реакции преципитации. Оптимальное значение pH экстрактов должно находиться в пределах 6,0-8,0. Кроме того, данный метод характеризуется недостаточно высокой чувствительностью, так как нередко дает отрицательный результат при исследовании заведомо сибирезвенного материала. Реакцию Асколи используют как экспресс-метод для обнаружения специфических сибирезвенных антигенов у исследуемых культур. Для этого в 0,25-0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида ресуспендируют петлю суточной агаровой культуры. Экстрагирование проводят горячим методом, а постановку реакции выше описанным способом. Учет результатов реакции проводят в течение 3 мин.

МФА для выявления специфических антител в сыворотке крови

В исключительных случаях можно проводить поиск противосибирезвенных антител у больных непрямым МФА. С этой целью используют сыворотку диагностическую антивидовую против иммуноглобулинов человека люминесцирующую сухую. Для получения вегетативной культуры сибирезвенного микроба используют споры вакцины СТИ, которые засевают на чашку с агаром Хоттингера (pH 7,2) и инкубируют в термостате при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч. После этого готовят суспензию вегетативных клеток на 0,9%-м растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма до ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Полученную суспензию тщательно

встряхивают и готовят из нее мазки на хорошо обезжиренных предметных стеклах, по 8 мазков на каждом стекле. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют 30 мин в спирте с 3% перекиси водорода, вновь высушивают и расчерчивают восковым карандашом. При постановке этой реакции желательно использовать "свежие" мазки, при необходимости их можно хранить в холодильнике в закрытых чашках Петри в течение 3 суток. Исследуемую сыворотку от больного человека инактивируют на водяной бане при 56 °С в течение 20 мин. В качестве отрицательного контроля используют сыворотку здорового человека, которую обрабатывают аналогичным образом. Затем сыворотки титруют в пробирках или полистироловых планшетах в 0,9%-м растворе натрия хлорида с двукратным шагом, отбирают с помощью пастеровской пипетки, начиная с большего разведения, и наносят капли на мазки с вегетативной культурой сибиреязвенного микроба. Стекла помещают на дно чашки Петри, закрывают крышкой и выдерживают 20-30 мин при 37 °С. Затем мазки промывают дважды по 10 мин в забуференном 0,9%-м растворе натрия хлорида и 10 мин в дистиллированной воде. Стекла сушат на воздухе при комнатной температуре, после чего на мазки наносят люминесцирующую сыворотку против иммуноглобулинов человека в рабочем титре, обозначенном на ампуле. Мазки окрашивают и промывают так же, как и в первом случае. Микроскопию проводят с иммерсионной системой. Для оценки интенсивности свечения используют четырехкрестовую систему. Положительным результатом считается свечение на 3 и 4. У лиц, больных сибирской язвой, специфические антитела начинают появляться уже с 5-х сут. после начала болезни, и их титр нарастает до 21 и более суток. Увеличение титра антител можно проследить при исследовании парных сывороток с интервалом 5-7 дней. В МФА титры антител могут достигать до 1:640-1:1280, диагностическими считаются титры - 1:16-1:32 и 4-кратное нарастание титров при повторном исследовании.

Реакция непрямой гемагглютинации

Для постановки серологических реакций РНГА (макро- и микрометоды) и РТНГА используется эритроцитарный иммуноглобулиновый диагностикум для выявления сибиреязвенных спор в объектах внешней среды. Исследование материала проводится согласно инструкции по применению.

Таблица 1

Оценка результатов пробы с антраксином

№ пп	Элементы местной реакции		Оценка реакции
	24 ч	48 ч	
1	Инфильтрат отсутствует, гиперемия возможна	Реакции нет	Отрицательная (-)
2	Гиперемия до 8 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия менее 8 мм в диаметре	Сомнительная (±)
3	Гиперемия 8-15 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Слабоположительная (+)
4	Гиперемия 16-25 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Положительная (++)
5	Гиперемия 26-40 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Резкоположительная (+++)
6	Гиперемия более 40 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Очень резкоположительная (++++)

Кожно-аллергическая проба с сибиреязвенным аллергеном антраксином.

Организм больного, переболевшего сибирской язвой и иммунизированного против этой инфекции, обладает свойством отвечать аллергической реакцией в виде гиперемии и инфильтрации кожи на месте введения сибиреязвенного аллергена - антраксина. Эта реакция может появляться уже с первых дней и наблюдается у подавляющего числа

больных с конца первой недели заболевания. Аллергическая перестройка организма у переболевших сибирской язвой может сохраняться длительное время, что позволяет использовать антраксин не только для диагноза текущего заболевания, но и для ретроспективной диагностики. Антраксин вводят с соблюдением всех правил асептики строго внутривенно в количестве 0,1 мл в нижней трети левого предплечья на внутренней стороне. На месте инъекции должна образовываться беловатая, хорошо ограниченная папула около 0,8 см в диаметре, имеющая вдавление на месте волосяных мешочков. В месте введения антраксина через 8-24 ч учитывается наличие гиперемии и инфильтрата. В зависимости от размеров этих элементов производят оценку пробы, руководствуясь приведенной ниже шкалой (табл. 1).

Диагноз сибирской язвы подтверждается при наличии положительной антраксиновой пробы с оценкой от 2⁺ до 4⁺. При наличии сомнительной (±) или слабоположительной (+) пробу повторяют через 5-7 дней. Отрицательная реакция на антраксин не исключает диагноза сибирской язвы. Для диагностики сибирской язвы у свиней применяют сибирезвенный аллерген диагностический. Аллерген вводят с соблюдением всех правил асептики строго внутривенно в объеме 0,2 мл в среднюю часть наружной поверхности уха. На месте инъекции должен образовываться плотный инфильтрат размером с горошину, который исчезает через 15-20 мин. Кожно-аллергическую реакцию учитывают через 6 или 24 ч, измеряя кутиметром зону инфильтрата и увеличение толщины кожной складки в месте введения аллергена по сравнению с нормой.

Оценку реакции проводят по трехбалльной шкале:

- (-) реакция отрицательная - отсутствие инфильтрата и гиперемии в месте введения препарата, утолщение кожной складки не более чем на 2 мм по сравнению с исходной;
- (±) реакция сомнительная - наличие инфильтрата до 10 мм в диаметре, гиперемия слабая или может отсутствовать, утолщение кожной складки до 3 мм;
- (+) реакция положительная - наличие инфильтрата и гиперемии диаметром свыше 10 мм, утолщение кожной складки на 3 мм и более.

При наличии положительной (+) реакции через 6 или 24 ч после инъекции животное признают больным и изолируют. Если через 6 или 24 ч после инъекции аллергена у животного регистрируют отрицательную реакцию, то его признают здоровым. При регистрации сомнительной (±) реакции через 24 ч аллерген вводят повторно в кожу другого уха. Если после повторного введения аллергена через 6 или 24 ч у животного регистрируют положительную или сомнительную реакцию, то его признают больным и изолируют.

ИФА для выявления специфических антител в сыворотке крови.

Этот метод используется за рубежом в качестве альтернативы пробы с антраксином у человека. В настоящее время диагностический набор для выявления специфических иммуноглобулинов классов М и G в сыворотке людей, позволяющий дифференцировать заболевание и ответ на вакцинацию, разработан у нас в стране. Он прошел комиссионные испытания, но пока не выпускается.

1.6.2.5. Молекулярно-генетические методы исследования.

Работу выполняют в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1794-03 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности".

Обеззараживание проб для исследования методом ПЦР.

Обеззараживание материала проводят согласно методическим указаниям МУ 3.5.5.1034-01 "Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности при работе методом ПЦР". Обработка включает два этапа: перевод спор в вегетативную форму и обработка лизирующим буфером, содержащим гуанидинтиоцианат. А) Герминация спор и обработка вегетативных форм *V. anthracis* пенициллином. Предварительно подготовленный нативный материал в количестве 0,1 мл

или одну бактериологическую петлю 18-часовой агаровой культуры подозрительных колоний засевают в стеклянные пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера рН 7,4 и инкубируют с аэрацией при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2,5 ч. После этого в пробирки добавляют пенициллин (до конечной концентрации 1000 ЕД/мл) и инкубируют с аэрацией 15 мин при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$. Затем прогревают при 100°C в течение 10 мин на водяной бане. Допускается прогревание проб, обработанных пенициллином, в твердотельном термостате при 100°C , для чего содержимое стеклянной пробирки переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5-1,7 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой. При необходимости перед прогреванием пробы могут быть сконцентрированы путем центрифугирования при 12000 об./мин в течение 15 мин, с последующим ресуспендированием осадка в 100 мкл 0,9%-го раствора хлорида натрия. Б) Обработка лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом. После прогревания при 100°C в течение 10 мин из пробирок отбирают по 0,1 мл материала и переносят в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с 300 мкл лизирующего раствора, содержащего 6 М гуанидинтиоцианата. Затем инкубируют при 65°C в течение 15 мин. Обработанные таким образом пробы считаются обеззараженными и всю последующую работу проводят как с незараженным материалом. Для проведения этого этапа и дальнейшего выделения ДНК используют коммерческие наборы, содержащие 6 М гуанидинтиоцианата или готовят необходимые реактивы самостоятельно.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК используют метод нуклеосорбции. Если применяются коммерческие наборы для выделения, то работу проводят в соответствии с инструкцией по применению препаратов. При использовании самостоятельно подготовленных реагентов работу осуществляют следующим образом. В пробирки после прогревания с лизирующим буфером при 65°C в течение 15 мин добавляют 25-30 мкл сорбента, который предварительно тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе. Пробирки инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин, перемешивая их на микроцентрифуге/встряхивателе каждые 2 мин, после чего центрифугируют при 8000-12000 об./мин в течение 30 с. Надосадочную жидкость удаляют, используя наконечник с аэрозольным барьером. К осадку добавляют 300 мкл раствора для первой отмывки ОР-1, перемешивают содержимое пробирки до гомогенного состояния и центрифугируют при 8000-12000 об./мин в течение 30 с. Супернатант удаляют, а к осадку добавляют 500 мкл раствора для второй отмывки ОР-2, перемешивают в течение 30 с и центрифугируют при аналогичных условиях. Отмывку ОР-2 повторяют ещё раз. После удаления надосадочной жидкости добавляют 400 мкл ацетона, тщательно перемешивают и центрифугируют при 8000-12000 об./мин в течение 30 с. Супернатант тщательно удаляют, а осадок высушивают при 65°C в течение 10 мин. После этого добавляют 30-50 мкл ТЕ-буфера и инкубируют при 65°C в течение 10 мин, перемешивая на микроцентрифуге/встряхивателе каждые 2 мин. Затем пробирки центрифугируют при 8000-12000 об./мин в течение 1 мин, супернатант используют для постановки ПЦР.

Проведение ПЦР для специфической индикации и идентификации *B. Anthracis*.

Для проведения реакции используют тест-системы для выявления ДНК *B. anthracis*, разрешенные к применению в установленном порядке, позволяющие проводить учет результатов методами электрофореза в агарозном геле или методом ПЦР в режиме реального времени, либо с флуоресцентной детекцией по "конечной точке". Работу проводят в соответствии с инструкциями к диагностическим тест-системам.

1.6.2.6. Идентификация культур.

Все выделенные культуры, подозрительные на принадлежность к *B. anthracis*, обязательно подвергают дальнейшему изучению биологических свойств, служащих критерием видовой идентификации, а при необходимости и целого ряда дополнительных свойств, являющихся основой для внутривидового типирования. В схеме представлены тесты идентификации и внутривидовой дифференциации сибиреязвенного микроба.

Тесты разделены на три группы. Тест группы I является ускоренным идентификационным и одновременно позволяющим дифференцировать штаммы по плазмидному составу. Метод ускоренной идентификации заключается в использовании ПЦР в мультиплексном варианте. Для этого может быть использована тест-система "АмплиСенс Bacillus anthracis - FRT" или другие разрешенные к применению в установленном порядке тест-системы с праймерами к плазмидным генам капсуло- и токсинообразования и специфическим хромосомным локусам сибиреязвенного микроба. Тесты группы II являются основными, из них тесты 1-6 служат опорными. Тесты группы III являются дополнительными методами изучения выделенных сибиреязвенных культур.

Основные идентификационные тесты (тесты группы II)

Морфология.

B. anthracis В мазках из 18-24-часовых бульонных и агаровых культур вегетативные клетки имеют форму палочек, расположенных длинными цепочками. Концы бацилл в окрашенных препаратах обрублены и вогнуты, отчего цепочка напоминает бамбуковую трость с коленчатыми сочленениями. По Граму бациллы сибирской язвы окрашиваются положительно. Споры имеют овальную форму, внутри бактериальной клетки образуется одна спора, располагающаяся центрально, не превышая диаметра тела микробной клетки. Размеры вегетативных клеток сибиреязвенного микроба 1-1,5x6-10 мкм, спор - 0,8-1x1,5 мкм. Морфологию спор определяют в культуре, полученной на плотной питательной среде при культивировании в течение 3-7 суток. Существует несколько способов окраски спор, основанных на том, чтобы сделать проницаемой для краски их плотную оболочку (Ауески, Пешкова, Циля-Нильсена). Для дифференциации от других грамположительных бацилл мазки окрашивают сибиреязвенными люминесцирующими сыворотками, ориентируясь при микроскопии на морфологию клеток и специфическое свечение (ярко-зеленая периферия и более темная сома клеток). Приготовленные мазки фиксируют в фиксирующей жидкости, содержащей перекись водорода.

Характер роста на плотных и в жидких питательных средах.

Характер роста на агаровых средах определяют визуально невооруженным глазом или через лупу, а также под микроскопом, для чего чашку помещают на столик микроскопа вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете при малом увеличении и с суженной диафрагмой. Оценивают колонии по их морфологии: величине, форме, виду, цвету, характеру поверхности и края, прозрачности, структуре, консистенции, а также по специфическому запаху. На МПА и агаре Хоттингера возбудитель сибирской язвы формирует крупные шероховатые матовые серые сухие колонии в R-форме, с "шагреновой" поверхностью, неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими при просмотре в микроскопе (малое увеличение) локоны волос или львиную гриву. Колонии сибиреязвенного микроба на плотных питательных средах отличаются от колоний спорообразующих сапрофитов меньшими размерами, большей шероховатостью и более выраженными "локонами" по периферии. Колония сибиреязвенного микроба с трудом берется бактериологической петлей, при этом за петлей поднимается тяж бактериальной массы. Агаровая культура сибиреязвенного микроба имеет специфический слегка ароматический запах. При использовании дифференциально-диагностической среды с натрия фенолфталеинфосфатом учитывают одновременно два важных диагностических признака - характер выросших колоний и тест на щелочную фосфатазу. В МПБ сибиреязвенный микроб растет в виде придонного "комочка ваты", бульон над которым остается прозрачным. "Комочек ваты" бульонной культуры *B. anthracis* с трудом разбивается при встряхивании, в отличие от подобного придонного роста некоторых представителей спорообразующих сапрофитов, легко разбивающегося и вызывающего помутнение среды.

Тест на подвижность.

Одним из наиболее постоянных для сибиреязвенного микроба признаков является

отсутствие подвижности, в отличие от большинства спорообразующих сапрофитов. Можно определить подвижность путем высева культуры уколом в столбик полужидкого (0,2-0,3%) агара. Посевы выдерживают в термостате при температуре (36 ± 1) °С в течение 18-20 ч. В полужидком агаре рост сибирезвеного микроба наблюдается только по следу укола, а окружающая среда остается прозрачной. Подвижные микробы дают диффузный рост. Простым методом определения подвижности является микроскопическое исследование в "висячей" или раздавленной капле, а также в камере Горяева 18-20-часовой бульонной культуры. Однако описаны и неподвижные варианты *V. cergeus* и других сапрофитов.

Обнаружение капсулы in vitro.

Обнаружение капсулы *in vitro* проводят посевом культур на 1% бикарбонатно-сывороточный агар или среду ГКИ. Инкубацию на 1%-м бикарбонатном агаре проводят при (36 ± 1) °С в анаэробных условиях при содержании 5-50% СО₂ или в эксикаторе с притертой крышкой. На дно эксикатора (на каждый литр объема) насыпают 0,4 г пищевой соды и наливают 0,35 мл концентрированной соляной кислоты или 2 г NaHCO₃ + 10 мл 20% H₂SO₄. После внесения чашек Петри с посевами эксикатор закрывают крышкой и слегка наклоняют, соединяя соду с кислотой. Просматривают посевы через 18-24 ч. Капсулообразующие культуры вырастают в виде крупных гладких блестящих слизистых колоний. В мазках, окрашенных после их фиксации одним из методов (по Ребигеру, капсульно-соматической сибирезвеной люминесцирующей сывороткой), видны цепочки палочек, окруженные хорошо выраженной капсулой. Пробирки со средой ГКИ с посевами закрывают стерильными резиновыми пробками и помещают в термостат при (36 ± 1) °С. Через 30-120 мин инкубирования у отдельных сибирезвеновых клеток начинается капсулообразование, а спустя 16-18 ч все или большинство сибирезвеновых клеток образуют капсулу. В мазках из посевов, окрашенных одним из описанных методов, видны длинные цепочки палочек, окруженных капсулой.

Обнаружение капсулы in vivo.

При вскрытии биопробных животных, которым введена исследуемая культура, делают мазки из перитонеального экссудата и крови сердца и мазки-отпечатки из органов. Мазки фиксируют и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой. В мазках от животных микробы расположены короткими цепочками, попарно или поодиночке, окружены розовой капсулой. Способность к капсулообразованию *in vivo* из всех представителей рода *Bacillus* присуща только возбудителю сибирской язвы. Встречающиеся в природе атипичные штаммы, не образующие капсулу, но по другим тестам соответствующие сибирезвеному микробу, требуют дополнительных исследований.

Чувствительность к сибирезвеным бактериофагам.

Сибирезвеновый микроб лизируется сибирезвеными фагами ("Гамма", "К", Fah-VНИИВВиМ и др.). Пробу с фагом ставят следующим образом. Свежеприготовленные чашки с агаром Хоттингера или МПА перед постановкой пробы подсушивают в термостате. Расчерчивают дно чашки снаружи на квадраты со стороной 2 см. Бактериологической петлей или пипеткой на каждый квадрат наносят каплю 5-6-часовой бульонной культуры сибирезвеного микроба. Чашку с приоткрытой крышкой подсушивают 30 мин в термостате, а затем в центр подсохшей капли наносят петлей каплю цельного сибирезвеного бактериофага. Результаты учитывают через 5-6 ч инкубации чашек при (36 ± 1) °С, просматривая их под малым увеличением микроскопа. В более поздние сроки через 12-24 ч просматривают чашки невооруженным глазом. В случае положительного результата на месте нанесения капли бактериофага наблюдается полное или частичное отсутствие роста в виде округлого просветления. Допускается постановка пробы с фагом методом стекающей капли в пробирках или чашках с агаром Хоттингера или МПА.

Тест на гемолиз.

Для проведения этого теста готовят МПА или агар Хоттингера (рН 7,2) с 3-5% дефибринированной крови барана. Посев испытуемых культур производят бактериологической петлей секторами и инкубируют в термостате при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч, после чего учитывают результат. В эти сроки сибирезвенный микроб не лизирует эритроциты барана в отличие от большинства родственных спорообразующих сапрофитов, образующих широкую зону гемолиза вокруг выросших колоний.

Тесты на чувствительность к пенициллину

Тест "жемчужного ожерелья". Перед постановкой пробы остуженный до 45°C 2% питательный агар разливают по 10 мл в 3 пробирки. В первую добавляют пенициллин из расчета 0,5 ЕД/мл, во вторую - 0,05 ЕД/мл, третья - без антибиотика - остается контрольной. Содержимое каждой пробирки выливают в чашку Петри. После застывания среды дно чашек снаружи размечают на квадраты или кружки, на которых пишут номера анализа. На обозначенные участки наносят по одной капле изучаемых 3-6-часовых бульонных культур. На одной чашке может быть поставлено до 10 проб. Посевы инкубируют при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$. Не позже 3 ч просматривают рост под микроскопом с иммерсионным объективом, предварительно накрыв каждый отмеченный участок покровным стеклом. На среде, содержащей пенициллин, видны шарообразной формы бактериальные клетки сибирезвенного микроба, расположенных в виде цепочек, напоминающих ожерелье из жемчуга. Спорообразующие сапрофиты, как правило, устойчивые к пенициллину, имеют обычную бациллярную форму. В контрольной среде без пенициллина сибирезвенный микроб формирует длинные цепи палочек.

Модификация теста "жемчужного ожерелья". К бульону Хоттингера (рН 7,2) добавляют стерильно 20% инактивированной лошадиной сыворотки, 0,05 и 0,5 ЕД/мл пенициллина. Среды разливают с соблюдением стерильности в пробирки по 2-3 мл и засевают по 2 капли бульонной или петлю агаровой культуры, взятой для исследования. Пробирки с посевами инкубируют не более 3 ч при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$. Затем делают мазки, фиксируют их, и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой.

Определение чувствительности к пенициллину дискодиффузионным методом. Из колоний суточных агаровых культур готовят взвесь микробов на 0,9% растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма до ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Эту взвесь в объеме 0,3 мл наносят на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона или агара Гивенталья-Ведьминой (АГВ) и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для впитывания жидкости. Затем на поверхность засеянной питательной среды пинцетом накладывают коммерческий диск с 10 мкг пенициллина. Посевы выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув чашки вверх дном, инкубируют при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч (не более). Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывают. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе. Типичные штаммы сибирезвенного микроба, чувствительные к пенициллину, характеризуются зоной задержки роста 26 мм и больше, близкородственные сапрофиты - 16 мм и меньше.

Дополнительные методы изучения выделенных культур *B. anthracis* (тесты группы III)

Определение чувствительности сибирезвенного микроба к антибиотикам.

Большинство природных штаммов *B. anthracis* чувствительно ко многим используемым в практике антибиотикам. Однако встречаются и природные изоляты, которые в той или иной степени устойчивы к различным антибиотикам, что затрудняет проведение лечебных мероприятий в случае заражения таким штаммом. Определение чувствительности штаммов сибирезвенного микроба, выделенных от больных, является необходимой мерой для выбора наиболее эффективного препарата для лечения тяжелых форм сибирской язвы. Для определения чувствительности *B. anthracis* к

антибактериальным препаратам можно использовать метод серийных разведений антибиотиков или дискодиффузный метод. При определении чувствительности сибиреязвенного микроба с помощью ДДМ используют типичные колонии из 16-18-часовых агаровых культур. Из выросших колоний готовят взвесь микробов в 0,9%-м растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма до ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Эту взвесь в объеме 0,3 мл наносят на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона или АГВ и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для впитывания жидкости. Диски накладывают пинцетом на поверхность засеянной питательной среды на одинаковом расстоянии один от другого, отступив около 2 см от стенки чашки (не более 4 дисков), выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув их вверх дном, инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 18-20 ч (не более). Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывают. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе. Для метода серийных разведений используют суспензию той же концентрации микробных клеток, нанося ее небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки с тонким концом на агаровые пластинки среды Мюллера-Хинтона или АГВ с разными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная с чашек с минимальным содержанием антибиотиков. Посевы инкубируют 18-24 ч при температуре (36 ± 1) °С. С помощью штампа-репликатора можно одновременно изучить антибиотограммы 50 культур, что значительно экономит средства и время. Чувствительность/устойчивость культур определяют по минимальной подавляющей концентрации (МПК, мг/л или мкг/мл) препарата, угнетающей рост возбудителя на среде культивирования. Интерпретация результатов Интерпретацию результатов проводят путем их сопоставления с пограничными значениями МПК и диаметров зон подавления роста возбудителя. В таблице даны пограничные значения МПК и зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур. Между этими показателями находятся значения для культур с промежуточной устойчивостью. Необходимо учитывать результаты определения МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов *V. anthracis* СТИ и *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 на данной серии питательной среды. Изменения МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов, выходящие за пределы допустимых значений, могут свидетельствовать о несоответствии качества сред или дисков с антибактериальными препаратами и потребовать их замены. Увеличение МПК для исследуемых штаммов, по сравнению с контрольным штаммом *V. anthracis* СТИ, может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости культур, что требует изменения схемы терапии данным антибиотиком или использования для лечения и профилактики другого, более эффективного антибактериального препарата. В паспорте штамма должны быть указаны значения МПК и диаметры зон подавления роста для всех исследованных препаратов с интерпретацией результатов исследования: культура чувствительна, устойчива или имеет промежуточную устойчивость.

Метод определения гемолитической и протеолитической активности.

Определение проводят в соответствии с методическими рекомендациями "Определение гемолитической активности у сибиреязвенного микроба" (М., 1989). С этой целью готовят двухслойный агар, используя в качестве первого слоя 1% агар Дифко на 0,9%-м растворе хлорида натрия, который разливают в чашки Петри по 20 мл. Для второго слоя готовят 0,7%-й агар на 0,9%-м растворе хлорида натрия, в который после охлаждения вносят следующие ингредиенты: для проверки гемолитической активности - 6% трижды стерильно отмытых в 0,9%-м растворе хлорида натрия эритроцитов барана; для определения протеолитической активности - желатин, казеин, бычий сывороточный альбумин и гемоглобин в концентрации 0,4%. После полного застывания верхнего слоя в агаровых пластинках пробойником делают по 6-7 лунок в каждой чашке, дно которых

заливают каплей расплавленного 1% агара. В лунки вносят по 0,1 мл 2-суточной бульонной культуры изучаемых штаммов. Учет производят через 48 ч инкубации при температуре (36 ± 1) °С для выявления гемолитической и через 24 ч - при выявлении протеолитической активности. В последнем случае перед просмотром поверхность агара обрабатывают 20% раствором трихлоруксусной кислоты. Положительные результаты соответствуют обнаружению зон просветления в агаре вокруг лунок с культурой.

Тест на лецитиназу

Наличие или отсутствие лецитиназной активности определяют в жидкой желточной среде или на агаре Хоттингера, в который добавлен стерильно желток куриного яйца. В пробирки с 5 мл жидкой желточной среды (прилож.1.5) засевают петлей суточную культуру и инкубируют в термостате при (36 ± 1) °С. Возбудитель сибирской язвы, как правило, в течение нескольких суток инкубирования не свертывает желток, в то время как представители спорообразующих сапрофитов свертывают желток уже в первые сутки. На плотной питательной среде вокруг колоний сибиреязвенного микроба не формируются зоны ферментации желтка, в то время как вокруг колоний большинства сапрофитов, вырабатывающих активную лецитиназу, просматривается широкая беловатая непрозрачная зона.

Определение способности к росту на минимальной питательной среде.

Споры изучаемых штаммов засевают на среду "9 АТ" и выращивают в течение 24-48 ч при температуре (36 ± 1) °С. Для контроля засевают на эту среду споры *B. anthracis* 81/1. Если исследуемые штаммы не растут на этой среде через 48 ч, то их можно считать нуждающимися в дополнительных факторах роста.

Дифференциация культур сибиреязвенного микроба по вирулентности in vitro.

Предлагаемый метод дифференциации культур сибиреязвенного микроба по вирулентности *in vitro* основан на объективной регистрации различий в продукции разными культурами капсулы и экзотоксина при культивировании на агаре Хоттингера в воздушной атмосфере и на среде "СОПЭК" в атмосфере, обогащенной СО. Капсулообразование регистрируется по характерному росту на плотных средах в виде гладких слизистых колоний, в мазках из которых при микроскопии обнаруживаются капсульные бациллы. Учет токсинообразования ведется по визуально наблюдаемым концентрическим ореолам иммунопреципитации в среде вокруг колоний, продуцирующих токсин. Иммунопреципитация в данном методе является следствием взаимодействия антитоксических антител противосибиреязвенного глобулина, введенного в состав среды, и диффундирующих в среду компонентов токсина, который синтезируется сибиреязвенным микробом при культивировании на среде в атмосфере с повышенным содержанием СО. Все это позволяет дифференцировать культуры с обычной, то есть СО-зависимой, СО-независимой продукцией капсулы, бескапсульные, продуцирующие и не продуцирующие токсин. Среди них выделяют пять групп, в зависимости от характера экспрессии капсулы и токсина, которым соответствуют следующие степени патогенности: высоковирулентные, умеренно вирулентные, слабовирулентные, авирулентные и апатогенные. Для исследования готовят суспензию спор или вегетативных клеток из суточных агаровых культур по ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Взвесь наносят петлей бляшками диаметром 3-4 мм от 10 до 50 инокулятов параллельно на одну чашку со средой СОПЭК и одну чашку с агаром Хоттингера. Для контроля качества среды засевают культуру типичного по капсуло- и токсинообразованию тест-штамма 81/1, любого бесплазмидного штамма, а также штамма с СО-независимой продукцией капсулы. Чашки со средой "СОПЭК" помещают в микроанаэростат или СО-инкубатор. Из микроанаэростата вакуумным насосом откачивают 25% воздуха, ориентируясь на показания мановакуумметра, и замещают его углекислым газом из баллона. В СО-инкубаторе чашки культивируют с 10% углекислого газа. Посевы на среде "СОПЭК" выращивают при температуре (36 ± 1) °С в течение 48 ч, затем переносят чашки из микроанаэростата или СО-инкубатора в холодильники выдерживают в течение 1-3 сут.

при 4-0 °С. Чашки с агаром Хоттингера инкубируют при (36±1)°С в обычной воздушной атмосфере в течение 24 ч. По окончании указанных сроков инкубации (24 ч для агара Хоттингера и 48 ч для среды "СОПЭК") просматривают чашки, регистрируя морфологию колоний. Продуцирующие капсулу культуры формируют колонии в SM-форме - округлые, гладкие, блестящие, со слизистым капсульным веществом на поверхности. Не продуцирующие капсулу культуры растут в R-форме в виде шероховатых, с волокнистым краем матовых колоний. Для подтверждения факта образования капсулы из колоний делают мазки для микроскопии, которые окрашивают раствором Ребигера в течение 15-20 с, промывают и высушивают. Капсула окрашивается в розовый цвет или остается неокрашенной, бактерии - в темно-фиолетовый. По истечении 48 ч после начала инкубации чашки со средой "СОПЭК" просматривают при естественном освещении на черном фоне и отмечают предварительные результаты, пользуясь для этого листом черной бумаги. Вокруг колоний продуцирующих токсин в среде формируются концентрические ореолы иммунопреципитации в виде белых тонких колец. Колонии не продуцирующие токсин лишены таких ореолов. После выдерживания посевов на среде "СОПЭК" в холодильнике в течение 1-3 сут. их просматривают повторно и проводят окончательный учет результатов.

Интерпретация результатов.

Культуры относят к высоковирулентным, если они продуцируют капсулу и токсин в атмосфере СО и не продуцируют капсулу на воздухе; умеренно вирулентным, если они не продуцируют токсин, продуцируют капсулу в атмосфере СО и не продуцируют ее на воздухе; слабовирулентным, если они не продуцируют токсин и продуцируют капсулу в атмосфере СО и на воздухе; авирулентным, если они продуцируют токсин, но не продуцируют капсулу; апатогенным, если они не продуцируют ни капсулу, ни токсин.

Определение вирулентности выделенных культур in vivo.

Вирулентность выделенных культур сибиреязвенного микроба определяют двумя методами: вычислением DCL или LD . Для заражения животных используют спорую взвесь, которую готовят следующим образом. Сибиреязвенную культуру отсеивают на специальные питательные среды для образования спор: агар Гладстона, голодный пшеничный или гороховый агар и инкубируют в течение 1 сут. при (36±1) °С, а затем в течение 4-6 сут. при (34±1) °С. Споры *B. anthracis* можно получить также высевом на агар Хоттингера, содержащий 60% аминного азота (рН - 7,2) в течение 4 сут. при 37 °С. Процесс спорообразования контролируют просмотром мазков, окрашенных по Ребигеру. При наличии 95-100% спор культуру смывают дистиллированной водой и суспензию помещают на 2-3 сут. в холодильник для лизиса оставшихся вегетативных палочек. Для определения концентрации спор готовят десятикратные разведения полученной взвеси с использованием в качестве разводящей жидкости 0,10-0,05% раствор Твина-80 на дистиллированной воде и делают высев в объеме 0,1 мл из пробирок с разведениями 10 и 10 на 3 чашки (каждое разведение) с агаром Хоттингера. Посевы инкубируют при (36±1)°С в течение 18-20 ч. На следующий день подсчитывают выросшие колонии и соответственно вычисляют концентрацию спор в исходной взвеси, затем готовят для заражения соответствующие разведения на 0,9% растворе хлорида натрия. Для определения LD чаще всего используют белых беспородных мышей весом 18-20 г. Споры в взвеси, содержащие 1, 10, 100, 1000 и 10000 спор, вводят подкожно в объеме 0,5 мл, используя 4-6 животных на каждую дозу. За зараженными животными наблюдают в течение 10 сут., отмечают в каждой группе павших от сибиреязвенной инфекции животных. Статистическую обработку полученных результатов проводят по методу Рида и Менча или Кербера. Для определения DCL используют морских свинок, кроликов и три заражающие дозы - 100, 1000 и 10000 спор. Каждой дозой инфицируют не менее трех животных. Наблюдение за ними проводят до 10 суток. Из органов павших животных делают мазки-отпечатки для бактериоскопии и посевы на соответствующие питательные среды для установления специфичности гибели животных. Культуры возбудителя

сибирской язвы считаются вирулентными, если значение LD для белых мышей и морских свинок или DCL для кроликов не превышают 10000 спор.

Идентификация штаммов сибиреязвенного микроба с атипичным капсулообразованием.

Из всех выросших колоний, не изменивших своего цвета при обработке парами аммиака, как шероховатых (I, III тип), так и гладких слизистых (II тип), делают мазки и окрашивают их по Ребигеру или сибиреязвенными соматической, капсульно-соматической люминесцирующими сыворотками. Для дальнейшего исследования отбирают колонии, в мазках из которых выявляются палочки, расположенные длинными цепочками с типичной морфологией. Палочки из колоний II типа могут быть окружены капсулой, окрашенной в розовый цвет при окраске по Ребигеру, или светиться на 3⁺, 4⁺ при окраске капсульно-соматической люминесцирующей сывороткой. Из отобранных колоний делают пересевы в пробирки с МПБ и на чашки с 1%-м бикарбонатно-сывороточным агаром. Последние выращивают при 5-50% CO₂, как уже описано выше. Результаты учитывают через 24 ч инкубации при (36±1) °С. В бульоне отмечают придонный рост в виде "комочка ваты" с сохранением прозрачности над ним, характерный для штаммов I и III типа. Штаммы II типа вызывают диффузное помутнение среды. На 1%-м бикарбонатно-сывороточном агаре штаммы I и II типа растут в SM-форме в виде крупных слизистых колоний. Из колоний делают мазки с последующей их окраской на наличие капсулы. В мазках обнаруживают палочки, окруженные капсулой. Штаммы III типа растут на этой среде в R-форме, капсула в мазках не обнаруживается. Из культур на 1% бикарбонатно-сывороточном агаре готовят взвесь микробов в 0,9%-м растворе натрия хлорида, которой заражают белых мышей подкожно в объеме 0,5 мл во внутреннюю поверхность бедра. Павших мышей вскрывают, отмечают характерную патологоанатомическую картину, делают мазки-отпечатки и высевы из органов и места введения. Выживших мышей забивают на 10 сут. и исследуют аналогично. В мазках-отпечатках от мышей, павших после заражения штаммами I и II типа, обнаруживаются капсульные клетки сибиреязвенного микроба и обильный рост микроба на питательных средах из всех органов и места введения. В мазках от мышей, зараженных штаммами III типа, клетки микроба наблюдаются редко, в основном из места введения, и они лишены капсулы, а из органов и места введения вырастают единичные колонии в R-форме. В месте введения культур штаммов сибиреязвенного микроба I и III типов на 2-3 сут. развивается специфический студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки, формирующийся под действием отечной фракции сибиреязвенного экзотоксина. Дальнейшая идентификация выделенных культур атипичных штаммов проводится по методам, описанным выше.

Определение MLVA-генотипа штаммов сибиреязвенного микроба.

Определение MLVA-генотипа культур сибиреязвенного микроба целесообразно проводить по схеме и с использованием метода, описанного Р. Keim et al. (2000). Такое генетическое типирование позволяет дифференцировать штаммы, установить их происхождение, осуществлять мониторинг в процессе эпидемиологического анализа вспышки. Исследование проводится в референс-лабораториях. Временной график лабораторных исследований на сибирскую язву приведен в приложение 1.

1.6.3. Выдача заключений по результатам лабораторного исследования на сибирскую язву

После проведения соответствующих этапов лабораторного исследования на сибирскую язву в определенные сроки можно давать следующие заключения о его результатах. В расчетные сроки не включено время, необходимое для подготовки проб (разбор проб и предварительная очистка, фильтрование, разведение или концентрирование материала, разделение на аликвоты).

1.6.3.1. Предварительные результаты специфической индикации

При исследовании патологического материала от людей и животных.

- через 2-6 ч, по результатам микроскопии и МФА с капсульно-соматической люминесцирующей сывороткой;
- через 8-12 ч, по результатам ПЦР;
- через 2-6 ч, по результатам реакции преципитации по Асколи.

При исследовании секционного материала от трупов людей и животных, а также кож, шкур, шерсти, мяса и мясопродуктов;

- через 2-6 ч, по результатам реакции преципитации по Асколи;
- через 2-6 ч, по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 8-12 ч, по результатам ПЦР.

При исследовании материала из объектов внешней среды:

- через 2-6 ч, по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 2-6 ч, по результатам РНГА;
- через 8-12 ч, по результатам ПЦР.

1.6.3.2. Окончательные результаты специфической индикации.

При исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 48 ч на основании результатов:

- ПЦР с материалом из типичных колоний;
- МФА при окраске люминесцирующей соматической сибирезвенной сывороткой культуры из типичных колоний.

1.6.3.3. Окончательные результаты полного лабораторного анализа.

При исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 2-10 сут. на основании:

- морфологии колоний на питательных средах, в том числе и дифференциально-диагностической, и характера роста в МПБ;
- морфологии в мазках из выросших подозрительных колоний, МПБ;
- патолого-анатомической картины у забитых на 2-3 сутки или павших белых мышей, обнаружения капсулы в мазках-отпечатках из органов биопробных животных и морфологии колоний при посеве органов на питательном агаре;
- характера роста колоний на 1% бикарбонатно-сывороточном агаре и морфологии клеток в мазках, приготовленных из колоний или взвеси микробов, выросших на жидкой среде ГКИ;
- результатов теста с сибирезвенным бактериофагом;
- результатов теста на щелочную фосфатазу;
- результатов теста на гемолиз на агаре с дефибринированной кровью барана;
- результатов теста на лецитиназу;
- результатов теста на подвижность;
- результатов теста "жемчужного ожерелья";
- результатов аллергической реакции с антраксином (через 24 и 48 ч);
- результатов МФА (непрямой метод) с сывороткой больного.

1.6.3.4. Диагноз сибирской язвы.

Диагноз сибирской язвы у человека считают установленным при наличии соответствующей клинической картины, эпидемиологического анамнеза, подтвержденных одним из нижеперечисленных способов:

- выделение из патологического материала культуры *B. anthracis*, гибель хотя бы одного зараженного лабораторного животного и выделение из его органов культуры со свойствами, характерными для возбудителя сибирской язвы;
- выделение вирулентной культуры *B. anthracis* из предполагаемого источника или фактора передачи;
- положительная антраксиновая проба.

Если по прошествию 72 ч положительные результаты не получены, окончательное отрицательное заключение может быть сделано не ранее 10 сут. после заражения биопробных животных (отрицательной биопробы).

2. ТУБЕРКУЛЕЗ

(лат., англ. – **Tuberculosis**; фр. – **Tuberculose**; нем. – **Tuberkulose**)

Одной из наиболее сложных проблем инфекционной патологии является туберкулез, экономический ущерб от которого в РФ за последние 40 лет составил около 84,9 млрд руб.. Ежегодно в стране регистрируют сотни неблагополучных пунктов по туберкулезу на более чем 40 территориях, где болеет до 20-30 тыс. голов скота.

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.

Туберкулез известен с глубокой древности. Подтверждением этого являются археологические находки: туберкулезной поражение позвонков было найдено у египетских мумий. Греки называли это заболевание – «phtisis», что переводится как «истощение», «чахотка». От этого слова происходит и современное название науки, изучающей туберкулез – фтизиатрия, а специалисты, изучающие туберкулез, называются фтизиатрами.

Признаки болезни у человека описаны Гиппократом в IV веке до нашей эры. Термин «туберкулез» впервые употребил французский врач Лаэннек (1819), заразность болезни доказал Ж.А. Вильмен (1865). Возбудитель туберкулеза был открыт Робертом Кохом в 1882г, за что он был удостоен Нобелевской премии. Он же впервые изготовил (1890) аллерген – туберкулин. В 1907 г детский врач из Вены (Австрия) Клеменс Пирке (1874-1929), предложил кожную пробу с туберкулином для выявления инфицированных. Он ввел понятие об аллергии и явился основоположником туберкулинодиагностики. В 1919 г. французские ученые Кальметт (*Calmett*) и Герен (*Guerin*) создали вакцинный штамм микобактерии туберкулеза для противотуберкулезной вакцинации людей.

Туберкулез животных распространен во многих регионах мира, лишь в развитых странах Европы и Северной Америки он почти ликвидирован. Степень опасности туберкулеза для человека возрастает: в конце XX начале XXI вв. мировая эпидемическая и эпизоотическая ситуация по туберкулезу значительно ухудшилась.

2.1 Этиология

Возбудитель туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis*. Род микобактерии включает более 30 различных видов патогенных и непатогенных микроорганизмов. В связи с чем микобактерии характеризуются полипатогенностью. Заболевание туберкулезом вызывают 3 патогенных вида:

1) *Mycobacterium tuberculosis* (человеческий вид) вызывает заболевание у человека. К нему восприимчивы также свиньи, кошки, собаки, рогатый скот, пушные звери, а птицы (кроме попугаев) не восприимчивы;

2) *Mycobacterium bovis* (бычий вид) вызывает заболевание у всех видов сельскохозяйственных, диких животных, в том числе пушных зверей, а также человека. Птицы не восприимчивы;

3) *Mycobacterium avium* (птичий вид) вызывает заболевание домашних и диких птиц, восприимчивы также свиньи; животные других видов и человек заражаются редко.

По морфологии и культуральным свойствам микобактерии перечисленных видов во многом сходны между собой. Это тонкие прямые, чаще слегка изогнутые палочки длиной 0,8-5,5 мкм, располагающиеся в мазках одиночно или группами. Микобактерии – строгие аэробы, неподвижные, спор не образуют, кислотостойкие;

окрашиваются по методу Циля-Нельсена в ярко-красный цвет, тогда как другая микрофлора – в синий цвет. Культивируются на глицериновых МПА, МПБ, яичных и синтетических средах. Растут микобактерии человеческого вида 20-30 сут., бычьего вида – 20-60 сут., птичьего вида – 10-20 суток. При отсутствии роста посевы рекомендуется выдерживать в термостате в течение 3 мес. Видовую принадлежность возбудителя туберкулеза определяют по особенностям роста их на искусственных питательных средах и патогенности отдельных видов возбудителя туберкулеза для лабораторных животных различных видов.

Микобактерии весьма устойчивы к воздействиям химических веществ и различных факторов внешней среды. *M. bovis* в почве и в навозе сохраняет жизнеспособность до 4 лет, *M. avium* – до 10 лет и более. В продуктах, полученных от больных животных, возбудитель туберкулеза сохраняется: в молоке до 19 сут., в масле до 300 сут., в сыре 145-200 сут., в мясе замороженном до 1 года, в соленом мясе 60 суток. В трупах крупного рогатого скота и птиц микобактерий сохраняются от 3–6 до 12 месяцев. По данным различных авторов, во влажном состоянии микобактерия туберкулеза погибает при 50°C через 12 ч, при 60°C через 1 ч, при 70 °C через 30 мин, при 90 °C через 1 мин, при 100°C мгновенно. Лучшими дезинфицирующими средствами являются 3%-ный щелочной раствор формальдегид (экспозиция 1 ч), взвесь хлорной извести, содержащая 5 % активного хлора, 10%-ный раствор однохлористого йода, 20%-ная взвесь свежегашеной извести (гидроксид кальция), 5%-ный раствор гипохлорида кальция, 1%-ный раствор глутарового альдегида и другие препараты.

В природе кроме туберкулезных существуют условно-патогенные атипичные и сапрофитные микобактерий. Животные, инфицированные ими, могут реагировать на туберкулин для млекопитающих, что вызывает трудности при аллергической диагностике туберкулеза.

2.2 Эпизоотология

К туберкулезу восприимчивы многие виды домашних и диких животных, в том числе пушные звери и птицы (более 55 видов млекопитающих животных и около 50 видов птиц). При этом инфекционная цепь возбудителя может быть как гомогенно-гомогенной, так и гомогенно-гетерогенной (больное животное – здоровый человек или больной человек – здоровое животное, а также между разными видами животных). Более чувствительны к туберкулезу крупный рогатый скот, свиньи, из птиц – куры. Реже заболевают собаки, кошки, утки, гуси, как исключение – лошади, овцы, ослы.

Источник возбудителя инфекции – больные животные, выделяющие микобактерии с фекалиями, мокротой, молоком, а при поражении мочеполовых путей – со спермой. Возбудитель туберкулеза длительное время может сохраняться в организме в виде L-форм. Такие животные часто остаются невыявленными источниками возбудителя туберкулеза. В неблагоприятных условиях L-формы микобактерии могут реверсировать в исходный вид (в классическую форму микобактерии) и становятся причиной возникновения туберкулеза.

Факторами передачи возбудителя туберкулеза могут быть загрязненные выделениями больных животных корма, вода, пастбища, подстилка, навоз и др. Молодняк заражается в основном через молоко и обрат, полученные от больных животных. Возможно внутриутробное заражение телят. Животные могут заразиться при контакте с людьми, больными туберкулезом, особенно доярками и телятницами. Взрослый крупный рогатый скот в стойловый период заражается в основном аэрогенным путем, на пастбищах – алиментарным; свиньи – алиментарно при скармливании им необеззараженных кухонных отходов из больниц, туберкулезных диспансеров или при контакте с больной птицей. Собаки, кошки – от больных людей или при поедании молока, мяса от больных коров.

Массовому распространению туберкулеза на фермах способствуют факторы, снижающие резистентность организма животных. К ним относятся: неполноценное

кормление, усиленная продукция молока без компенсации необходимых жизненно важных для организма микроэлементов, витаминов, аминокислот; отсутствие регулярного движения на свежем воздухе, теснота и сырость в помещениях, антисанитарные условия содержания животных.

Люди, зараженные *T. bovis*, представляют большую опасность для животных как источник возбудителя инфекции. Чаще этот туберкулез протекает в легкой форме. Человек чаще всего заражается через сырое молоко и молочные продукты, однако доказана возможность заражения от животных и через воздух – аэрогенным путем.

2.3 Клинические признаки

Туберкулез обычно протекает хронически и нередко без ярко видимых признаков. Положительная реакция на ППД-туберкулин у животных возникает на 14-40 дни после их заражения. Больных животных выявляют в основном аллергическими и серологическими исследованиями.

Длительность инкубационного периода при туберкулезе колеблется от 2 до 6 нед. Туберкулез у животных протекает хронически или латентно, поэтому клинические признаки болезни могут появляться через несколько месяцев или лет после инфицирования. Заразившихся туберкулезом животных выявляют в основном аллергическими и серологическими методами исследования. Туберкулезные поражения обычно обнаруживают лишь при послеубойном осмотре органов, а появление клинически выраженных форм свидетельствует о длительном течении болезни. Клинические признаки туберкулеза весьма разнообразны даже у одного и того же животного. По месту локализации патологического процесса различают легочную, кишечную формы туберкулеза; встречаются также поражения вымени, серозных покровов (жемчужница), генитальная форма и генерализованный туберкулез.

У крупного рогатого скота при туберкулезе чаще поражаются легкие и туберкулезный процесс протекает хронически, у молодых животных — остро и подостро. Для туберкулеза легких характерен сильный сухой кашель, усиливающийся при вставании животного или вдыхании холодного воздуха; температура может повышаться до 39,5-40°C. Аппетит и продуктивность в начальном периоде не понижены. При прогрессировании болезни проявляются признаки воспаления легких и плевры. Кашель становится болезненным, дыхание затрудненное и сопровождается стоном. В грудной клетке прослушивают хрипы, при перкуссии – участки притупления.

Поражение молочной железы характеризуется увеличением надвыменных лимфатических узлов, которые становятся плотными, бугристыми, малоподвижными. При доении выделяется водянистое молоко с примесью крови или творожистой массы. При поражении половых органов у коров отмечают усиление половой охоты, яловость, у быков – орхиты. При генерализованном туберкулезе поверхностно расположенные лимфатические узлы (нижнечелюстные, заглоточные, надвыменные, коленной складки) увеличиваются и становятся бугристыми.

У свиней протекает бессимптомно. Иногда наблюдается увеличение нижнечелюстных и заглоточных лимфатических узлов. При обширных поражениях легких возникают кашель, рвота, затрудненное дыхание.

Овцы туберкулезом болеют очень редко, козы – несколько чаще, но те и другие бессимптомно. При сильно выраженном процессе клинические признаки у коз сходны с таковыми у крупного рогатого скота.

У лошадей заболевание регистрируется редко, преимущественно в хозяйствах, где крупный рогатый скот неблагополучен по туберкулезу. При поражении легких отмечают слабый кашель, быстрая утомляемость; при кишечной форме – колики, диарея, сменяющаяся запорами, полиурия.

У птиц (чаще кур, гусей, уток, индеек) туберкулез протекает хронически с неясными клиническими признаками. Больные куры малоподвижны, быстро худеют. Гребень и сережки побледневшие, сморщенные, происходит атрофия грудных мышц.

Возможна длительная изнуряющая диарея. Птицы погибают от истощения.

У пушных зверей (лисицы, норки, нутрии) туберкулезом чаще поражается молодняк. У больных отмечают слабость, истощение; при поражении легких – кашель, одышку; при кишечной форме – профузную диарею.

Клинические признаки болезни у собак и кошек малохарактерны, наблюдается исхудание, а при поражении легких – затрудненное дыхание, кашель. Смерть наступает вследствие полного истощения.

2.4 Патологоанатомические исследования

Для туберкулеза характерно наличие в разных органах и тканях животного специфических узелков (туберкулов) величиной от просыаного зерна до куриного яйца и более.

У длительно больного туберкулезом крупного рогатого скота лимфатические узлы грудной полости поражаются в 100 % случаев, легкие – в 99, кишечник – в 10 %, другие органы и ткани – реже. Характерны также каверны в легких, образующиеся при распаде казеозных масс и при расширении крупных бронхов. Бронхиальные и средостенные лимфатические узлы увеличены, плотные, пронизаны туберкулезными узелками. При туберкулезе кишечника на слизистой оболочке обнаруживают серо-желтые бугорки или язвы округлой, овальной формы с валикообразно приподнятыми краями. Мезентериальные лимфатические узлы увеличены, уплотнены, с признаками творожистого перерождения.

У птиц туберкулезные поражения чаще обнаруживаются в печени и селезенке, которые обычно резко увеличены, дряблой консистенции, содержат многочисленные туберкулы.

2.5 Туберкулез у человека

Человек восприимчив преимущественно к двум типам: *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis*. Болезнь характеризуется развитием клеточной аллергии, полиморфной клинической картиной и образованием специфических гранулём в различных тканях и органах. Туберкулезная палочка может вызывать поражение не только органов дыхания (легких, бронхов, гортани), но и кишечника, мочеполовых органов, надпочечников, кожи, костей, суставов и прочих, однако в подавляющем большинстве случаев (80—90%) наблюдается поражение легких.

2.6 Лабораторная диагностика

Лабораторную диагностику туберкулеза осуществляют на основании ГОСТ 26072-89 (СТ СЭВ 3457-81) «Животные и птица сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики туберкулеза», утвержденных и введенных в действие постановлением Государственного комитета СССР по стандартам №2319 от 04.07.1989.

Диагноз на туберкулез у животных устанавливают на основании патологоанатомических, бактериологических, включая биологическую пробу, и аллергических методов лабораторной диагностики с учетом эпизоотологических данных и клинических признаков болезни.

Лабораторные исследования на туберкулез проводят в срок не более 90 дней, идентификацию культуры - в срок не более 90 дней после ее выделения.

2.6.1 Отбор проб

2.6.1.1 Пробу для проведения анализов отбирают от каждого животного в отдельности.

2.6.1.2 Для анализа отбирают пробы лимфатических узлов млекопитающих: заглоточные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные; лимфатические узлы, взятые в области илеоцекального соединения и подвздошной кишки, упаковывают отдельно от остальных лимфатических узлов. Портальные, предлопаточные, надвыменные, поверхностные паховые лимфатические узлы и внутренние органы (легкие, печень, почки) направляют только при наличии изменений, подозрительных на

туберкулез.

Парные лимфатические узлы вырезают с обеих сторон туши, указав их название на этикетке, которую помещают вместе с пробой. Тушки (трупы) птиц для исследования направляют в лабораторию целиком.

2.6.1.3 Пробы патологического материала, отобранные для бактериоскопического, бактериологического и биологического анализов, доставляют в лабораторию в свежем или замороженном виде. Допускается консервировать пробы в 30%-ном водном растворе химически чистого глицерина.

Пробы хранят до окончания лабораторного исследования.

2.6.2 Метод бактериологического анализа нативного материала

Сущность метода заключается в выявлении микобактерий туберкулеза путем бактериоскопии мазков из нативного материала.

2.6.2.1 Подготовка к анализу.

Мазки патологического материала готовят, используя чистые обезжиренные предметные стекла. Готовят по два мазка - из каждого органа и лимфатического узла. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем и окрашивают по Циль-Нильсену.

Для окрашивания мазков по Циль-Нильсену на фиксированный мазок кладут кусочек фильтровальной бумаги, наливают на нее карболовый раствор фуксина Циля и нагревают до момента появления паров (два-три раза) в течение 5 мин, но не доводя краситель до кипения, раствор краски при этом каждый раз добавляют. Дают препарату остыть, удаляют пинцетом бумагу, сливают избыток красителя и препарат промывают водой. Мазок обесцвечивают 3%-ным раствором солянокислого спирта до достижения слабозаметного розового оттенка. После обесцвечивания препарат тщательно промывают водой и окрашивают метиленовой синькой Леффлера в течение 3-5 мин. Краску смывают, мазок промывают водой и высушивают на воздухе.

2.6.2.3. Проведение анализа.

Мазки просматривают под микроскопом. При отсутствии микобактерий просматривают в каждом мазке не менее 50 полей зрения.

2.6.2.4. Обработка результатов.

Для микобактерий туберкулеза характерны тонкие, прямые или изогнутые красные палочки различной длины, часто зернистые. Они располагаются небольшими скоплениями или единичны.

2.6.3 Метод бактериологического анализа патологического материала

Сущность метода заключается в выделении культур микобактерий туберкулеза и определении скорости роста и характера бактерий.

2.6.3.1. Подготовка к анализу.

Для посева на питательные среды патологический материал подвергают предварительной обработке, гомогенизируя и подвергая воздействию для уничтожения сопутствующей микрофлоры. Предварительная обработка должна быть щадящей для микобактерий туберкулеза.

Из каждого доставленного лимфатического узла вырезают кусочки размером 0,5 см на границе здоровой и измененной ткани. Общая масса лимфоузлов для исследования составляет около 6-10 г. Брыжеечные лимфатические узлы, взятые в области илеоцекального соединения и подвздошной кишки обрабатывают и высевают отдельно от других лимфатических узлов.

Кусочки органов и тканей свежие или отмытые дистиллированной водой от консервирующей жидкости, обрабатывают одним из методов, указанных ниже.

Метод Гона-Левенштейна-Сумиоши. Кусочки материала измельчают ножницами в ступке, тщательно растирают пестиком со стерильным песком или стеклом и заливают в

зависимости от свежести материала растворами серной кислоты концентрацией 3-5 или 6% или раствором шавелевой кислоты концентрацией 5 или 10% в соотношении: на 1 объемную часть материала 4 части кислоты. Пробу центрифугируют в течение 10-15 мин частотой вращения 3000 оборотов в минуту. Общая экспозиция контакта с кислотой не должна превышать 30 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок отмывают 2-3 раза физиологическим раствором с помощью центрифугирования и используют для посевов, нанося и втирая его шпателем на поверхность яичной среды.

Метод Аликаевой. Ткани нарезают на кусочки размером 0,5 см, помещают в ступку, заливают раствором серной кислоты концентрацией 3-5 или 6% и оставляют на 10-20 мин. Ступку накрывают стерильной пергаментной бумагой. Затем кислоту сливают, материал промывают два-три раза в течение 5-10 мин физиологическим раствором, после чего раствор удаляют и кусочки ткани тщательно растирают с незначительным объемом свежего физиологического раствора (1-1,5 см). Из полученной взвеси делают посевы и мазки, а к оставшейся доливают физиологический раствор в количестве, необходимом для заражения животных (1 см на одно животное).

Для концентрации микобактерий в исследуемом материале применяют метод флотации. Материал растирают в ступке с физиологическим раствором до консистенции сметаны. В узкогорлую колбу вместимостью 250 см помещают 10 см исследуемого материала, добавляют равное количество 1%-ного раствора гидроокиси натрия.

Смесь тщательно встряхивают (не более 10 мин) в специальном аппарате или вручную до получения однородной консистенции. Затем гомогенизированный материал разбавляют в соотношении 1:9 дистиллированной водой и прибавляют 1-2 см ксилола или авиационного бензина. Смесь вновь встряхивают в течение 5-10 мин, добавляют дистиллированную воду (до горлышка колбы) и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Микобактерии туберкулеза концентрируются во флотационном растворе у горлышка колбы.

Для приготовления мазков содержимое образовавшегося кольца осторожно отсасывают пипеткой и наносят по мере подсыхания несколько раз на предметное стекло. Для посевов на питательные среды пенистую часть флотационного кольца переносят пастеровской пипеткой в стерильные пробирки, добавляя приблизительно равное количество 3-5 или 6%-ного раствора серной кислоты. Пробирки тщательно встряхивают в течение 3-5 мин и оставляют на 10 мин. Содержимое вновь образовавшегося компактного кольца засевают петлей-ракеткой в пробирки с питательной средой.

2.6.3.3. Проведение анализа.

Подготовленный для исследования материал высевает в 5-10 пробирок с питательной средой Левенштейна-Йенсена или Гельберга, Петраньяни, Финн-2, Мордовского. В 5 пробирок тех же сред высевает взвесь из брыжеечных лимфоузлов и в одну пробирку с мясопептонным агаром (МПА) и мясопептонным бульоном (МПБ). Посев проводят пастеровской пипеткой или платиновой петлей, осторожно втирая материал по всей поверхности питательной среды. Засеянные пробирки укладывают в наклонном положении и помещают в термостат с температурой 37-38 °С. Через 2 сут посевы просматривают и определяют восстановление цвета среды. Если цвет среды не восстановился, обработку и посев повторяют. Пробирки, в которых появился рост посторонней микрофлоры, удаляют. В остальных ватно-марлевые пробки парафинируют.

Для выявления начального роста микобактерий все пробирки с посевами просматривают не менее одного раза в неделю. Посевы выдерживают в термостате в течение 90 сут. При обнаружении роста микобактерий в первые 10 сут наблюдение за посевами продолжают в течение 3 мес.

Для дальнейшего изучения культуральных свойств делают пересев выросших колоний микобактерий, предварительно накопив бактериальную массу для посева на различные питательные среды (яичные, мясопептонный бульон (МПБ) и яичную среду с салицилатом натрия) и культивируют их при температурах: 20-25, 37-38 и 45 °С.

Для посева отбирают платиновой петлей (диаметр 2-3 мм) бактериальную массу и переносят в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон. При неоднородном росте культуры отбирают колонии, наиболее характерные по внешнему виду для микобактерий туберкулеза. Бактериальную массу тщательно растирают в 1-1,5 см физиологического раствора, который добавляют небольшими порциями в пробирку (флакон).

Приготовленную взвесь вносят по 2-3 капли пастеровской пипеткой в шесть пробирок с плотной яичной средой (по две для каждого температурного режима), в две пробирки яичной среды с салицилатом натрия и одну пробирку с мясопептонным бульоном (МПБ). На пробирках делают надписи с указанием номера экспертизы, даты посева и температурного режима культивирования. Пробки парафинируют и пробирки устанавливают в термостат при заданных температурах. Пробирки с посевами на мясопептонную среду и на яичную среду с салицилатом натрия инкубируют в термостате при 37-38 °С.

2.6.3.4. Обработка результатов.

Для микобактерий туберкулеза бычьего вида характерен рост через 20-60 сут. в виде скупко растущих мелких, шаровидных в глубине среды слегка возвышающихся цвета слоновой кости колоний. Реже встречаются культуры, образующие морщинистые колонии.

Для микобактерий туберкулеза человеческого вида характерен рост через 20-30 сут. в виде морщинистых, сухих, цвета слоновой кости колоний. Это R-варианты культур микобактерий (шероховатые), вирулентные для человека и животных. Иногда встречаются S-варианты (гладкие) культуры.

Для микобактерии туберкулеза птичьего вида характерны мягкие, слизистые (иногда с пуговицеобразным возвышением и кратеровидные углубления) серовато-белые, реже слегка желтоватые колонии. Культуры этого вида растут быстрее (10-15 сут), чем микобактерий указанных выше видов.

Микобактерии туберкулеза всех трех видов не образуют пигмента и растут на яичных средах без салицилата натрия: бычьего и человеческого видов - при 37-38 °С, птичьего - 37-38° и 45 °С. Микобактерии туберкулеза птичьего вида растут также на яичной среде с салицилатом натрия.

Атипичные микобактерии могут расти при разных температурах на яичных, а некоторые и на простых средах.

Культуры микобактерий непигментированные, дающие рост при температуре 37-38 °С на яичных средах без салицилата натрия более чем через 20 сут, и не растущие в мясопептонном бульоне (МПБ), а также культуры, дающие рост при температуре 37-38 и 45 °С на яичных средах (включая среды с салицилатом натрия) через 10 и более сут, подлежат исследованию биологическим методом.

Культуры микобактерий, характеризующиеся ростом на яичной среде с салицилатом натрия или на простых средах, пигментированием, ростом при 22 °С, в дальнейшем биологическому исследованию не подвергают.

2.6.4 Метод биологической пробы

Сущность метода заключается в воспроизведении туберкулеза при диагностическом исследовании материала и для определения вида микобактерий туберкулеза.

Исследование проводят, используя взвесь из материала (органы, лимфоузлы и др.) или культуру микобактерий, выделенную бактериологическим исследованием.

2.6.4.1. Подготовка к анализу.

Патологический материал, взятый от животных и обработанный, как указано в п.3.2.3, нейтрализуют стерильным водным раствором двууглекислого натрия с массовой долей 10%, отстаивают до оседания крупных частиц и образовавшуюся надосадочную

жидкость используют для инъекции лабораторным животным. Взвесь готовят из расчета, чтобы для получения одной дозы (1 см) было взято примерно 1 г исследуемого материала.

Для приготовления взвеси из культуры микобактерий, выделенной, как указано в разд.3, бактериальную массу в количестве 8-10 мг снимают шпателем с поверхности плотной питательной среды и переносят в стерильный пенициллиновый флакон с резиновой пробкой, предварительно взвешенный. Затем флакон вновь взвешивают на аналитических весах и по разности между первой и второй массой флакона определяют массу взятой культуры. Во флаконы добавляют физиологический раствор из расчета 1 см на 1 мг бактериальной массы.

2.6.4.2. Проведение анализа.

Для постановки бипробы берут кроликов живой массой не менее 2000 г, морских свинок живой массой 300-350 г (желательно светлой масти) и кур в возрасте не моложе 150 суток. Бипробу проводят при диагностическом исследовании материала от млекопитающих – на двух морских свинках, от птиц - на двух курах.

Взвесь материала в дозе 1-2 см вводят морским свинкам подкожно в области паха, допускается интратрастестикулярное заражение морских свинок в дозе 0,2 см взвеси, курам – в подкрыльцовую вену.

Через 30 сут. после заражения свинок исследуют туберкулиновой пробой. У морских свинок на боку выщипывают (или выбривают) шерсть (лучше накануне исследования) и внутрикожно им вводят ППД-туберкулин для млекопитающих в дозе 25 ТЕ (туберкулиновых единиц), растворенный в 0,1 см растворителя или стерильного физиологического раствора.

Дозу 25 ТЕ ППД-туберкулина в 0,1 см растворителя получают следующим путем: во флакон с ППД-туберкулином вливают растворитель, содержащийся в прилагаемом к аллергену флаконе, перемешивают и получают концентрацию 50000 ТЕ/см. После растворения ППД-туберкулина 1 см раствора переносят в пробирку с 9 см физиологического раствора, перемешивают. Затем 0,5 см этого раствора переносят во вторую пробирку с 9,5 мм физиологического раствора и получают раствор, содержащий в 0,1 см 25 ЕД ППД-туберкулина.

Реакцию на туберкулин у морских свинок учитывают через 24 и 48 ч после введения ППД-туберкулина. Положительная реакция проявляется гиперэемией кожи в месте введения ППД-туберкулина и образованием уплотненной припухлости диаметром 5 мм и более, иногда с некрозом в центре.

Курам вводят 0,1 см ППД-туберкулина для птиц внутрикожно в бородку, реакцию учитывают через 30-36 ч. Положительная реакция характеризуется опуханием бородки.

Заражение животных культурами микобактерий, выделенными из исходного материала, проводят для определения вида возбудителя туберкулеза. В этих целях двух морских свинок, двух кроликов и при необходимости двух кур заражают 3-4-дневной культурой: морских свинок подкожно, кроликов - внутривенно в краевую вену уха, кур - внутривенно в подкрыльцовую вену в дозах по 1 мг микобактерий, суспендированных в 1 см физиологического раствора. Если бактериальная масса трудно растирается (суспензия должна быть гомогенной), ее сначала тщательно растирают с несколькими каплями физиологического раствора или бычьей желчи пестиком в ступке или стеклянной палочкой в пробирке, а затем к суспензии частями добавляют необходимый объем физиологического раствора.

2.6.4.3. Обработка результатов.

Определение видов микобактерий туберкулеза проводят на основании результатов патологоанатомического исследования подопытных лабораторных животных.

Микобактерии туберкулеза человеческого и бычьего видов у морских свинок вызывают развитие генерализованного туберкулеза в период от 21 до 90 сут после введения материала (культуры). На месте введения материала (культуры) образуется язва

и наблюдается увеличение регионарного лимфатического узла. Морские свинки прогрессивно худеют. При вскрытии павших или убитых животных в регионарных к месту заражения паховых лимфатических узлах на разрезе обнаруживают казеозные очаги. При генерализации процесса поражены и другие лимфатические узлы. Селезенка и печень увеличены, плотные, с сероватыми или желтоватыми мелкими сливающимися узелками. В легких много сероватых очажков.

Микобактерии туберкулеза птичьего вида у морских свинок, как правило, вызывают только абсцесс в месте введения культуры и увеличение регионарного пахового лимфатического узла. При заражении материалом изменений в органах и тканях у животных не наблюдают.

Микобактерии туберкулеза бычьего вида у кроликов при внутривенном заражении в течение от 21 до 90 сут после заражения вызывают генерализованный процесс, который характеризуется увеличением легких с множеством очажков, часто с наличием некрозов. В печени и селезенке поражения имеют вид небольших узелков, либо отсутствуют. В почках могут развиваться очаговые поражения.

Микобактерии туберкулеза человеческого вида у кроликов не вызывают прогрессирующего процесса. Единичные очажки можно обнаружить в легких и редко в почках. Чаще поражения отсутствуют.

Микобактерии туберкулеза птичьего вида у кроликов вызывают, как правило, сепсис (тип Иерсена), характеризующийся резким увеличением селезенки. При этом гибель животных наступает через 11-30 сут.

Микобактерии туберкулеза человеческого и птичьего видов при внутривенном заражении кур не вызывают у них заболевания и каких-либо изменений в органах. Микобактерии туберкулеза птичьего вида вызывают гибель кур в течение 30 суток. Иногда куры выживают 60-90 суток. На вскрытии у павших (или убитых) кур обнаруживают много серо-желтых бугорков в печени и селезенке, а в окрашенных по Циль-Нильсену мазках из органов – значительное количество микобактерий туберкулеза.

2.6.5 Метод гистологического анализа

Сущность метода заключается в обнаружении в лимфатических узлах и органах больных туберкулезом животных морфологических изменений.

2.6.5.1. Подготовка к анализу

Кусочки ткани заливают в целлоидин или парафин и приготавливают срезы. Срезы готовят также и на замораживающем микротоме. Препараты окрашивают гематоксилин-эозином.

2.6.5.3. Проведение анализа

Срезы просматривают под микроскопом.

2.6.5.4. Обработка результатов

Положительными результатами гистологического исследования, свидетельствующими о типичных для туберкулеза изменениях, считают наличие в органах и лимфатических узлах частично или полностью обызвествленных некротических очагов-казеозов, окруженных зоной эпителиоидных, гигантских и лимфоидных клеток и соединительно-тканной капсулой.

При дифференциальной диагностике туберкулеза учитывают сходные изменения, наблюдаемые при гранулемах, образующихся при микозах и паразитарных болезнях. В этих случаях регионарные лимфатические узлы не поражены.

В гранулемах микотического происхождения находят в некрозе мицелий гриба, при паразитарных – тело паразита и эозинофильно-клеточную пролиферацию в капсуле.

При паратуберкулезе наблюдают в брыжеечных лимфатических узлах и кишечной стенке эпителиоодноклеточную пролиферацию без образования некрозов.

3. БРУЦЕЛЛЕЗ

(лат., англ. — *Brucellosis*; фр., нем. — *Brucellose*)

(синонимы болезни: мальтийская лихорадка, болезнь Банга, лихорадка Гибралтара, ундулирующая лихорадка, мелитокочция, эпизоотический аборт)

Бруцеллез животных широко распространен во многих странах мира. Он наносит значительный экономический ущерб из-за массовых абортов, яловости, выбраковки продуктивных животных, потери ценных производителей, нарушения племенной работы, затрат на противоэпизоотические мероприятия и т. д. Кроме того, больные животные служат основным источником заражения бруцеллезом человека.

Несмотря на улучшение эпизоотической ситуации бруцеллеза животных в Российской Федерации, проблема оздоровления поголовья скота окончательно не решена. Выявление заболевших животных и неблагополучных пунктов не только не снижается, но и имеет тенденцию к увеличению. Необходимо уточнение причин длительного неблагополучия и причин возникновения новых случаев болезни в благополучных хозяйствах. Исходя из этого, изучение эпизоотологических особенностей бруцеллеза сельскохозяйственных животных в региональном аспекте является основополагающей в совершенствовании мер борьбы с этой болезнью в современных экономических условиях.

Бруцеллез – хроническая зоонозная болезнь животных и человека, проявляющаяся у самок в основном абортами, задержанием последа, а у самцов – орхитами и эпидидимитами.

Симптомы бруцеллеза у людей были известны еще Гиппократу. В 1861 г. англичанин Ф. Марстон на острове Мальта дифференцировал бруцеллез у людей как самостоятельное заболевание. В 1987 г. бактериолог Д. Брюс открыл возбудителя болезни (по имени этого ученого в начале XX в. получили свое название и возбудитель, и болезнь). Английские исследователи А. Райт и Д. Семпл (1897) впервые предложили для диагностики бруцеллеза реакцию агглютинации. Несколько позже Заммит (1904-1907) обнаружил противобруцеллезные антитела в молоке коз, что позволило выявить источник и факторы передачи возбудителя у людей. В. Банг и Стрибольт (1897) выделили от абортировавшей коровы, а Траум (1914) от абортировавшей свиноматки близкородственных возбудителей. Их позднее (1918-1920) объединили в один род и назвали в честь Брюса бруцеллами.

3.1 Этиология

Бруцеллы – мелкие полиморфные микроорганизмы кокковидной, овоидной или палочковидной формы, размером 0,3-0,5×0,6-2,5 мкм. Они неподвижные, спор не образуют, грамтрицательные, растут на различных питательных средах, но лучше всего на печеночных средах с добавлением глюкозы, сыворотки или глицерина. Первичные культуры из патматериала растут медленно. Для видовой дифференциации бруцелл учитывают потребности первых генераций их культур в диоксиде углерода, способность к образованию сероводорода, рост в средах с некоторыми анилиновыми красками, агглютинацию моноспецифическими сыворотками, а при определении биоварианта – биохимическую активность и некоторые другие показатели. Установлена L-форма микроорганизмов. Бруцеллы обладают высокой инвазивностью, относятся к внутриклеточным паразитам, имеют глубинный O- и поверхностный S-антигены.

Бактерии из рода *Brucella* подразделяют на следующие виды:

B. melitensis представлен 3 биоварами, основными хозяевами являются козы и овцы;

B. abortus – 7 биоваров, крупный рогатый скот,

B. suis – 5 биоваров, свиньи. Носителем второго биовара являются зайцы, четвертого – олени, пятого – мышевидные грызуны;

B. neotomae – пустынные кустарниковые крысы;

B. ovis – бараны;

- B. canis* – собаки;
- B. ceti* – китообразные;
- B. pinnipedialis* – ластоногие;
- B. microti* – серая полевка.

Основное эпидемическое и эпизоотическое неблагополучие по бруцеллезу определяют носители трех основных видов возбудителя *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*.

Микробы устойчивы во внешней среде, холод их консервирует, в почве они сохраняются около 110 сут, в навозе – от 20 до 70 суток. К физическим и химическим факторам устойчивость бруцелл невысока. При 60-65°C они погибают в течение 15-30 мин, при 70-75°C – 5-10 мин, при 100°C – мгновенно. В охлажденном молоке сохраняются 6-8 сут., в закисшем – 3-4 сут., в сливках – до 4-7 сут., в сырах – 40-50 сут., в соленом мясе – до 3 мес., в замороженном мясе и на шерсти – до 5 мес., на одежде – 14 суток. В почве, воде, навозе, грубых кормах возбудитель может оставаться жизнеспособным в течение 4 мес., в гниющих материалах микробы быстро теряют жизнеспособность. Прямые солнечные лучи убивают их за 3-4 суток.

К дезинфицирующим средствам бруцеллы неустойчивы. Растворы хлорной извести, содержащие 2...2,5 % активного хлора, 2%-ный раствор гидроксида натрия, 10...20%-ная взвесь свежегашеной извести (гидроксид кальция) убивают бруцелл в течение нескольких минут; 0,5%-ный раствор глутарового альдегида и 5 %-ный фенолят натрия хорошо обеззараживают их за 1 ч.

3.2 Эпизоотология

Бруцеллезом болеют все виды домашних и многие виды диких животных. Наибольшее его распространение наблюдается среди крупного рогатого скота, овец, коз и свиней. Птицы устойчивы к заражению бруцеллезом. Из лабораторных животных к возбудителям бруцеллеза наиболее восприимчивы морские свинки и белые мыши. Взрослые, половозрелые животные более чувствительны.

Источником возбудителя инфекции служат больные бруцеллезом животные и микробоносители, особенно опасны abortировавшие самки, которые выделяют чрезвычайно большое количество бруцелл с околоплодными водами, плодовыми оболочками, abortированным плодом, истечениями из половых путей. Выделяются бруцеллы также с молоком, спермой, мочой, калом.

Занос бруцеллеза в благополучные хозяйства чаще всего происходит с больными животными или переболевшими — бруцеллоносителями при несоблюдении правил карантинирования. Возникновению бруцеллеза способствуют несвоевременная уборка последов, навоза, несоблюдение режима дезинфекции, а также неудовлетворительные ветеринарно-санитарные условия содержания и выращивания поголовья, обуславливающие снижение резистентности организма животных.

Передача инфекции возможна при контакте больных и здоровых животных на пастбищах, в местах водопоя. Заражение происходит алиментарно и контактно (половым путем), через слизистые оболочки и кожу. У коров бруцеллы могут сохраняться в вымени до 7-9 лет, у овец – до 2-3 лет, периодически выделяясь с молоком.

Факторы передачи – продукты, инфицированные бруцеллами, особенно молочные (молоко, обрат, сыворотка), сырье животного происхождения, предметы ухода, корма, подстилка, вода, почва относятся к. В овцеводческие хозяйства бруцеллез может быть занесен инфицированными сторожевыми собаками. На фермах крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, северных оленей бруцеллез протекает в виде эпизоотических вспышек, а у лошадей, буйволов, собак и других животных проявляется спорадически. В свежих очагах бруцеллеза за несколько месяцев может быть инфицировано до 60 % и более восприимчивых животных. Молодняк более устойчив к заражению бруцеллезом, чем взрослые животные.

3.3 Клинические признаки

Заболевание бруцеллезом у отдельных особей может сопровождаться серозными бурситами, гигромами, артритами, тендовагинитами, а у мужских особей – орхитами и эпидидимитами со значительным увеличением семенников и опухание мошонки.

Инкубационный период продолжается 2-4 недели. Бруцеллез у животных протекает в основном в латентной форме, и если среди восприимчивого поголовья нет беременных, то выявить болезнь можно только при помощи серологических исследований.

Течение болезни в стаде зависит от числа беременных животных. В отдельных стадах abortируют до 50 % животных и более. Основным клиническим признаком бруцеллеза у самок – аборт, наблюдающийся обычно во втором периоде беременности. У коров abortы происходят на 5-8 месяце стельности, за 1-2 дня до abortа нередко отмечают припухание наружных половых органов, истечение из влагалища буроватой слизи, без запаха, и набухание вымени. У abortировавших животных отмечают задержание последа и эндометрит, иногда возникают маститы, бурситы, у самцов возможны орхиты, эпидидимиты. При заносе бруцеллеза в ранее благополучное стадо может abortировать до 50-60% животных. Коровы или нетели, как правило, abortируют один, реже два раза.

Овцы и козы abortируют на 3-5 месяце беременности. В некоторых случаях плоды доношиваются, но, как правило, погибают в первые дни жизни. В первые 1-1,5 мес. после abortа развиваются артриты, метриты, бурситы.

Свиноматки могут abortировать как в первой, так и во второй половине супоросности, чаще всего на 60-90 день беременности. Abort, как правило, протекает легко, и многие свиноматки уже через 4-5 дней снова приходят в охоту, у некоторых из них послед задерживается на 1-2 сут., после чего развивается эндометрит, возникают маститы, а в подкожной клетчатке, скелетной мускулатуре – абсцессы.

У быков, баранов, хряков при бруцеллезе отмечают орхиты, эпидидимиты с последующей атрофией семенников.

У лошадей наиболее характерными признаками бруцеллеза являются бурситы в области затылка и холки, а у северных оленей и маралов – бурситы конечностей. Отмечено более легкое переболевание бруцеллезом буйволов и зебувидного скота.

У собак и кошек болезнь протекает бессимптомно и может быть обнаружена при серологическом исследовании.

3.4 Патологоанатомические изменения

Картина вскрытия при бруцеллезе нехарактерная. У abortировавших животных плодные оболочки набухшие, покрыты хлопьями фибрина и гноя, возможны признаки гнойно-катарального метрита, поражение почек, селезенки, печени (абсцессы). У самцов отмечают развитие гнойно-некротических орхитов, у самок – маститов, оофаритов, выявляют кисты в яичниках, нередко поражения суставов, бурситы. У abortированных плодов отеки подкожной клетчатки и пупочного канатика, скопление жидкости бурокрасного цвета с хлопьями фибрина в грудной и брюшной полостях, кровоизлияния на серозных и слизистых оболочках, катаральное воспаление слизистых оболочек ЖКТ, легких, некротические участки в печени.

3.5 Бруцеллез у человека

Бруцеллез у человека – это зоонозное инфекционное заболевание, которое преимущественно поражает сердечно-сосудистую, опорно-двигательную, нервную и половую систему. Заражение человека бруцеллезом происходит преимущественно контактным (с больными животными, сырым и инфицированными продуктами животного происхождения) или алиментарным путем. Для людей наиболее патогенны *B. melitensis*, которые могут вызывать эпидемические вспышки заболевания, протекающего в тяжелой форме.

К работе с животными, реагирующими при исследовании на бруцеллез, допускаются работники, привитые против бруцеллеза и проинструктированные по соблюдению санитарных правил. Лица, имеющие на кистях рук порезы, ссадины и другие повреждения кожи, допускаются к работе только в резиновых перчатках после предварительной обработки пораженного участка.

При проведении противобруцеллезных мероприятий строго соблюдают меры предосторожности, исключающие заражение людей и инфицирование объектов внешней среды. Запрещаются доение овец и коз, изготовление брынзы и сыров на фермах, неблагополучных по бруцеллезу. Шерсть от овец из неблагополучных отар подвергают в хозяйстве дезинфекции бромистым метилом под пленкой, после чего ее вывозят для переработки.

3.6 Лабораторная диагностика

Лабораторную диагностику бруцеллеза осуществляют на основании ГОСТ 33675-2015 «Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Бактериологические методы», разработанный ФГБУ «Всероссийский Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), принятый Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 82-П от 12 ноября 2015 года)

3.6.1 Отбор проб

Материал для диагностики бруцеллеза отбирают от каждого животного в отдельности. При взятии проб необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей и обсеменение объектов внешней среды в соответствии с требованиями, действующими на территории государства, принявшего стандарт. Пробы направляют в лабораторию и исследуют в день отбора или на следующий день.

3.6.1.1 Отбор проб патологического материала

Для бактериологического и молекулярно-генетического исследования на бруцеллез направляют абортрованный плод с плодовыми оболочками (от многоплодных животных берут не менее трех плодов). От плодов крупных животных направляют селезенку, печень, желудок с содержимым, перевязанный со стороны пищевода и двенадцатиперстной кишки, и околоплодную жидкость.

Если в течение 24-30 ч взятый материал доставить в лабораторию не представляется возможным, его консервируют стерильным 30%-ным водным раствором химически чистого глицерина. Материал заливают консервирующей жидкостью в количестве, превышающем его объем в четыре-пять раз. Крупные плоды направляют в неконсервированном виде.

От абортировавшего животного одновременно с патологическим материалом направляют кровь (сыворотку крови) для молекулярно-генетического исследования на бруцеллез.

3.6.1.2 Отбор проб для прижизненной диагностики бруцеллеза

Для прижизненной диагностики бруцеллеза от животных берут: кровь, молоко, содержимое гиром, бурс и абсцессов.

При диагностическом убое дополнительно берут: селезенку; печень; лимфатические узлы: подчелюстные, заглоточные, предлопаточные, надколенные, подколенные, надвыменные, парааортальные, тазовые; семенники.

6.3.1.2.1 Отбор проб крови. Кровь морских свинок для получения сыворотки с последующим исследованием при постановке биопробы берут из краевой ушной вены или из сердца по 1-3 см³ стерильными шприцами в стерильные пробирки подходящей вместимости.

Приготовление сыворотки

Сыворотку крови получают методом отстоя. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают в термостате при температуре 30°C-38°C в

течение 1 ч или при комнатной температуре в течение 8-10 ч, сгусток крови от стенок отделяют стальной спицей, а затем пробирки выдерживают в холодильнике при температуре 4°C-10°C. Через 20-24 ч полученные сыворотки сливают в сухие стерильные пробирки и направляют для исследования в лабораторию.

Пробы крови от животных для бактериологического исследования берут стерильными шприцами в объеме 18-20 см³, в которые предварительно набирают антикоагулянтное средство (глюгидир или аналогичное). Сразу после взятия крови иглы, не отсоединяя от шприцев, закрывают колпачками и перемешивают содержимое, переворачивая шприцы. Перед посевом использованные иглы заменяют стерильными.

6.3.1.2.2 Отбор проб молока. Перед взятием проб молока у коров (буйволиц) вымя обмывают теплой водой, соски обрабатывают 70%-ным этиловым спиртом. Для исследования из каждой доли вымени берут последние порции молока в объеме 10-15 см³ в отдельные стерильные пробирки с резиновыми пробками.

У овец и коз пробы молока берут путем пункции цистерны вымени. Для этого животное фиксируют в боковом положении, вымя у основания соска протирают 70%-ным этиловым спиртом и смазывают 5%-ным раствором йода. Стерильным шприцем с иглой делают пункцию у основания соска и после попадания иглы в цистерну (о чем судят по свободному движению конца иглы) набирают в шприц молоко в объеме 10 см³ и переносят его в стерильную пробирку с резиновой пробкой.

6.3.1.2.3 Отбор проб содержимого гигром, бурс и абсцессов. При взятии содержимого гигром, бурс и абсцессов в области поражения выстригают шерсть, кожный покров дезинфицируют 70%-ным этиловым спиртом и смазывают 5%-ным раствором йода. Затем стерильным шприцем с ветеринарной иглой для взятия крови делают пункцию, отбирают содержимое гигромы, бursы или абсцесса и переносят его в стерильную бактериологическую пробирку вместимостью 16-18 см³ с резиновой пробкой.

6.3.1.2.4 Упаковка и маркировка проб. Отобранные в стерильные пробирки пробы крови и молока помещают во влагонепроницаемую тару (полиэтиленовые пакеты или полистироловые контейнеры с крышками).

Пробы патологического материала упаковывают в пергаментную бумагу, маркируют и помещают во влагонепроницаемую тару (полиэтиленовые пакеты или полистироловые контейнеры с крышками).

Пробы маркируют с указанием:

- наименования хозяйства;
- вида, пола и возраста животного;
- инвентарного номера животного;
- наименования пробы;
- цели и вида исследования.

Материал для лабораторных исследований отбирают от каждого животного в отдельности.

3.6.2 Бактериоскопический метод

Сущность бактериоскопического метода заключается в окрашивании мазков и мазков-отпечатков из патологического материала и последующем микроскопическом выявлении клеток бруцелл.

3.6.2.1 Подготовка к исследованию

3.6.2.1.1 Подготовка растворов для окраски.

Приготовление кристаллического фиолетового и генцианового фиолетового.

Берут 1 г кристаллического фиопетоеого или генцианового фиолетового и растирают в ступке с 2 г фенола, добавляя небольшими порциями 96 %-ный этиловый спирт в объеме 10 см³. После полного растворения краски в ступку при постоянном помешивании добавляют 100 см³ дистиллированной воды. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 200 см³.

Срок хранения растворов при температуре от 2 °С до 10°С - не более 6 мес.

Приготовление раствора Люголя

Для приготовления раствора Люголя в 10 см³ дистиллированной воды растворяют 2 г йодистого калия. Затем прибавляют 1 г кристаллического йода. Раствор выдерживают в течение 5-6 ч до полного растворения йода и добавляют 290 см³ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 10 °С а склянке из темного стекла - не более 30 сут. Приготовление карболового фуксина Циля

Для приготовления карболового фуксина Циля 1 г основного кристаллического фуксина растирают в ступке с 5 г кристаллического фенола и 0.5 см³ глицерина, добавляя небольшими порциями 96 %-ный этиловый спирт в объеме 10 см³, а затем при постоянном помешивании в ступке добавляют 100 см³ дистиллированной воды. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр в колбу вместимостью 200 см³.

Срок хранения раствора при температуре 18 °С — 22 °С во флаконах из темного стекла с притертой пробкой - не более 6 мес.

Непосредственно перед работой к одной части полученного раствора карболового фуксина Циля добавляют девять частей дистиллированной воды.

Приготовление 0,75 %-ного и 1,0 %-ного водных растворов малахитового зеленого берут 0,75 или 1,00 г малахитового зеленого и растворяют в 100 см³ кипящей дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2⁰С до 8⁰:°С — не более 1 мес.

Приготовление 0,5 %-ного раствора уксусной кислоты

Берут 0.5 см³ уксусной кислоты и добавляют 99.5 см³ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

Приготовление 1 %-ного водного раствора метиленового синего

Берут 1 г метиленового синего и растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С - не более 1 мес.

Приготовление 2 %-ного водного раствора сафранина

Берут 2 г сафранина и растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Срок хранения раствора при температуре от 2⁰С до 8 °С - не более 1 мес.

Приготовление 5 %-ного спиртового раствора йода

Берут 5 г кристаллического йода и переносят в мерную колбу вместимостью 250 см³, добавляют 10 г калия иодида и равные объемы дистиллированной воды и 96 %*ного этилового спирта, доводя раствор до объема 100 см³.

Срок хранения раствора при температуре не выше от 2 °С до 25 °С в склянке из темного стекла - не более пяти лет.

Приготовление 3 %-ного спиртового раствора гидроокиси калия

Берут 3 г гидроокиси калия, растворяют в 5 см³ дистиллированной воды и в мерной колбе вместимостью 200 см³ доводят объем раствора 96 %-ным этиловым спиртом до 100 см³. Декантируют прозрачный раствор. Срок хранения раствора при температуре не выше 25 °С не более одного года.

3.6.2.1.2 Приготовление мазков. Из проб патологического материала по 6.2 делают по два мазка. При исследовании абортированных плодов готовят мазки-отпечатки из паренхиматозных органов (печени, селезенки), котиледонов плодовых оболочек и другого плотного материала, а жидкий материал (содержимое желудка, жидкости брюшной и грудной полостей, околоплодную жидкость) наносят на предметные стекла пастеровской пипеткой.

Для приготовления мазков-отпечатков используют чистые обезжиренные предметные стекла. Абортированный плод вскрывают, поверхность паренхиматозных органов, котиледонов плодовых оболочек и другого плодного материала стерилизуют, прикладывая раскаленный шпатель или обжигая факелом, смоченным 95 %-ным этиловым спиртом. Стерильными ножницами вырезают кусочки

размером 1.5×1.0×1.5 см и прикладывают поверхности срезов к предметному стеклу (по три отпечатка на два предметных стекла). Мазки-отпечатки высушивают на воздухе в течение 5 мин и фиксируют над пламенем горелки. Мазки-отпечатки на одном предметном стекле окрашивают по Козловскому или Стампу, на другом - по Граму.

3.6.2.2 Проведение исследования.

3.6.2.2.1 Окрашивание по Граму. Для окраски мазок по Граму на фиксированный мазок по 7.2.2 кладут кусочек фильтровальной бумаги, наносят кристаллический фиолетовый или генциан фиолетовый и выдерживают в течение 2 мин. после чего снимают бумагу, сливают краску, промывают дистиллированной водой и наносят на мазок раствор Люголя (мазок чернеет). Через 1-2 мин раствор сливают и наносят 96 %-ный этиловый спирт на 0,5-1,0 мин. Затем мазок промывают дистиллированной водой и дополнительно окрашивают разведенным в соотношении 1:10 фуксином Циля в течение 1-2 мин. Краску сливают, промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

Если после нанесения раствора Люголя мазок не чернеет, то необходимо приготовить новый раствор.

3.6.2.2.2 Окрашивание по Козловскому. Для окраски по Козловскому фиксированный мазок по 7.2.2 окрашивают 2 %-ным водным раствором сафранина с подогреванием на водяной бане до появления пузырьков. Мазок промывают дистиллированной водой и дополнительно окрашивают 0,75 %-ным или 1 %-ным водным раствором малахитового зеленого в течение 0,5-1,0 мин. Краску сливают, промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

3.6.2.2.3 Окрашивание по Стампу. Для окраски по Стампу фиксированный мазок по 7.2.2 окрашивают в течение 10 мин карболовым фуксином Циля, разведенным по 7.2.1.3 в соотношении 1:10. Мазок промывают дистиллированной водой, а затем 0,5 %-ным раствором уксусной кислоты в течение 30 с. Вновь тщательно промывают дистиллированной водой и докрасивают 1 %-ным раствором метиленового синего в течение 20-30 с. Краску сливают, промывают дистиллированной водой и просушивают мазок фильтровальной бумагой.

Полученные мазки микроскопируют под иммерсионным маслом.

3.6.2.3 Обработка результатов

При микроскопии окрашенных мазков, содержащих бруцеллы, должны наблюдаться мелкие, граммотрицательные, расположенные отдельно, попарно или кучно коккобактерии, окрашенные в красный цвет.

3.6.3 Культуральный метод

Сущность культурального метода заключается в посеве патологического материала на питательные среды с последующим культивированием, идентификацией и дифференциацией выделенной культуры.

3.6.3.1 Подготовка к исследованию

3.6.3.1.1 Приготовление мясной воды. Для приготовления мясной воды свежее мясо крупного рогатого скота освобождают от костей, жира и сухожилий и пропускают через мясорубку. 500 г фарша заливают 1 дм³ водопроводной воды и выдерживают в течение 15-18 ч в прохладном месте. Затем сливают полученный настой в колбу вместимостью 2 дм³ или кастрюлю из нержавеющей стали вместимостью 3 дм³ и кипятят в течение 30-40 мин на электрической или газовой плите, доливают дистиллированную воду до объема 1 дм³ и фильтруют через ватко-марлевый или тканевый фильтр. Полученную мясную воду стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 20 мин.

Срок хранения мясной воды в стеклянных бутылках вместимостью 5 — 15 дм³ при температуре от 2 °С до 25°C - не более одного года.

3.6.3.1.2 Приготовление печеночной воды. Для приготовления печеночной воды свежую печень крупного рогатого скота освобождают от жира, канальцев, пленок и пропускают через мясорубку. В емкость из нержавеющей стали с крышкой вместимостью 3 дм³ вносят 500 г фарша, заливают 1 дм³ водопроводной воды, настаивают в течение 1 ч и кипятят на электрической или газовой плите при периодическом помешивании в течение 30 мин. После отстаивания фарш удаляют, а полученную жидкость доводят до 1 дм³ дистиллированной водой и фильтруют через ватко-марлевый фильтр или тканевый фильтр. Полученную печеночную воду разливают по колбам и стерилизуют при температуре 116 °С и давлении 0,07 МПа в течение 30 мин.

Срок хранения печеночной воды в стеклянных бутылках вместимостью 5 - 15 дм³ при температуре от 2 °С до 25 °С - не более одного года.

3.6.3.1.3 Приготовление МППГТБ. В емкость из нержавеющей стали с крышкой вместимостью 3 дм³ наливают 610 см³ мясной воды и 305 см³ печеночной воды 10 г пептона. 5 г хлорида натрия и 20-30 г пищевого или микробиологического агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь кипятят на электрической или газовой плите в течение 30 мин. устанавливают рН 7.2-7.4 10 %-ным раствором натрия гидроокиси, добавляют 10 г глюкозы и 20 см³ глицерина и фильтруют через ватно-марлевый или тканевый фильтр. Полученную среду разливают в пробирки по 7-8 см³ или во флаконы по 250-300 см³ соответствующей вместимости и стерилизуют при температуре 115 °С и давлении 0.07 МПа в течение 30 мин. рН среды после стерилизации составляет 6.8-7.0.

Срок хранения МППГТБ в пробирках и флаконах при температуре от 2 °С до 8 °С - не более 3 мес.

3.6.3.1.4 Приготовление МППГГА. Емкость из нержавеющей стали с крышкой вместимостью 3 дм³ наливают 610 см³ мясной воды и 305 см³ печеночной воды 10 г пептона. 5 г хлорида натрия и 20-30 г микробиологического агара, предварительно промытого и хорошо отжатого. Смесь кипятят на электрической или газовой плите в течение 1 ч. устанавливают рН 7.2-7.4 10 %-ным раствором гидроокиси натрия и добавляют 10 г глюкозы и 20 см³ глицерина и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Полученную среду разливают в пробирки или флаконы вместимостью 500 см³ и стерилизуют при температуре 115 °С и давлении 0.07 МПа в течение 30 мин. рН среды после стерилизации составляет 6.8-7.0.

Срок хранения МППГГА в пробирках и флаконах при температуре от 2 °С до 8 °С - не более 3 мес.

3.6.3.1.5 Приготовление МППБ. МППБ готовят аналогично МППГГА без добавления агара, глюкозы и глицерина.

Срок хранения МППБ при температуре от 2 °С до 8 °С - не более 3 мес

3.6.3.1.6 Приготовление сывороточно-декстрозного агара. Емкость из нержавеющей стали с крышкой наливают 835 см³ дистиллированной воды, добавляют 20 г пищевого или микробиологического агара. 10 г пептона. 5 г хлорида натрия и 165 см³ мясной воды. Полученную смесь кипятят на электрической или газовой плите при периодическом помешивании в течение 30 мин до расплавления агара. рН до стерилизации - 7.8. Затем стерилизуют в автоклаве текучим паром в течение 1 ч. После автоклавирования среду отстаивают в течение 1 ч. затем фильтруют через ватный или бумажный фильтр, доводят рН среды до 7,2-7.4 10 %-ным раствором гидроокиси натрия, разливают в колбы (пробирки, флаконы) и стерилизуют при температуре 115 °С и давлении 0.07 МПа в течение 30 мин. После стерилизации рН среды составляет 6.8-7.0.

Срок хранения сывороточно-декстрозного агара при температуре от 2 °С до 8 °С - не более 3 мес.

Перед применением среду в колбах (пробирках, флаконах) расплавляют в кипящей водяной бане. охлаждают до температуры 50-60 °С и добавляют 40 %-ный стерильный раствор глюкозы в количестве 1 % к объему питательной среды во флаконе (например, 2,5 см³ 40 %-ного стерильного раствора глюкозы добавляют к 97,5 см³ питательной среды).

3.6.3.1.7 Приготовление селективной добавки для внесения в питательные среды. Содержимое флакона растворяют в 5 см³ 50 %-ного метилового спирта и перемешивают до образования гомогенной суспензии. Раствор используют свежеприготовленным. Полученное количество селективной добавки стерильно добавляют к 500 см³ расплавленной питательной среды.

3.6.3.2 Проведение исследования

3.6.3.2.1. Перед посевом материала кожу абортированного плода по белой линии живота протирают тампоном, смоченным 5 %-ным раствором фенола, приготовленного путем растворения 5 г кристаллического фенола в 100 см³ дистиллированной воды. Стерильными ножницами вскрывают брюшную стенку и грудную клетку плода, содержимое грудной и брюшной полостей пастеровскими пипетками высевают в одну бактериологическую пробирку с МППГБ и после пипетирования полученную взвесь переносят в объеме по 1,0-1,5 см³ на скошенную плотную питательную среду в двух пробирках. Содержимое желудка в объеме по 1-2 см³ высевают в две пробирки с МППГБ и в пять пробирок на скошенную плотную питательную среду.

3.6.3.2.2. Лимфатические узлы, очищенные от жира и мышечных волокон, кусочки печени и селезенки размером 2,0×1,5-2.5 см погружают в 96 %-ный этиловый спирт на 1 с и обжигают, проводя над пламенем спиртовки. После обработки от лимфоузлов стерильными ножницами отрезают кусочки размером 1-2 см. Подготовленный материал помещают в пакет для гомогенизации с фильтром, добавляют 4-5 см³ физиологического раствора и гомогенизируют с использованием гомогенизатора.

Допускается приготовление суспензии путем растирания материала в стерильной фарфоровой ступке с добавлением физиологического раствора до получения однородной гомогенной суспензии.

Полученный гомогенат высевают пастеровской пипеткой по 0,1-0,2 см³ на поверхность предварительно подсушенных после скашивания плотных питательных сред в пробирках и на чашки Петри.

Допускается высеивание материала пастеровской пипеткой непосредственно из лимфатических узлов и органов. Для этого место прокола пастеровской пипеткой предварительно прижигают шпателем, нагретым над пламенем спиртовки. Из каждого объекта проводят посев в одну бактериологическую пробирку с МППГБ и после пипетирования полученную взвесь в объеме по 1,0-1,5 см³ переносят на скошенную плотную питательную среду в две пробирки.

3.6.3.2.3. Если в лабораторию доставлен только желудок плода, высеивание проводят не менее чем в десять пробирок на среды.

3.6.3.2.4. При поступлении нескольких плодов от одного животного посеивания делают из органов и тканей каждого плода отдельно.

3.6.3.2.5. Из плодовых оболочек вырезают кусочки тканей с утолщенными ворсинками и стенками, наличием на поверхности фибрина или гнойного экссудата (выбирают менее загрязненные участки без некротических изменений).

Для уничтожения посторонней микрофлоры кусочки плаценты помещают в чашку Петри и заливают 3 %-ным раствором гидроксида калия на 30 мин. Затем их промывают стерильным физиологическим раствором, готовят из этого материала суспензию в гомогенизаторе или в ступке со стерильным песком и делают посев пастеровской пипеткой в пробирки со средами, содержащими бактериостатические красители: генцианвиолет в разведении 1:200000 (0,1 см³ 0.5 %-ного спиртового раствора генцианвиолета на 100 см³ среды) или кристаллвиолет в разведении

1:100000. генцианвиолет и малахитовую зелень в разведении каждой краски 1:200000. Уксуснокислый натрий из расчета 12,5 мг на 100 см³ среды, или селективную добавку, ингибирующую рост посторонней микрофлоры и грибов.

3.6.3.2.6. Содержимое бурс, гигром и абсцессов высевают на три-четыре чашки Петри с плотной питательной средой, содержащей бактериостатические красители. Во всех случаях вместо бактериостатических красителей допускается применение селективных добавок.

3.6.3.2.7. Пробы молока центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об./мин. Верхний спой (сливки) и осадок набирают в пастеровскую пипетку и по 0.1 —0.2 см³ вносят в три-четыре чашки Петри со средами, содержащими бактериостатические красители или селективные добавки.

3.6.3.2.8. Для выделения культуры бруцелл, в том числе и *Brucella canis*. кровь от животных с антикоагулянтом вносят по 10 —18 см³ во флаконы, содержащие по 100 см³ МППГБ и по 0,3-0,5 см³ в чашки Петри с плотной питательной средой по 8.2.4 и 8.2.6. Посевной материал равномерно распределяют по поверхности питательной среды. Через 25-30 мин чашки Петри помещают в термостат при температуре 37-38 °С агаром вверх. Туда же помещают и флаконы с посевами.

Через семь суток инкубирования из посевов во флаконах делают пересев на три пробирки с плотной питательной средой и инкубируют при тех же условиях.

3.6.3.2.9. При исследовании материала от крупного рогатого скота половину пробирок и чашек Петри культивируют в термостате при температуре 37-38 °С другую - в СО₂-инкубаторе с содержанием 5-10 % углекислого газа или эксикаторе (микроаэроустате).

Допускается культивирование в пробирках, которые плотно укупоривают резиновыми пробками и заливают парафином или обертывают ватно-марлевые пробки парафильмом.

3.6.3.2.10. Необходимое содержание углекислого газа в эксикаторе можно получить путем:

- внесения бикарбоната натрия и серной или соляной кислоты (0,48 г бикарбоната натрия и 5 см³ 25 %-ного раствора кислоты или 0,4 г бикарбоната натрия и 0.35 см³ концентрированной соляной кислоты на 1 дм³ объема):

- сжигания ваты, смоченной спиртом. При этом пробирки и чашки с посевами должны занимать не более половины объема эксикатора.

3.6.3.2.11. Посевы, выдерживают в термостате при температуре 37-38°С в течение 30 сут. Первичный осмотр посевов проводят через 48-72 ч. При отсутствии роста часть поверхности агара орошают посевным материалом.

В последующем посевы просматривают каждые 4 сут визуально, при необходимости через лупу или малом увеличении микроскопа.

При значительном росте посторонней микрофлоры (80 % и более засеянных пробирок) бактериологическое исследование прекращают.

3.6.3.3 Учет результатов

3.6.3.3.1. При просмотре посевов обращают внимание на характер роста бактерий.

3.6.3.3.2. На поверхности твердых питательных сред бруцеллы образуют мелкие, блестящие, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью бесцветные колонии, имеющие в отраженном свете голубоватый оттенок, в падающем свете – сероватый. При длительном культивировании колонии мутнеют и приобретают более темную окраску, что связано с появлением пигмента.

3.6.3.3.3. В жидких питательных средах бруцеллы образуют равномерное помутнение и пристеночное кольцо, возвышающееся над поверхностью бульона, а в дальнейшем небольшой осадок на дне пробирки. В отраженном свете пристеночное кольцо имеет голубоватый оттенок.

3.6.3.3.4. При обнаружении роста на жидких питательных средах и отсутствии характерного роста на твердых питательных средах из каждой пробирки готовят мазки, которые окрашивают одним из методов и делают пересев на чашки Петри с твердой питательной средой для выделения чистой культуры. Пересевы на чашках Петри культивируют так же, как и высевы из патологического материала. При отсутствии роста культуры бруцелл наблюдение за посевами прекращают по истечении 30 сут.

3.6.4 Идентификация выделенных культур

3.6.4.1 Пластинчатая реакция агглютинация

3.6.4.1.1 Подготовка к исследованию

Подготовка двухсуточных культур бруцелл

Для идентификации используют двухсуточные агаровые культуры (изоляты) бруцелл, выделенные из патологического материала. С этой целью выделенные культуры пересевают бактериологической петлей штрихом на поверхность плотной питательной среды, скошенной в пробирках. Посевы инкубируют в термостате при температуре 37-38°C в течение двух суток. Выращенные культуры исследуют непосредственно после извлечения из термостата.

Примечание - Допустимый срок хранения культур при температуре от 2°C до 8°C - не более 14 сут.

Подготовка R- и S-бруцеллезных агглютинирующих сывороток

R и S- бруцеллезные агглютинирующие сыворотки разводят 0,5 %-ным фенолизированным физиологическим раствором до рабочего разведения. Разведенные сыворотки хранят при температуре от 2 °C до 8 °C и используют в течение 30 сут.

3.6.4.1.2 Проведение исследования. На предметное стекло раздельно наносят по одной капле Я- и S-бруцеллезных сывороток и физиологического раствора. Испытуемую культуру бактериологической петлей отдельно перемешивают в капле S-R-бруцеллезной сыворотки и физиологического раствора. Параллельно ставят контроли: со стандартными S- и R-бруцеллезными сыворотками и гомологичными антигенами.

3.6.4.1.3 Учет и оценка результатов реакции агглютинации. При положительной РА в капле сыворотки образуется четко выраженный агглютинат в виде хлопьев или комочков, а жидкость просветляется, что особенно заметно при покачивании стекла. В физиологическом растворе наблюдается гомогенная взвесь без признаков просветления жидкости.

Реакцию учитывают визуально в течение 1-3 мин и оценивают в крестах:

- «++++» (четыре креста) - полное просветление жидкости с образованием четко выраженного агглютината - положительная реакция;
- «+++» (три креста) - неполное просветление жидкости с выраженным агглютинатом - положительная реакция;
- «++» (два креста) - неполное просветление жидкости со слабо выраженным агглютинатом - положительная реакция;
- «+» (один крест) - жидкость без просветления с едва заметным агглютинатом - сомнительная реакция;
- «-» (минус) - просветление жидкости не наступило, смесь гомогенная - отрицательная реакция.

Результаты реакции с испытуемой культурой считают достоверными, если в контролях R- и S-бруцеллезных сывороток с гомологичными антигенами агглютинация четко выражена не менее чем на два креста, а с физиологическим раствором - отсутствует.

3.6.4.1.4 Обработка результатов. Культуры, обладающие типичными для бруцелл морфологическими, культуральными (см. раздел 8) и тинкториальными свойствами (см. раздел 7), а также дающие положительную реакцию агглютинации с S- или Я-бруцеллезной сывороткой или с обеими сыворотками одновременно при отсутствии самоагглютинации в физиологическом растворе, считают бруцеллами.

3.6.4.2 Методы определения диссоциации культур бруцелл

3.6.4.2.1 Проба на стекле с раствором акрифлавина. На предметное стекло наносят каплю раствора акрифлавина в разведении 1:1000 в дистиллированной воде, в которой суспензируют с помощью бактериологической петли испытуемую культуру. У диссоциированных культур (Я- форма) в течение 1—2 мин наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев. Взвесь культур бруцелл в S-форме остается гомогенной.

3.6.4.2.2 Реакция термоагглютинации. Взвесь двухсуточной агаровой культуры бруцелл в физиологическом растворе с содержанием по оптическому стандарту мутности 1 млрд/см³ микробных клеток в объеме 4-5 см³ прогревают в пробирке вместимостью 20 см³ на водяной бане при температуре 90 °С в течение 30 мин.

Результаты учитывают через 30 мин. 1 ч и через 24 ч при комнатной температуре.

При наличии диссоциации наступает выраженная агглютинация клеток бруцелл с формированием осадка, тогда как суспензия недиссоциированной культуры бруцелл в S-форме остается гомогенной.

3.6.4.2.3 Окраска колоний по Уайт-Билсону. Двухсуточную агаровую культуру бруцелл по 9.1.1 разводят физиологическим раствором с таким расчетом, чтобы она по мутности соответствовала 10 ЕД оптического стандарта мутности. Полученную суспензию в объеме 3 см³ смешивают с 2 см³ физиологического раствора и делают десятикратные разведения до 10. используя для каждого разведения отдельную пипетку, и высевают по 0,1 см³ на четыре-шесть чашек Петри с МППГГА. Поверхность агара в чашках равномерно орошают посевным материалом, выдерживают на горизонтальной поверхности стола в течение 20-30 мин и инкубируют при температуре 37-38°С агаром вверх в течение 4-5 сут.

Окраску колоний проводят рабочим раствором кристаллического фиолетового, приготовленного в разведении 1:2000. В чашку Петри с изолированными колониями бруцелл пастеровской пипеткой с грушей вносят осторожно без напора рабочий раствор кристалвиолета. Через 30 с раствор краски удаляют с помощью пипетки с грушей, сливая в дезинфицирующую жидкость (3 %-ный раствор фенола или 5 %-ный раствор хлорамина). Колонии просматривают под бинокулярной лупой.

Колонии бруцелл в Я-форме (диссоциированные) имеют равномерно окрашенный широкий периферический ободок синего или фиолетового цвета и менее интенсивно окрашенную поверхность такого же цвета, иногда с исчерченностью.

Колонии бруцелл в S-форме имеют тонкий периферический ободок, окрашенный в синий или фиолетовый цвет. Центральная часть колоний светло-желтого цвета (не окрашивается).

3.6.4.3 Методы дифференциации бруцелл

Для дифференциации бруцелл используют следующие тесты:

- рост в присутствии СО₂;
- образование Н₂S;
- устойчивость к фуксину и тионину;
- способность агглютинироваться монорецепторными А, М и R-бруцеллезными сыворотками;
- лизирование фагом.

3.6.4.3.1 Образование сероводорода (Н₂S)

Подготовка к исследованию

В качестве реактива применяют насыщенный водный раствор уксуснокислого свинца (30 г свинца растворяют в 100 см³ дистиллированной воды), которым пропитывают полоски фильтровальной бумаги размером 1×8 см. Пропитанные полоски фильтровальной бумаги высушивают при температуре 18-20°С в течение 20 мин.

Срок хранения пропитанных полосок фильтровальной бумаги в банке из темного стекла с притертой пробкой - не более 2 мес.

Проведение исследования

Двухсуточную взвесь культуры бруцелл в физиологическом растворе концентрацией $2-10\text{г}/\text{см}^3$ микробных клеток по оптическому стандарту мутности на 10 ЕД засевают в пробирку бактериологической петлей на скошенную поверхность печеночного агара. Полоску фильтровальной бумаги зажимают между пробиркой и ватной пробкой так, чтобы нижний ее конец свободно свисал над верхним краем посева и не касался поверхности питательной среды.

Ватная пробка должна быть рыхлой, не задерживать выхода из пробирки углекислоты.

Пробирки с посевами помещают в термостат при температуре $37-38^\circ\text{C}$ на 6 сут.

Учет результатов

Показателем интенсивности образования сероводорода является почернение нижнего конца полоски, которое измеряют в миллиметрах.

Результаты учитывают через каждые 2 сут в течение 6 сут. При каждом учете тест-полоску заменяют новой. Для окончательной оценки способности культуры к образованию сероводорода полученные три значения суммируют.

Суммарное значение почернения тест-полосок, свидетельствующее о продуцировании сероводорода, составляет для культур:

- *B. suis* (биовар 1) - 12-20 мм.
- *B. abortus* (биовар 1) - 5-7 мм:
- *B. naotomae* - 5-6 мм.

Культура *B. metoensis* (биовар 1), как правило, не образует сероводорода или вызывает только слабо выраженное почернение тест-полоски. Культуры *B. ovis* и *B. canis* сероводород не продуцируют.

3.6.4.3.2 Определение редуцирующей активности в отношении красок

Подготовка к исследованию

Для приготовления исходных растворов фуксина и тионика в разведении 1:1000 во флаконах вместимостью 200 см^3 смешивают 0.1 г краски, 20 см^3 96 %-ного этилового спирта и 80 см^3 дистиллированной воды.

Срок хранения исходных растворов фуксина и тионина в темном месте - не более 6-10 мес.

Для приготовления питательной среды МППГГА с красками к 100 см^3 охлажденного до температуры $50-60^\circ\text{C}$ агара с соблюдением правил асептики добавляют 2 см^3 исходного раствора краски для получения разведения 1:50000.

Питательную среду с краской разливают пипеткой по $20-25\text{ см}^3$ в чашки Петри и подсушивают при комнатной температуре, не открывая чашки.

Срок хранения среды с красками в холодильнике при температуре от 2 до 8°C - не более 10-15 сут.

Обесцвеченные среды для тестирования не используют.

Проведение исследования

Взвесь бруцелл готовят из двухсуточной агаровой культуры. Посевы испытуемых культур проводят бактериологической петлей из взвеси, содержащей $2\text{ млрд}/\text{см}^3$ микробных клеток, на среду МППГГА с фуксином и тиоником и на среду МППГГА без добавления красок (контроль). Одну петлю взвеси засевают путем нанесения пяти отдельных штрихов на поверхность агара. На одну чашку Петри можно одновременно засеять четыре-шесть культур, предварительно разделив чашку Петри на четыре-шесть секторов.

Чашки с посевами переворачивают агаром вверх и выдерживают в термостате при температуре $37-38^\circ\text{C}$ в течение 3 сут.

Учет результатов

Учет результатов проводят через трое суток инкубации по следующей схеме:

- выраженный рост культур во всех штрихах «++++»;

- выраженный рост в первых двух и более слабый в последующих штрихах «+++»;
- умеренно выраженный рост в первых двух штрихах и слабый или отсутствие роста в остальных штрихах «++»;
- слабый сплошной рост или отдельные колонии в первых двух штрихах «+».

3.6.4.3.3 Реакция агглютинации с монорецепторными *A* и *M* бруцеллезными сыворотками

Проведение испытания

Для проведения РА монорецепторные *A* и *M* бруцеллезные сыворотки разводят последовательно двукратно, получая соотношения 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80 в объеме 0,5 см³. В качестве антигена используют взвесь двухсуточной агаровой культуры бруцелл в физиологическом растворе в концентрации 2 млрд/см³ микробных клеток по оптическому стандарту мутности.

Антиген добавляют по 0,5 см³ во все пробирки таким образом, разведение сыворотки удваивается (1:10, 1:20 и т. д.).

Пробирки со смесью сыворотки и антигена выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 16-18 ч. а затем в течение 1 ч при комнатной температуре.

Учет результатов

Положительная РА в разведении сыворотки 1:20 с оценкой не менее чем на два креста позволяет отнести культуру бруцеллы к виду *B. abortus* или *B. malitensis*.

3.6.4.3.4 Определение чувствительности культур бруцелл к фагу *Tb*

Бруцеллезный фаг *Tb* избирательно лизирует бруцеллы вида *B. abortus*, находящиеся в S-форме.

Подготовка к исследованию

Для определения чувствительности бруцелл к лизису бактериофагом используют два его разведения: 1×10⁵ корпускул/см³ и 1-10⁹ корпускул/см³. Разведения бактериофага готовят путем десятикратных разведений исходной культуры в физиологическом растворе.

Проведение исследования

Для исследования используют МППГТА в чашках Петри с концентрацией агара 1,5-1,8%.

Среду и взвесь двухсуточной агаровой культуры бруцелл в физиологическом растворе с концентрацией 1 млрд/см³ микробных клеток по ОСО мутности на 10Е подсушивают при комнатной температуре в течение 18-20 ч.

Взвесь культуры бруцелл подсушивают при комнатной температуре в течение 18-20 ч. в объеме 0,4×0,5 см³ наносят на поверхность МППГТА в чашках Петри и тщательно распределяют по его поверхности. Избыток посевного материала удаляют пастеровской пипеткой.

Засеянные чашки Петри подсушивают в течение 1 ч при температуре 37-38 °С до полного впитывания в агар посевного материала. После чего на поверхность питательной среды в два разных места наносят пастеровской пипеткой по одной капле 0,05 см³ бактериофага каждого разведения. Чашки наклоняют, чтобы капли бактериофага стекли по поверхности питательной среды двумя дорожками. Контролем являются посевы культуры бруцелл на среде без внесения бактериофага.

Посевы помещают в термостат агаром вверх и инкубируют в течение четырех-пяти суток при температуре 37-38 °С.

Учет результатов

Результаты исследования учитывают в крестах:

- полный лизис культуры на месте нанесения фага (или линии стекания) «++++»;
- лизис с небольшим количеством отдельных колоний бруцелл или слившиеся бляшки (участок лизиса) в виде сот «+++»;

- резко ослабленный рост культуры бруцелл и небольшое количество бляшек «++»;
- очень слабый лизис культуры бруцелл «+»;
- отсутствие лизиса культуры бруцелл «-».

За положительный результат чувствительности к лизису фагом принимают лизис культуры бруцелл не менее чем на два креста..

3.6.5 Биологический метод

3.6.5.1 Подготовка к исследованию

Для постановки биологической пробы используют морских свинок (не менее двух животных), не реагирующих на бруцеллез при серологическом исследовании в пробирочной РА. Пробы сыворотки крови от животных в разведении 1:5 не должны агглютинировать S-бруцеллезный антиген.

3.6.5.2 Проведение исследования

Из органов и содержимого желудка абортированного плода готовят суспензию на стерильном физиологическом растворе в соотношении 1:10 и вводят морской свинке подкожно с внутренней стороны бедра в объеме 1 см³.

Из плаценты и плодовых оболочек, предварительно обработанных тампонами, смоченными дезинфицирующим раствором, и подсушенных сухими стерильными тампонами, вырезают кусочки размером 0,5×0,5 см. фламбируют на пламени горелки, растирают в фарфоровой ступке со стерильным песком или гомогенизируют и заливают физиологическим раствором в соотношении 1:10. Полученную суспензию вводят морской свинке подкожно в объеме 1 см³.

Содержимое гигром, бурс вводят морским свинкам подкожно в объеме 0,2-0,3 см³. При этом необходимо учитывать возможность гибели животного от сопутствующей микрофлоры, особенно стрептококков.

Пробы молока центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об/мин. Морской свинке вводят подкожно 2-3 см³ материала из верхнего слоя (сливки) и осадка молока после центрифугирования.

Через 15, 25 и 40 сут после заражения у морских свинок берут кровь в объеме 1-2 см³ из ушной вены путем надреза или из сердца путем пункции и готовят сыворотку, которую исследуют в РА в пробирках в разведениях от 1:10 до 1:80.

При положительной реакции агглютинации в разведении 1:10 и выше морских свинок убивают. В случае необходимости получения культуры возбудителя материал от них исследуют бактериологически (раздел 8). высевы делают пастеровскими пипетками в одну пробирку с бульоном и две пробирки с агаром из паховых, подчелюстных, заглочных, парааортальных лимфатических узлов (правых и левых), селезенки (два посева), печени и костного мозга. Посевы культивируют

3.6.5.3 Учет результатов

При отрицательной РА у морских свинок биопробу считают отрицательной, подопытных животных убивают, бактериологическое исследование не проводят.

При выделении культуры бруцелл на питательных средах биологическое исследование прекращают. а ранее зараженных морских свинок убивают.

Результат исследования на бруцеллез считают положительным при получении у морской свинки положительной РА в разведении сыворотки крови 1:10 и выше, даже если из исходного материала культура бруцелл не выделена.

3.6.6 Молекулярно-генетический метод исследований

Молекулярно-генетическое исследование на бруцеллез проводят с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). руководствуясь инструкциями по применению конкретных тест-систем.

Молекулярно-генетическое исследование методом ПЦР проводят в случае аборта и (или) при появлении у животных других клинических признаков, вызывающих

подозрение на бруцеллез, а также при получении положительных и (или) сомнительных результатов серологического исследования на бруцеллез животных, не иммунизированных противобруцеллезными вакцинами из хозяйств, благополучных по данному заболеванию и для идентификации культур бруцелл (изолятов), выделенных при исследовании патологического материала.

Для исследования в ПЦР используют тот же патологический материал, что и для бактериологической диагностики.

4. ЛЕПТОСПИРОЗ

(лат., англ. – **Leptospirosis**; фр., нем. – **Leptospirose**)

(синонимы болезни: **болезнь Вейля, тиф собак**)

За годы, прошедшие с момента описания болезни Васильева-Вейля, иктерогемоглобинурии крупного рогатого скота и открытия лептоспир, достигнуты значительные успехи в изучении биологии возбудителя, этиологии и эпидемиологии болезни, диагностике, организации профилактики и мер борьбы. Характер и локализация природных очагов лептоспироза и их структура в значительной степени определяются особенностями распространения и образом жизни диких животных – носителей лептоспир. Для успешной борьбы с инфекцией необходимо знать эпизоотическую ситуацию, этиологическую структуру, источники и пути передачи, роль диких и домашних животных в эпизоотическом процессе. Определенные трудности в лабораторной и дифференциальной диагностике лептоспироза, разноречивые рекомендации по организации мер борьбы с данным заболеванием обуславливают сложности в изучении болезни, оздоровлении хозяйств и профилактике заражения человека. Лептоспироз наносит значительный экономический ущерб, как народному хозяйству, так и постоянно угрожает здоровью и жизни людей.

Лептоспироз – остро протекающая природно-очаговая болезнь животных многих видов и человека, проявляющаяся кратковременной лихорадкой, гемоглобинурией или гематурией, геморрагиями, желтушным окрашиванием и очаговыми некрозами слизистых оболочек и кожи, атонией желудочно-кишечного тракта, абортами, маститами, рождением нежизнеспособного потомства, периодической офтальмией и менингоэнцефалитами, снижением продуктивности животных.

Лептоспироз человека и животных долгое время не могли дифференцировать от сходно проявляющихся с ним болезней. Лишь в конце XIX в. впервые в Германии было представлено подробное описание клинической картины, так называемой, инфекционной желтухи человека, позволившее выделить ее в качестве самостоятельной нозологической формы (А. Weil, 1886; Н.П. Васильев, 1888). В последующем в честь этих исследователей болезнь получила название "болезнь Вейля-Васильева". В 1904 г. в немецком журнале была опубликована работа Е. Дьяченко с описанием клинических признаков иктерогемоглобинурии у крупного рогатого скота на Кубани. Однако возбудитель болезни был открыт лишь в 1914 г. в Японии Инадо с соавт. и назван ими *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. В 1928 г. С.И. Тарасов и Г.В. Эпштейн выделили самостоятельный тип *L. grippotyphosa*. В 1935 г. С.Н. Никольский с соавт. описали болезнь у крупного рогатого скота.

Болезнь встречается во всех странах мира, поражая значительные группы людей, сотни и тысячи голов сельскохозяйственных животных. По опасности, эпидемиологической значимости и экономическому ущербу лептоспироз не уступает туберкулезу и бруцеллезу.

4.1. Этиология

Возбудители болезни относятся к роду *Leptospira* (от гр. *leptos* – легкий, *speria* – виток). Критерием для классификации патогенных лептоспир служит их антигенный

состав. Идентифицировано более 230 сероваров патогенных лептоспир, объединенных на основании антигенного родства в 23 серологические группы. На территории России обнаружено около 30 сероваров. Наиболее часто встречаются следующие: *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Sejroe*, *Hardjo*, *Tarassovi*. Лептоспиры — микроорганизмы спиралевидной формы, размером 6-24×0,2-0,4 мкм. Число завитков спирали достигает 20. Концы микроба изогнуты в виде крючков, что делает их легко узнаваемыми при микроскопии. Под микроскопом в темном поле зрения и так называемой раздавленной капле лептоспиры имеют вид тонких, оживленно и разнообразно движущихся серебристых нитей. Лептоспиры культивируются в жидких и плотных питательных средах, содержащих сыворотку крови кролика или барана, сывороточный альбумин, жирные кислоты, многоатомные спирты, витамины группы В. Факторами патогенности лептоспир являются экзо- и эндотоксины, плазмокоагулаза, липаза, фибринолитический фермент, эстераза и др.

Лептоспиры по степени устойчивости к действию факторов внешней среды, физических и химических средств приравниваются к вегетативным формам бактерий. Устойчивость: в моче КРС, свиней — от 4 до 6-7 ч, почках — 12 ч-12 дн, в мышечной ткани — 48 ч, свежем молоке — 8-24, в воде озер и рек до 200 дн, в сточных водах — до 10 дн, в навозе — 24 ч. нагревание до 76-96°C — моментально, высушивание и солнечные лучи — за 2 ч, в замороженной сперме — 1-3 года (срок наблюдения), в навозной жиже — 24 часа, во влажной почве с нейтральной или слабощелочной реакцией — до 279 дней Низкие температуры консервируют лептоспир

Дезрастворы 0,25% р-р активного хлора, 5% карболовой кислоты, 0,25% формальдегида, 0,1% HCl — 5 мин, 1% р-р NaOH — моментально. Чувствительны к тетрациклину, пенициллину и стрептомицину.

4.2. Эпизоотология

К лептоспирозу восприимчивы более ста видов диких и домашних животных, наиболее чувствителен молодняк. В естественных условиях лептоспирозом чаще болеют свиньи и крупный рогатый скот. Болеют животные любого возраста, но молодняк более восприимчив. Выражена видовая чувствительность животных к лептоспирам определенных серологических групп и вариантов. Основными возбудителями лептоспироза являются: у свиней — *Pomona* и *Tarassovi*, у крупного рогатого скота - *Hebdomadis*, *Pomona* и *Grippotyphosa*; у мелкого рогатого скота - *Grippotyphosa*, *Pomona* и *Tarassovi*.

Источниками и резервуарами патогенных лептоспир являются как сельскохозяйственные, так и дикие животные. Они выделяют возбудителя во внешнюю среду различными путями: с мочой, фекалиями, молоком, спермой, через легкие, с истечениями из половых органов. Лептоспирами *Tarassovi* и *Pomona* в большинстве случаев свиньи заражаются только от свиней, а крупный рогатый скот - только от крупного рогатого скота. Может наблюдаться межвидовое заражение. Лептоспирами *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola* сельскохозяйственные животные инфицируются от основных хозяев этих лептоспир: серых крыс и собак. Лептоспироз, вызванный этими возбудителями, протекает спорадически и не поражает большие группы животных.

Особую эпизоотологическую и эпидемиологическую опасность представляют "бессимптомно" больные животные-лептоспираносители. Количество лептоспираносителей на неблагополучной ферме среди крупного и мелкого рогатого скота колеблется от 1-5 до 10-20%; среди свиней - 30-80%. Срок лептоспираносительства после переболевания или скрытого инфицирования:

- у крупного рогатого скота 1,5-6 месяцев;
- у овец, коз - 6-9 месяцев;
- у свиней - от 15 дней до 2 лет;
- у собак - от 110 дней до 3 лет;
- у кошек - от 4 до 119 дней;

- у кур, уток, гусей - от 108 до 158 дней.
- у человека - от 4 недель до 11 месяцев.

Животные заражаются лептоспирозом чаще при водопое, при поедании трупов грызунов-лептоспиросителей или кормов, инфицированных мочей этих грызунов.

Среди факторов передачи возбудителя водный путь является основным. Особую опасность представляют невысыхающие лужи, пруды, болота, медленно текущие речки, влажная почва.

Лептоспиры проникают в организм:

- через поврежденные участки кожи (*царапины, порезы, раны, укусы*);
- слизистые оболочки ротовой и носовой полостей, глаз, половых путей;
- через желудочно-кишечный тракт.

Лептоспироз чаще встречается в местностях, где почва влажная, содержит много гумуса, имеет нейтральную или слабощелочную реакцию.

Болезнь наблюдают в любое время года, но у животных с пастбищным содержанием - преимущественно в летне-осенний период. Лептоспироз проявляется в виде небольших эпизоотий и спорадических случаев. Главной эпизоотологической особенностью лептоспироза сельскохозяйственных животных в настоящее время является преобладание бессимптомных форм инфекции в виде лептоспиросительства и лептоспирозной иммунизирующей субинфекции.

4.3. Клинические признаки

Инкубационный период длится от 3-5 до 14-20 дней. В это время интенсивно размножаются и накапливаются лептоспиры в органах и тканях. Клинические признаки болезни в этот период времени отсутствуют.

В фазе лептоспиремии происходит размножение лептоспир в крови, что приводит к резкому повышению температуры тела. С 3-5-го дня болезни в крови появляются агглютинирующие и лизирующие лептоспир антитела. Повышение концентрации иммуноглобулинов в течение 1 недели разрушает возбудителя в кровяном русле.

Токсическая фаза характеризуется действием эндотоксинов, образующиеся в результате распада лептоспир, вызывающие поражения клеток крови и паренхиматозных органов. Разрушаются эритроциты (развивается анемия), в крови накапливается гемоглобин, который не используется полностью пораженной печенью. Эту функцию берут на себя клетки РЭС в различных тканях. Образующийся непрямой билирубин адсорбируется тканями, окрашивая их в желтый цвет. Фильтрационная способность почек нарушается, в моче появляются гемоглобин, а иногда и эритроциты. Формируется клинический признак – гемоглобинурия (или гематурия). Стенки капилляров органов и тканей становятся хрупкими, проницаемость их повышается, появляются кровоизлияния в почках, легких, эндокарде, на слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта и коже.

В результате интоксикации капилляры кожи и слизистых оболочек сужаются, закупориваются тромбами. Это нарушает питание тканей и вызывает появление некрозов. Аборты происходят вследствие изменений, происходящих в плаценте, и нарушения нормальных физиологических взаимоотношений между матерью и плодом, кислородного голодания и интоксикации плода, а также в результате проникновения лептоспир в зародышевый организм. В большинстве случаев аборт наступает через 2-5 недель после заражения или через 2-3 недели после маточной фазы лептоспиремии. Абортированный плод может оставаться в утробе матери в течение 24-48 часов до выкидыша. Инфицированные во второй половине беременности плоды могут выживать вследствие продукции собственных антител.

Токсическая фаза болезни может закончиться смертью животного либо его выздоровлением. Причиной смерти является или сердечная недостаточность в результате анемии, или уремия - в результате тяжелого поражения почек. В резистентном организме увеличение в крови количества антител сопровождается постепенным уничтожением лептоспир во всех тканях и органах, кроме почек. Здесь лептоспиры могут еще долго

после клинического выздоровления животного размножаться и выделяться из организма. Это объясняется тем, что лептоспирры, находясь в извитых канальцах почек, защищены от действия антител, которые связаны с иммуноглобулинами.

4.4. Патологоанатомические изменения

Патологоанатомические изменения характеризуются желтухой или анемией, геморрагическим диатезом, некрозами кожи и слизистых оболочек, дегенеративно-воспалительными изменениями паренхиматозных органов. Наиболее выражены изменения находят в печени и почках. Печень увеличена в объеме, перерождение. Цвет глинисто-красный, консистенция дряблая, упругая. Желчный пузырь растянут и переполнен тягучей желчью темно-бурого цвета.

Почки увеличены в объеме, дряблые, окрашены в вишнево-глинистый, серовато-красный, а иногда в темно-коричневый с зеленоватым оттенком цвет. Лимфоузлы увеличены и желтушны. Слизистая оболочка мочевого пузыря покрыта кровоизлияниями, моча красная.

4.5. Лептоспироз у человека

Лептоспироз человека – остро протекающая инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, симптомами общей интоксикации, поражением почек, печени, нервной системы. В тяжелых случаях наблюдают желтуху, геморрагический синдром, острую почечную недостаточность и менингит.

Люди в большинстве случаев заражаются при купании и использовании для хозяйственных и бытовых нужд инфицированной воды из открытых водоемов; при употреблении продуктов питания, инфицированных грызунами, а также сырого молока от больных коров. Заболевания могут иметь профессиональный характер. Нередки случаи заболевания работников угольных шахт, охотников, рыболовов, животноводов, ветработников, рабочих убойных пунктов и мясокомбинатов, дератизаторов, зоологов и др.

В умеренной зоне болезнь регистрируют чаще в июне-августе. Клинически лептоспироз характеризуется внезапным началом, лихорадкой (38,5-40°C), гиперемией лица и зева, инъекцией сосудов конъюнктивы, ригидностью затылочных мышц и ознобом. Через несколько дней на коже появляется полиморфная сыпь, ощущаются сильные боли в бедренных и икроножных мышцах. Развиваются общая слабость, желтуха, значительная головная боль, потеря аппетита, тошнота, рвота. Печень увеличена.

Профилактика лептоспироза у людей основывается на комплексе плановых медико- и ветеринарно-санитарных мероприятий: уничтожении или лечении животных-лептоспираносителей; разрыве путей передачи возбудителей инфекции (охрана водоема и водоисточников, пищевых продуктов от инфицирования); защите людей, находящихся в эпизоотическом очаге.

4.6. Лабораторная диагностика

Лабораторную диагностику лептоспироза осуществляют на основании ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза», утвержденный и введенный в действие постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР №2240 от 27.12.1991 года.

Материалом для исследований служит кровь, моча, органы и ткани, а также трупы мелких животных. От трупов крупных животных берут сердце, кусочки паранхиматозных органов, почку, транссудат из грудной и брюшной полостей, перикардальную жидкость, мочевой пузырь с содержимым, спинномозговую жидкость.

Абортированный плод доставляют в лабораторию целиком или берут желудок с содержимым, сердце и паранхиматозные органы плода.

Кровь для серологического исследования берут в количестве 5-10 см³ не ранее чем через 5-7 сут после проявления клинических признаков болезни или через 90 сут - для крупного рогатого скота, 60 сут - для свиней и животных других видов после введения

вакцины. Кровь для бактериологического исследования берут в период лихорадки на 1-7 сут болезни.

Мочу собирают при естественном мочеиспускании в чистые пробирки. У коров и свиноматок допускается брать мочу катетером. Мочу микроскопируют непосредственно в хозяйствах.

Почку извлекают в невскрытой капсуле. Сердце, мочевой пузырь и желудок плода берут с содержимым, для чего накладывают лигатуры на соответствующие сосуды и сфинктеры. Каждый орган или кусочек органа заворачивают в целлофановый пакет.

Ликвор, трансудат, спинномозговую жидкость и другие жидкие субстраты насаживают стерильным шприцем или пипеткой в стерильные пробирки.

Пробами для гистологического исследования служат кусочки коркового слоя почек и печени объемом не более 1 см³, консервированные 10%-ным раствором формалина.

Пробы патологического материала должны быть исследованы с момента взятия в течение 6 ч в летнее время и 10-12 ч при хранении его в охлажденном состоянии.

Микроскопия мочи должна быть закончена при температуре: 30-40 °С в течение 3 ч, 25-30 °С - 4-5 ч, 20-25 °С - 6-8 ч, 16-20 °С - 10-12 ч с момента взятия.

Взятые пробы помещают в ящик, опечатывают и направляют в лабораторию с нарочным (курьером).

В сопроводительном документе к пробам патологического материала указывают время гибели животного или время взятия проб при жизни.

4.6.1. Серологический метод

Метод основан на обнаружении специфических антител в крови животных реакцией микроагглютинации (РМА) и реакцией иммуноадсорбции (РИА).

4.6.1.1. Реакция микроагглютинации

Антигены - живые культуры штаммов лептоспир, указаны в таблице 1

Таблица 1

Серогруппа	Серовар	Рекомендуемые штаммы*
Pomons	pomona	Pomona
Tarassovi	tarassovi	Perepelicin (Mitis Johnson)
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V (Valbuzzi)
Hebdomadis	kabura (borincana, hebdomadis)	Kabura (HS-22, Hebdomadis)
Sejroe	polonica (sejroe, wolffi, hardjo)	493 Poland (M-84, 3705, Hardjoprajitno)
Mini	szwajizak	Szwajizak
Icterohaemorrhagiae	copenhageni (icterohaemorrhagiae)	M-20, Wajjnberg (RgA)
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
Bataviae	djatzi (bativiae)	HS-26 (Van Tienen)
Javanica	poi (javanica)	Poi (Veldrat Dataviae 46)
Australis	australis (bratislava)	Ballico (Iez Bratislava)
Autumnalis	autumnalis (rachmat)	Akijami A (Rachmat)
Ballum	ballum (castellonis)	Mus 127 (Castellon 3)
Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
Cynopteri	cynopteri	Vleermuis 3568 (3522C)
Panama	panama	CZ-214-K
Celledoni	celledoni	Celledoni
Shermani	shermani	LT-821
Djasiman	djasiman	Djasiman
Sarmin	sarmin	Sarmin

Louisiana	louisiana	LSU-1945
Ranarum	ranarum	ISF
Manhao	manhao	L 105

* В скобках приведены штаммы-аналоги. Кроме рекомендуемых могут быть использованы и другие штаммы лептоспир.

4.6.1.1.1. Подготовка к исследованию

Предметные и покровные стекла, не бывшие в употреблении, кипятят в мыльном растворе в течение 30 мин, промывают проточной водой, ополаскивают дистиллированной водой и насухо протирают.

Стекла после употребления опускают в эксикатор с 1%-ным раствором соляной кислоты или другим дезинфицирующим веществом. После накопления достаточного количества использованных стекол кислоту сливают, стекла промывают в проточной водопроводной воде, кипятят в мыльном растворе, промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и протирают.

Пластины с лунками после проведения в них реакции опускают для обеззараживания в 1%-ный раствор соляной кислоты и выдерживают не менее 1 ч. Затем их промывают в теплой мыльной воде, протирают ершиком каждую лунку, тщательно отмывают в проточной водопроводной воде, заливают дистиллированной водой и выдерживают до следующего утра. Утром воду сливают и пластины просушивают. Перед постановкой реакции каждую лунку дополнительно протирают тампоном из ваты.

Для исследований используют свежую, замороженную, высушенную на фильтровальной бумаге, консервированную фенолом или борной кислотой сыворотку крови. Для консервации сыворотки фенол добавляют в виде 5%-ного раствора при постоянном помешивании из расчета 0,05 см (1 капля) на каждый кубический сантиметр сыворотки. Борную кислоту вносят в сыворотку до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка кристаллов. Кристаллы кислоты не должны попадать в пипетку во время постановки реакции.

При консервации сыворотки методом высушивания на квадраты белой фильтровальной бумаги (5x5 см) наносят по 3-5 капель (0,05 см каждая) сыворотки.

Высушивание проводят при комнатной температуре или в термостате при температуре (37±1) °С. Высушенные пробы сыворотки пригодны для исследования в течение месяца.

Гемолизированную, загнившую, плесневелую и проросшую сыворотку не исследуют.

Сыворотку разбавляют физиологическим раствором: 1) невакцинированных животных 1:25; 2) вакцинированных животных 1:50.

После добавления антигена разведения удваиваются и составляют соответственно: 1:50 и 1:100.

При необходимости сыворотку разбавляют в соотношениях 1:100, 1:200, 1:400 и т.д. до титра.

Сыворотку крови вакцинированного крупного рогатого скота исследуют в РМА через 3 мес, животных других видов - через 2 мес после вакцинации.

При исследовании сыворотки, высушенной на фильтровальной бумаге, вырезают одну или две капли (0,05 или 0,1 см) сыворотки, измельчают ножницами и заливают в пробирке физиологическим раствором в объеме 2,45 или 4,9 см , экстрагируют в течение 1 ч при температуре (37±1) °С. Полученный экстракт используют как исходное разведение сыворотки 1:25 или 1:50.

Сыворотку крови животных при ввозе их в хозяйство и вывозе из него для племенных целей и целей воспроизводства разводят 1:25 и исследуют только в одном разведении (после добавления антигена разведение сыворотки будет соответствовать

1:50).

При изучении этиологической структуры и обследовании импортируемого скота реакцию ставят со всеми приведенными в таблице антигенами, при обследовании животных в хозяйствах с известной этиологией и при перевозках внутри страны реакцию ставят с антигенами 4-7 серогрупп (Pomona, Tarassovi, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae).

Диагностические штаммы лептоспир лаборатории получают во Всесоюзном государственном научно-контрольном институте ветеринарных препаратов не реже одного раза в год.

Пригодность культуры для использования в реакции оценивают просмотром в проходящем свете и микроскопией. При достаточном накоплении лептоспир после встряхивания пробирки с культурой в среде в проходящем свете хорошо заметны муаровые волны, а в спокойном состоянии наблюдается легкая опалесценция. Наличие осадка, пленки, помутнения среды свидетельствует о прорастании посторонней микрофлоры, полная прозрачность среды - об отсутствии роста лептоспир.

В реакции используют чистые культуры лептоспир в возрасте 5-15 сут без признаков агглютинации и лизиса с накоплением 70-100 микробных клеток в поле зрения микроскопа при увеличении 40x1,5x7 или 40x7-10.

Через каждые 3 мес лаборатории контролируют диагностические штаммы лептоспир в реакции микроагглютинации (РМА) с групповыми агглютинирующими сыворотками.

4.6.1.1.2. Проведение исследования

Для постановки РМА разведенную сыворотку разливают мерной пипеткой или аппаратом Флоринского, начиная с большего разведения, в лунки агглютинационных пластин или пробирки по 0,1 см в каждую.

Сыворотку из каждого разведения разливают в отдельный ряд, состоящий из 4-23 лунок (пробирок) в зависимости от количества антигенов, используемых в реакции.

Каждую культуру-антиген вносят по 0,1 см в 1-3 лунки в зависимости от количества разведений сыворотки. После добавления антигенов пластины встряхивают и выдерживают в термостате при 30-37 °С в течение 1 ч.

Контрольной служит смесь 0,1 см культуры лептоспир с 0,1 см физиологического раствора. Лептоспиры в контрольном варианте должны оставаться подвижными, не иметь признаков лизиса и агглютинации.

Реакцию учитывают микроскопией каплей из каждой лунки в темном поле микроскопа при увеличении 20x10 или 40x7x1,5. Капли из лунок наносят на предметное стекло бактериологической петлей от большего разведения к меньшему и просматривают их без покровного стекла. Капли наносят двумя способами: бактериологической петлей диаметром 3 мм наносят на стекло сразу до 30 капель и просматривают их под микроскопом; бактериологической петлей диаметром 1 мм наносят на предметное стекло в освещенный центр поля зрения одну каплю и просматривают ее, передвигая столик на 2-3 мм, и рядом с первой наносят и учитывают вторую каплю. Перед взятием каждого нового антигена петлю прокалывают и охлаждают.

Результаты реакции оценивают в крестах:

++++	агглютинированы 100% лептоспир;
+++	агглютинированы 75% лептоспир;
++	агглютинированы 50% лептоспир;
+	агглютинированы 25% лептоспир;
-	агглютинация отсутствует.

Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир и образовании паучков. Паучок включает от 3-5 до нескольких десятков и сотен лептоспир. Свободные концы

лептоспир сохраняют подвижность.

В начальных разведениях сыворотки может наблюдаться лизис лептоспир, проявляющийся в набухании и прекращении движения клеток, появлении зернистости и полного распада микробных клеток.

4.6.1.1.3. Оценка результатов

Положительной считают РМА, оцененную на два креста и более при отсутствии агглютинации в контроле.

Наличие специфических антител в сыворотке крови животных в титре 1:50 у невакцинированных - 1:100 у вакцинированных и выше свидетельствует об инфицировании данной особи лептоспирами и возможном лептоспиноносительстве.

РМА специфична в любом разведении, а наличие антител в любом титре свидетельствует об унифицировании данной особи лептоспирами и возможном лептоспиноносительстве.

По результатам серологических исследований возбудителями лептоспироза считают лептоспиры той серологической группы, к которой обнаружены антитела в наиболее высоком титре.

Необходимо учитывать, что в сыворотке крови свиней, лошадей, крупного и мелкого рогатого скота при исследовании в РМА обнаруживают в 5-15% случаев антитела в наиболее высоком титре к лептоспирам: *Autumnalis*, *Synopteri*, *Bataviae*, *Pyrogenes*, *Australis*, которые не выделяют у сельскохозяйственных животных. Такие реакции следует рассматривать как межгрупповые.

Лептоспиры названных серогрупп могут быть признаны возбудителями лептоспироза у сельскохозяйственных животных только после выделения в чистой культуре или подтверждения их роли исследованием пробы сыворотки в реакции иммуноадсорбции.

В случае выявления реакций с лептоспирами необычных для сельскохозяйственных животных серогрупп проводят повторное исследование сыворотки крови в РМА с интервалом 10-12 сут с целью освобождения от межгрупповых реакций без проведения иммуноадсорбции.

4.6.1.2. Реакция иммуноадсорбции

4.6.1.2.1. Проведение исследования

В реакции иммуноадсорбции изучают пробы сыворотки животных, агглютинирующие лептоспир нескольких серологических групп в разных титрах или имеющие наиболее высокий титр по отношению к лептоспирам, ранее не известным в качестве возбудителя лептоспироза у сельскохозяйственных животных.

Для проведения адсорбции выращивают во флаконах вместимостью 0,5-1,0 дм все штаммы лептоспир, с которыми данная проба сыворотки дала реакцию агглютинации, 5-7 сут культуры лептоспир осаждают центрифугированием с частотой вращения 10000 об/мин в течение 30 мин. Сливают надосадочную жидкость, осадок подсушивают, 0,1 см исследуемой сыворотки смешивают с 0,9 см физиологического раствора и дробно в три приема с интервалом 10 мин добавляют к осадку антигена, суспендируя его после каждой порции разведенной 1:10 сыворотки. Смесь выдерживают в течение 24-48 ч при 1-5 °С и отделяют сыворотку центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 мин. Адсорбированную сыворотку проверяют в РМА на наличие остаточных антител к штамму-адсорбенту, а затем при отрицательных результатах исследуют с лептоспирами всех серогрупп, с которыми реагировала сыворотка до адсорбции.

Для сокращения объема работы сыворотку целесообразно в начале адсорбировать лептоспирами, являющимися частыми возбудителями болезни у животных данного вида.

4.6.1.2.2. Оценка результатов

В процессе адсорбции лептоспиры, являющиеся возбудителем инфекции у данной особи, извлекают из сыворотки антитела к лептоспирам всех серологических групп, в то время как антитела к возбудителю болезни не адсорбируются из сыворотки

гетерологичными типами лептоспир.

Возбудителями инфекции являются лептоспиры той серогруппы, антигены которой извлекают из сыворотки антитела к лептоспирам всех серологических групп.

4.6.1.3. Учет результатов серологических исследований.

По результатам серологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство (ферму, отделение и т.д.) неблагополучным по лептоспирозу, если специфические антитела обнаружены в сыворотке крови при однократном исследовании в РМА в титре 1:100 у вакцинированных и 1:50 и выше у невакцинированных более чем у 20% обследованных животных.

Лептоспироз считают причиной абортов при обнаружении антител в сыворотке крови абортированного плода и предположительно при высоком титре антител (1:2500 и более) в группе абортированных животных и низком титре (до 1:500) или отрицательной реакции в группе здоровых животных.

Лептоспиры серогрупп *Autumnalis*, *Cynopteri*, *Bataviae*, *Pyrogenes*, *Australis*, *Ballum* могут быть признаны возбудителями лептоспироза животных только после выделения из органов павших животных или подтверждения их роли исследованием пробы сыворотки в реакции иммуноадсорбции.

4.6.2. Бактериологический метод

Метод заключается в обнаружении лептоспир в исследуемом материале путем микроскопии в темном поле микроскопа, иммунофлуоресцентным методом, выделения культур лептоспир в специальных средах, постановке биологических проб на лабораторных животных, идентификации и дифференциации выделенных культур.

4.6.2.1 Приготовление препаратов для микроскопических исследований.

Препараты для микроскопических исследований готовят в виде раздавленной капли. Исследуемый материал наносят пипеткой или бактериологической петлей на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, избегая образования пузырьков воздуха. На одном предметном стекле готовят две-три раздавленных капли.

Мочу исследуют непосредственно после взятия или после центрифугирования. Прозрачную мочу, не содержащую кристаллов солей, хлопьев, спермиев и других посторонних частиц, центрифугируют при 10000-12000 об/мин в течение 30 мин, сливают надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в оставшейся капле мочи и микроскопируют.

Мочу, содержащую значительное количество посторонних частиц, очищают центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, затем сливают надосадочную жидкость и центрифугируют ее для осаждения лептоспир при 10000-12000 об/мин в течение 30 мин.

При бессимптомном течении лептоспироза суспензию ткани готовят из кусочков коркового слоя почки, а при остром течении, кроме того, из печени и других органов. У абортированного плода микроскопируют суспензию из всех органов.

Кусочки исследуемого органа массой 2-3 г растирают в ступке с 5-7 см питательной среды, физиологического раствора или стерильной воды до получения гомогенной взвеси. Суспензию отстаивают в холодильнике 1-2 ч или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин и микроскопируют надосадочную жидкость.

4.6.2.2. Проведение исследований.

4.6.2.2.1. При проведении микроскопических исследований исследуемый материал микроскопируют в темном поле микроскопа при увеличении 40x7-10 или 20x1,5x7, а для более детального рассмотрения препарата - при увеличении 40x10-15 или 40x1,5x10.

В каждой капле просматривают не менее 50 полей зрения.

Наличие лептоспир устанавливают по следующим признакам:

Типичные лептоспиры представляют собой спиралеподобные тонкие серебристые нити, концы которых, оба или один, загнуты и булавовидно утолщены. Встречаются и

бескрючковые формы лептоспир. Лептоспиры подвижны. В жидких средах обычными формами движения являются: вращательное, прямолинейное поступательное с одновременным вращением вокруг собственной оси и круговое.

В кислой моче с рН 5,0-6,0 лептоспиры быстро утрачивают подвижность и погибают. Некоторые мертвые клетки сохраняют форму, типичную для лептоспир, но у них по длине тела бывает видна зернистость, концевые крючки довольно часто распрямлены.

Лептоспиры дифференцируют от нитей фибрина, обломков хвостовых частей спермиев, разрушенных эритроцитов, спириллевибриоподобных и других микроорганизмов, а у хряков и от интерспир.

4.6.2.2.2. Методом посева в питательные среды лептоспиры из крови животных выделяют в первые 5-7 сут болезни в период лихорадки. Для этой цели кровь из яремной вены или ушной вены вносят через стерильную иглу по 3-5 капель в 5-7 пробирок с питательной средой или высевают из пробы крови, присланной в лабораторию.

От трупа при диагностическом убое высевают пастеровской пипеткой кровь из сердца, ткани печени и почки, а от абортрованного плода, кроме того, и из содержимого желудка. При убое клинически здоровых животных высевы делают из почки и мочевого пузыря. Из каждого органа засевают 3-5 пробирок с питательной средой.

Для выделения культур из почки ее освобождают от капсулы, поверхность прижигают, пипетку вводят параллельно поверхности в корковый слой. Высев делают у крупного рогатого скота из 2-3 долей, у свиней - из нескольких участков почки.

Высевы из других органов делают пастеровской пипеткой, которой насасывают материал, предварительно прижигая поверхность органа шпателем.

Мочу, ликвор, околосоудный и брюшной транссудат и другие жидкие биосубстраты засевают по 1-3 капли в 3-5 пробирок с питательной средой.

Посевы культивируют при 28-30 °С в течение 3 мес. Лептоспиры, размножаясь в питательной среде, не изменяют ее внешнего вида. Поэтому для выявления роста лептоспир через 3, 5, 7, 10 и далее каждые 5 сут культивирования из всех пробирок микроскопируют капли, которые наносят на предметное стекло бактериологической петлей. Большинство культур вырастает через 7-20 сут.

Иногда лептоспиры обнаруживают в среде на 3-5-е сутки или через 1-2 мес и очень редко - через 2-3 мес культивирования.

Содержимое каждой пробирки, в которой обнаружены лептоспиры, пересевают в 3-5 пробирок со свежей питательной средой. Пробирки с обильным ростом посторонней микрофлоры выбраковывают, остальные пересевают на питательные среды с антибиотиками или лептоспиры подвергают очистке.

4.6.2.2.3. Выделанные культуры лептоспир идентифицируют с помощью лептоспирозных групповых агглютинирующих сывороток в перекрестной реакции микроагглютинации в соответствии с п.6.2.1.1 и наставлением по применению агглютинирующих лептоспирозных сывороток, при необходимости в реакции иммуноадсорбции или методом моноклональных антител.

Пересевы культур лептоспир проводят пастеровскими пипетками.

В пробирку с 5-10 см питательной среды вносят 0,5-1,0 см культуры. Максимальное накопление лептоспир наблюдается через 4-7 сут культивирования при 28-30 °С.

Рост и чистоту культур лептоспир в жидких питательных средах контролируют микроскопически в темном поле микроскопа и макроскопически - просмотром пробирок с культурами в луче света от осветителя. При этом после встряхивания в питательной среде четко просматриваются муаровые волны, образуемые выросшей культурой.

Культуру лептоспир пересевают через каждые 12-15 сут не менее чем в три пробирки.

Штаммы лептоспир, постоянно поддерживаемые в лаборатории, хранят в

пробирках под вазелиновым маслом, в запаянных ампулах, в морозильной камере при минус 60-70 °С или при температуре жидкого азота минус 196 °С. Лептоспиры консервируют любым из этих методов после выращивания в сывороточной среде до максимального накопления.

В пробирку на культуру наслаивают 1-1,5 см стерильного вазелинового масла или культуру расфасовывают в стерильные ампулы из нейтрального стекла вместимостью 1-5 см и запаивают. Хранят пробирки и ампулы в темном месте при комнатной температуре без пересевов в течение 3 мес.

Для хранения в замороженном состоянии культуры расфасовывают в ампулы, запаивают, охлаждают до 0-4 °С и помещают в сосуды Дьюара, заполненные азотом, или в морозильную камеру. В жидком азоте лептоспиры хранят без пересевов в течение года, при этом они заметно не изменяют биологических свойств.

Культуры лептоспир, контаминированные другими микроорганизмами, очищают биологическим методом, фильтрацией через бактериальные фильтры или пересевом на плотные питательные среды.

Для очистки биологическим методом загрязненную культуру вводят внутривенно морской свинке или крольчонку в дозе 1-2 см, хомяку или мыши - 0,5 см. Через 30-60 мин кровь из сердца зараженного животного высевают в пробирки с питательной средой, культивируют и ведут наблюдение, как указано выше.

Для очистки методом фильтрации загрязненную культуру фильтруют через асбестовые стерилизующие пластины марки СФ или свечи Шамберляна Л-5. Фильтрат рассеивают в 5-10 пробирок с питательной средой. В посевах из фильтрата получают чистую культуру лептоспир.

Очистку культур лептоспир на плотной питательной среде проводят рассевом исследуемого материала шпателем в несколько чашек Петри. Культуры лептоспир, обильно контаминированные посторонней микрофлорой, разводят физиологическим раствором и из каждого разведения делают посев в чашки Петри на плотную питательную среду. Чашки заклеивают лейкопластырем и посева культивируют при (28±1) °С. Колонии лептоспир появляются на 7-20-е сут культивирования в толще или у поверхности среды и имеют вид прозрачных мелких дисков с хорошо очерченными или размытыми краями, увеличивающихся в размере до 1-2 см или в виде матовых точек диаметром 1-2 мм. Колонии переносят пастеровской пипеткой или бактериологической петлей в жидкую среду и культивируют в термостате до появления роста.

4.6.2.2.4. Серовариантную принадлежность изоляторов лептоспир изучают в реакции иммуноадсорбции, для чего после установления серогрупповой принадлежности в перекрестной РМА определяют степень антигенного родства каждого испытуемого штамма со всеми штаммами-эталоном, входящими в состав данной серогруппы. Для этого с одной стороны исследуют испытуемый штамм со всеми агглютинирующими эталонными сыворотками данной серогруппы, с другой - антисыворотку к штамму-изоляту исследуют со всеми эталонными штаммами этой же серогруппы. Отбирают для сравнения с изучаемым штаммом в перекрестной реакции иммуноадсорбции штаммы-эталоны и антисыворотки с ним, реагирующие хотя бы с одной стороны на 10% гомологичного титра.

Для проведения адсорбции штаммы выращивают во флаконах в течение 7-15 сут при 28-30 °С до накопления 80-150 лептоспир в поле зрения при увеличении микроскопа 40x1,5x10. Культуру осаждают центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок в каждом центрифужном стакане тщательно подсушивают и к осадку трехкратно с интервалом 10 мин добавляют 1 см исследуемой сыворотки, предварительно разведенной физиологическим раствором 1:10, после чего пробирки плотно закрывают резиновыми пробками и выдерживают при 3-5 °С в течение 24 или 48 ч. Для использования в реакции иммуноадсорбции испытуемые сыворотки подводят к стандартному титру 1:3000 по отношению к гомологичной культуре. После

выдерживания смеси в условиях рефрижератора лептоспирсы осаждают центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин, получают истощенную сыворотку, которую исследуют на наличие остаточных антител к штамму-адсорбенту (контроль). При положительных результатах контроля в разведении 1:30 и выше проводят дополнительную адсорбцию сыворотки штаммом адсорбентом с последующим повторным контролем на полноту истощения сыворотки. Сыворотку истощают до получения отрицательных результатов контроля. При отрицательных результатах реакции сыворотку исследуют с гомологичным и гетерологичным антигенами. Разведения исследуемой сыворотки с каждым антигеном составляют 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000, последний принимают за 100%, а каждое разведение соответственно составляет 1, 3, 10, 33 и 100% титра испытуемой сыворотки. Наряду с трехкратным разведением сыворотки используют двукратные разведения.

Испытуемую культуру лептоспир относят к тому серовару, адсорбция которым позволяет добиться полного истощения исследуемой сыворотки.

Два штамма относят к разным сероварам, если после перекрестной адсорбции адекватным количеством гетерологичного антигена 10% или более гомологичного титра постоянно остается при повторных исследованиях хотя бы в одной из двух сывороток.

Серогрупповую или серовариантную принадлежность культур лептоспир также устанавливают методом моноклональных антител. Для чего моноклональные антитела с серогрупповой или серовариантной специфичностью соединяют с адекватным количеством испытуемого антигена, пластины инкубируют при (37 ± 1) °C в течение 30 мин. Учет реакции проводят под микроскопом с конденсором "темное поле". Положительные результаты реакции позволяют отнести испытуемый изолятор к тому моноклону, с которым получена данная реакция. Использование моноклональных антител позволяет быстро (до 1 ч) и точно установить серовариантную принадлежность лептоспир.

4.6.2.2.5. При постановке биологической пробы используют золотистых хомяков в возрасте 20-30 сут, крольчат-сосунов в возрасте 10-20 сут и морских свинок в возрасте 21-35 сут.

Морские свинки наиболее чувствительны к лептоспирам *Icterohaemorrhagiae*, в меньшей степени - к *Rotona* и мало чувствительны к лептоспирам других серологических групп.

Лабораторных животных заражают кровью, мочой, суспензией из паренхиматозных органов животных (абортированного плода) или спермой. Исследуемый материал вводят подкожно или внутрибрюшинно хомякам от 0,3-0,5 до 1 см, крольчатам - от 2 до 3 см.

На каждую пробу исследуемого материала берут по два зверька: одного из них убивают на 4-5 сут, период подъема температуры, другого, если он не погибнет, на 14-16-е сут после заражения. Кровь последнего исследуют в РМА, начиная с разведения 1:10 с лептоспирами 15 серологических групп. Положительная РМА свидетельствует о наличии лептоспир в исследуемом материале.

Высевы из убитых и павших зверьков делают из сердца, печени и почки в 2-3 пробирки из каждого органа. Вторую почку, кусочки печени, транссудат из грудной и брюшной полостей, околосердечную жидкость и содержимое мочевого пузыря микроскопируют.

Культуры лептоспир чаще удается выделить из органов зверьков, имеющих клинические признаки болезни, проявляющиеся лихорадкой, отказом от корма, вялостью, дрожью, взъерошенностью шерсти, конъюнктивитом, желтушностью видимых слизистых оболочек и т.д.

У крольчат и морских свинок после заражения проводят термометрию. В период лихорадки кровь для микроскопии и посева берут из уха или сердца.

В качестве биологической модели для обнаружения лептоспир используют также

взрослых кроликов и морских свинок. Предварительно кровь животных исследуют в РМА на наличие специфических антител. Животных, в сыворотке крови которых не обнаружены специфические антитела, заражают исследуемым материалом. Кровь зараженных животных исследуют 2-3 раза через каждые 7 сут в РМА, начиная с разведения 1:10 с лептоспирами 15 серологических групп. Обнаружение в сыворотке крови зараженных животных специфических антител свидетельствует о наличии лептоспир в исследуемом материале и позволяет ориентировочно судить об их серогрупповой принадлежности.

Вирулентность выделенной культуры изучают на золотистых хомяках или крольчатах, которых заражают внутрибрюшинно 5-7-дневной культурой, содержащей 70-100 лептоспир в поле зрения микроскопа. Высоковирулентные культуры лептоспир вызывают гибель золотистых хомяков в дозе менее 0,1 см, средней вирулентности - 0,2-0,4 см и слабовирулентные - 0,5-1,0 см.

4.6.2.2.6. Диагностика лептоспироза может проводиться с помощью флуоресцирующего глобулина, предназначенного для выявления лептоспир независимо от серогрупповой принадлежности в крови, паренхиматозных органах, трансудате из грудной и брюшной полостей, перикардальной и спинномозговой жидкостях, моче больных и павших животных, органах и тканях абортрованного плода, в воде и почве.

Сухой глобулин разводят стерильной дистиллированной водой до указанного на этикетке ампулы первоначального объема. Растворенный глобулин дополнительно разводят физиологическим раствором с рН=7,4-7,6 до рабочего разведения, указанного на этикетке ампулы, переносят в стерильную пробирку, консервируют мертиолятом в соотношении 1:10000 (0,1 см 1%-ного раствора мертиолята на 10 см глобулина), закрывают резиновой пробкой и хранят при температуре 2-10 °С. Такой глобулин можно использовать в течение месяца при соблюдении условий хранения. Рабочий раствор глобулина без консерванта можно использовать в течение 5 сут, храня его при температуре 2-5 °С.

Препараты из исследуемого материала готовят на тщательно обезжиренных и хорошо промытых предметных стеклах. Новые предметные стекла заливают раствором нашатырного спирта (на 1000 см³ дистиллированной воды 10 см³ нашатырного спирта) на 10 мин, протирают марлевым тампоном, не касаясь поверхности стекол пальцами и два-три раза перекалывают в свежий раствор. Перед использованием стекла вынимают из раствора и высушивают на воздухе.

Использованные стекла кипятят 2 ч в дистиллированной воде с добавлением двух столовых ложек стирального порошка на 5 дм воды. Многократно промывают дистиллированной водой, не касаясь поверхности стекол пальцами, затем отмывают в растворе нашатырного спирта так же, как при обработке новых стекол.

Мазки из мочи, крови, суспензии органов, полосных жидкостей, воды, культуры и т.п. на предметном стекле делают на площади около 2,0x2,5 см³, обводят восковым карандашом на обратной стороне стекла, высушивают при комнатной температуре.

Прозрачную мочу (не содержащую кристаллов соли, спермиев и других посторонних частиц) центрифугируют при 8000-10000 об/мин в течение 30 мин (для осаждения лептоспир), сливают надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в оставшейся капле мочи и наносят на предметное стекло для последующего высушивания и окраски.

Мочу, содержащую значительное количество посторонних частиц, сначала очищают центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, сливают надосадочную жидкость и центрифугируют ее для осаждения лептоспир при 8000-10000 об/мин в течение 30 мин, сливают надосадочную жидкость и делают мазок из ресуспендированного осадка. Для исследования пригодна только свежая моча, хранившаяся не более 10-12 ч при температуре не выше 20 °С. При более высокой температуре допускается хранение мочи до 6-8 ч.

Кровь, взятую от больного, подозрительного по заболеванию или подозреваемого в заражении животного, смешивают с двойным количеством 1,5%-ного раствора лимоннокислого натрия, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин или отстаивают в течение 1 ч. Препараты готовят из прозрачного надосадочного слоя жидкости. Целесообразно осаждение лептоспир из надосадочной жидкости проводить центрифугированием при 8000-10000 об/мин в течение 30 мин.

Суспензию из органов павших (убитых) животных при бессимптомном течении лептоспироза готовят из коркового слоя почек, при остром течении - из ткани почек и печени. У абортрованного плода готовят и исследуют суспензию из всех органов. 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. Вероятность выделения лептоспир в более поздние сроки снижается.

Кусочки исследуемого органа массой 2-3 г растирают в ступке с 5-7 см³ питательной среды или физиологического раствора, или стерильной воды до получения гомогенной взвеси. Суспензию отстаивают в холодильнике 1-2 ч или центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин и делают мазки из надосадочной жидкости.

Препараты из транссудата из грудной и брюшной полостей, содержимого желудка плода и других жидких субстратов готовят по той же методике, что и из мочи. Препараты из культур лептоспир готовят без предварительной обработки путем нанесения на стекло капли культуры.

Пробы воды для исследования центрифугируют при 8000-10000 об/мин в течение 30 мин, сливают надосадочную жидкость, а осадок ресуспенсируют в капле надосадочной жидкости и наносят на предметное стекло.

Мазки высушивают при комнатной температуре, фиксируют ацетоном 5 мин или этиловым спиртом 15 мин и снова высушивают на воздухе.

Для окрашивания препараты размещают горизонтально на мостике. На каждый мазок наносят 3-5 капель разведенного флуоресцирующего глобулина, распределяют его по всей поверхности мазка и выдерживают его при комнатной температуре 20 мин. Для лучшего окрашивания препараты следует периодически покачивать. Затем глобулин сливают.

Препараты промывают водопроводной водой и физиологическим раствором (рН=7,4-7,6) по 5 мин, меняя за это время раствор 4-5 раз. Затем препараты промывают в таком же порядке дистиллированной водой, воду стряхивают и мазки подсушивают на воздухе или используя обогреватель с вентилятором. После этого на мазок наносят небольшую каплю смеси, состоящей из 9 частей глицерина и 1 части 0,05 М фосфатного буфера (рН=8,0 накрывают покровным стеклом, плотно прижимают его к предметному стеклу, удаляя излишки забуференного глицерина).

Для контроля готовят 2-3 мазка одного из диагностических штаммов лептоспир и окрашивают их параллельно с мазками из патологического материала.

Мазки просматривают под люминесцентным микроскопом или биологическим микроскопом.

Увеличение 7х90, сила тока 4,1 А. Микроскопируют через нефлуоресцирующее масло или его заменитель, приготовленный из химически чистого диметилфталата (100 см³) и нафталина сублимированного (1,75 г) или тимола чистого (5,0 г).

Окрашенные флуоресцирующим глобулином лептоспиры имеют зеленоватое, несияющее свечение всей поверхности микроба (в отличие от контурного сияющего свечения микробов других видов). В препарате лептоспиры сохраняют свою форму, просматриваются отдельные вторичные (первичные не видны) завитки спирали, но, как правило, не видны характерные для живых лептоспир булавовидные утолщения на концах, наблюдаемые при темнопольной микроскопии.

Диагноз устанавливают по морфологии лептоспир и интенсивности их свечения,

оцениваемой в крестах:

+++	-	четкое зеленоватое свечение;
++	-	умеренное зеленоватое свечение;
+	-	зеленоватые "тени";
-	-	нет форм, характерных для лептоспир.

4.6.2.3. Оценка результатов.

По результатам бактериологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство неблагополучным по лептоспирозу в любом из следующих случаев:

лептоспиры обнаружены при микроскопическом исследовании в крови или суспензии из органов животных, абортировавшем плоде, моче или органах лабораторного животного;

при обнаружении методом флуоресцирующих антител в патологическом материале микробов с морфологией, типичной для лептоспир с интенсивностью свечения не менее чем в два креста (++);

культура лептоспир выделена из патологического материала или из органа лабораторного животного, зараженного исследуемым материалом.

Лептоспироз считают причиной гибели животных при наличии клинических признаков и патологических изменений, характерных для лептоспироза, специфичность которых подтверждена обнаружением лептоспир в крови или паренхиматозных органах.

Лептоспироз считают причиной абортов при обнаружении лептоспир в органах (тканях) абортировавшего (мертворожденного) плода.

4.6.3. Гистологический метод

Метод основан на обнаружении лептоспир в гистологических срезах, импрегнированных серебром.

4.6.3.1. Проведение исследований (метод Левадити)

Кусочки органов фиксируют в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина в течение 24-48 ч. После фиксации кусочки переносят в 96%-ный этиловый спирт на 24 ч. Промывают в дистиллированной воде до тех пор, пока кусочки не осядут на дно бюксы (не менее 2-3 ч). Воду меняют три раза. Затем кусочки помещают в 1-3%-ный раствор азотнокислого серебра на 3-6 ч. Процесс серебрения ведут при (37 ± 1) °С. Раствор азотнокислого серебра готовят на свежей дистиллированной воде и используют из расчета 15 см³ раствора на один кусочек.

Промывку проводят в дистиллированной воде в течение 2-5 мин. После промывки кусочки переносят в небольшую порцию редуцирующей смеси в отдельной чашечке на 2 мин (раствор быстро темнеет) и затем помещают их в приготовленный перед употреблением основной редуцирующий раствор следующего состава: пирогалловая кислота - 4 г, дистиллированная вода - 100 см³, формалин чистый - 5 см³. Раствор готовят из расчета 20-25 см³ на один кусочек ткани. Восстановление обязательно проводят в банке из темного стекла.

Пробы выдерживают в редуцирующей смеси 24-48 ч при комнатной температуре в темном месте или банке из темного стекла. Затем их промывают в дистиллированной воде 1-2 ч.

Препараты обрабатывают последовательно, выдерживая в спиртах по следующей схеме:

- 96%-ный этиловый спирт (спирт 1) - 1 сут;
- 96%-ный " " (спирт 2) - 1 сут;
- 96%-ный " " (спирт 3) - 1 сут;

смесь этилового и метилсалицилового спиртов в равных объемах до опускания кусочков на дно посуды;

метилсалициловый спирт - 12 ч.

После спиртовой проводки кусочки ткани выдерживают при (57 ± 1) °С в смеси ксилола с парафином (1:1) - 30 мин, затем в парафине 1 - 60 мин и парафине 2 - 60 мин. Из быстро остуженного парафина вырезают блок с кусочком органа и наклеивают на деревянный кубик. Готовят тонкие срезы на санном микротоме и наклеивают на предметное стекло, депарафинируют в трех бюксах с ксилолом по 10-15 мин в каждом и заключают под микроскопом со светлопольным конденсором при увеличении 90x7-10. При неудовлетворительных результатах импрегнации лептоспир готовят препараты из других одновременно приготовленных блоков.

4.6.3.2. Оценка результатов

При микроскопии гистосрезов лептоспиры обнаруживают чаще на поверхности эпителия и в просветах мочевых канальцев почек, несколько реже - цитоплазме эпителия, преимущественно группами.

Типичные лептоспиры всегда окрашены в черный цвет, имеют S-образную форму с 1-2 изгибами или змеевидную форму с грубыми толстыми завитками, которые в отдельных случаях слабо заметны. Окружающая ткань окрашивается в буровато-желтый цвет.

По результатам гистологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство неблагополучным по лептоспирозу, если лептоспиры обнаружены в гистологических срезах импрегнированных серебром, приготовленных из почек или печени животных.

Лептоспироз считают причиной абортов, если лептоспиры обнаружены в гистосрезе из органов абортированного (мертворожденного плода).

5. ЛИСТЕРИОЗ

(лат., англ. — *Listeriosis*)

(синонимы болезни: **болезнь реки Тигра, ейреллез**)

Листерриоз регистрируют почти в 60 странах мира. Ранее на территории России болезнь отмечали во многих регионах. Экономический ущерб определяется высокой летальностью, снижением продуктивности животных, затратами на лечебно-профилактические и карантинно-ограничительные мероприятия.

Официальная регистрация листериоза, как нозологической единицы, в РФ проводится у животных с 1956 г., у людей – с 1992 г. Листерриоз сельскохозяйственных, синантропных и диких животных является актуальным для животноводства более 80 стран мира, в т.ч. России. По мнению И.С. Тартаковского (2000), листериоз по количеству выявленных случаев уступает сальмонеллезам, но превосходит их по летальности и тяжести течения. Например, из 2518 больных листериозом, выявленных в США в 1997 г., у 20% наступил летальный исход, а госпитализация требовалась в 92% случаев. Многочисленные эпидемические вспышки и спорадические случаи в высокоразвитых странах мира (США, Великобритания, Швейцария, Канада и Франция) связаны с употреблением готовых продуктов, таких как сыры, мясные полуфабрикаты, салаты, после чего листериоз стали рассматривать как одну из важных пищевых инфекций в мире.

Листерриоз – острая природно-очаговая инфекционная болезнь из группы зооантропонозов, характеризующееся поражением ЦНС, абортами, развитием пороков плода, лихорадкой, сепсисом и пневмонией у новорожденных.

Патология животных и людей, сходная с известной теперь, была замечена давно. Однако лишь в 1892 г. во Франции Люсе и в 1911 г. в Швеции Хюльферс выделили из трупов кроликов бактерии.

Листер в 1857 г. предположил, что заражение послеоперационных ран вызывает «живое начало», занесенное в рану извне. В 1867 опубликовал статью «Об антисептическом принципе в хирургической практике».

В 1918 г. французы И. Дюмон и Л. Котони выделили из церебральной жидкости человека микроорганизм. С. Пири (1927) выявил возбудитель у грызунов и в честь английского хирурга Дж. Листера назвал болезнь листериозом.

Английские ученые И. Марри, Р. Уэбб и М. Свен в 1926 году у заболевших обнаружили микроорганизм, заражение которым вызывало моноцитоз в периферической крови. Возбудителя этой болезни исследователи назвали *Bacteria monocytogenes*, идентифицированный в 1938 году С. Патерсоном как листерии

В 1931 г. англичанин Д. Гилл описал листериоз у овец в Новой Зеландии; в 1932 г. Тен-Брич в США - у домашней птицы; в 1934 г. Р. Литл в США - у крупного рогатого скота.

В СССР впервые в 1936 году листериоз у поросят в хозяйстве под г. Харьковом диагностировал проф. Е.П. Слабоспицкий.

5.1. Этиология

Возбудитель листериоза – *Listeria monocytogenes* – основной патогенный вид для животных и людей. Он вызывает аборт у коров, овец, коз и может поражать человека. Морфологически листерии – небольшие грамположительные палочковидные бактерии с закругленными концами, спор и капсул не образуют, в молодых 10...12-часовых культурах подвижны; факультативные аэробы, хорошо растут на обычных питательных средах. На твердых средах может происходить превращение типичных для листерии колоний S-форм в R-формы. Под влиянием антибиотиков образуются L-формы колонии, а также антибиотикоустойчивые мутанты. *L. monocytogenes* патогенен для белых мышей, кроликов, морских свинок. Для него характерны положительная проба при нанесении культуры на конъюнктиву глаза морской свинки или кролика в виде кератоконъюнктивита. По современным представлениям у листерии сложная антигенная структура и они имеют 15 соматических и 5 жгутиковых антигенов.

Листерии длительно сохраняются во внешней среде, способны размножаться при низкой температуре, особенно в силосе. До 4 мес сохраняются в животноводческих помещениях, в сене, концентратах. При хранении в холодильнике при температуре 4°C может происходить накопление листерии в продуктах питания (молоке, мясе, сыре). В прудовой воде при температуре 37°C листерии сохраняются до 1 года. Листерии погибают под действием 5%-ного раствора лизола или креолина в течение 10 мин. Нагревание до 100°C убивает листерии через 5 мин.

5.2. Эпизоотология

Листериоз представляет опасность для 12 видов домашних и 91 вид диких животных. Восприимчивы к листериозу овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики, куры, гуси, утки, индейки.

Отмечена болезнь у пушных зверей (шиншилл, норок), а также у форелей в рыбопитомниках. В России чаще поражаются овцы, у них регистрируют наиболее значительную заболеваемость с высокими показателями смертности и летальности. Однако в ряде других стран листериозом преимущественно поражается крупный рогатый скот. Наблюдали случаи заболевания листериозом кошек, собак и обезьян. Восприимчив также человек. Болеют животные всех возрастов, но особенно чувствительны молодняк и беременные животные.

Листерии выделены также из иксодовых клещей, из личинок оводов, блох, вшей, а также рыб, раков и лягушек. В циркуляции возбудителя листериоза между дикими животными (особенно грызунами), по-видимому, играют определенную роль иксодовые клещи (личинки, нимфы, самки), которые будучи подсаженными на экспериментально зараженных листериозом животных, оказались способными воспринимать листерий.

Источником возбудителя инфекции служат больные животные, выделяющие листерий во внешнюю среду с истечениями из носовой полости, из половых органов (при абортах), с абортированным плодом, с калом, мочей, молоком (при листериозных

маститях).

Основной резервуар возбудителя инфекции в природе грызуны, являющиеся причиной заражения листериозом с/х животных, чаще всего посредством воды, корма, загрязненного их выделениями.

У клинически здоровых животных и грызунов установлено листерионосительство, которое при ослаблении резистентности организма в результате недостаточного и неполноценного кормления, плохих условий содержания, беременности, незаразных и некоторых инфекционных болезнях, может привести к возникновению листериоза.

Листериоз обычно проявляется спорадически, реже – эпизоотически с охватом 1-20% поголовья животных, или до 60% поголовья птиц. У овец болезнь проявляется в зимне-весенний период, что связано с фактором передачи возбудителя инфекции (миграция грызунов) и снижение неспецифической резистентности организма животных. У крупного рогатого скота и свиней болезнь регистрируют в различные периоды года. Характерна стационарность листериоза

5.3. Клинические признаки

Инкубационный период при листериозе у животных 7-30 дней. Клиническое проявление болезни зависит от способа заражения, состояния резистентности организма и степени вирулентности возбудителя. Течение болезни острое, подострое, хроническое. Листериоз проявляется в нескольких клинических формах: нервной, септической, смешанной, стертой – бессимптомной (носительство); поражением половой системы (аборт, задержание последа, эндометриты и метриты) и вымени (маститы).

При нервной форме температура тела повышается до 40-41С, отмечается угнетение, потеря аппетита, слезотечение. Через 3-7 дней у взрослого КРС появляются неkoordinированные движения, ходульная походка, судороги, приступы буйства, парез нижней челюсти, потеря зрения, стоматит. Температура тела повышенная или нормальная. Длительность болезни до 10сут, у овец наблюдают неестественное искривление (боковое) шеи, у свиней – движение назад, кашель, рвоту, поносы, экзантемы. Болезнь в 60-100% случаев заканчивается гибелью животных.

Септическая форма регистрируется у животных в первые месяцы жизни, сопровождается повышением температуры тела, угнетением, потерей аппетита, поносами. У телят часты судороги, коматозное состояние, у поросят – затрудненное дыхание, кашель, синюшность ушей, живота. Длится 7-14 дней, в большинстве случаев животные погибают.

Генитальная форма у коров проявляется абортами во второй половине беременности. Задержанием последа, эндометритами, маститами.

5.4. Патологоанатомические изменения

При нервной форме ярко выраженных признаков патогномичных для этой болезни, установить, как правило, не удается. Обнаруживают лишь инъекцию сосудов и отек мозга, кровоизлияния в мозговой ткани в отдельных внутренних органах. При гистологическом исследовании отмечают менингоэнцефалит.

При септической форме болезни регистрируют гиперемии или отек легких, катар слизистых оболочек пищеварительного тракта. Кровоизлияния в сердечной мышце и паренхиматозных органах, увеличение селезенки, дегенеративные изменения и некротические очажки в печени, селезенке, почках, миокарде, увеличение лимфоузлов. При поражении половых органов у самок обнаруживают эндометрит или метрит.

5.5. Листериоз у человека

Люди заражаются листериозом при использовании в пищу животноводческих продуктов от больных животных, а также при употреблении ранних плохо промытых овощей (как правило, без термической обработки), выращенных на полях, удобряемых фекалиями и навозом.

В естественных условиях заражение происходит через: слизистую оболочку

носовой и ротовой полостей, конъюнктиву, пищеварительный тракт, поврежденную кожу.

Наблюдает сверхострое, острое, подострое, хроническое и abortивное течение болезни. По клиническим признакам различают: ангинозную - септическую; нервную; септико-гранулематозную (чаще у новорожденных детей); глазо-железистую; септико-туберкулезную формы болезни; листериоз беременных.

Описана кожная форма листериоза в виде фурункулеза и папулезной экзантемы у ветеринарных работников после геникологических исследований животных.

Для предохранения от заражения людей необходимо строго соблюдать меры личной профилактики при уходе за больными животными, а также при работе в лабораториях с культурами листерий.

Обязательно обезвреживать продукты животноводства, поступающие из неблагополучных по листериозу пунктов, тщательно промывать и обрабатывать термически сырые овощи перед употреблением.

5.6. Лабораторная диагностика

Лабораторную диагностику лептоспироза осуществляют на основании ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза», утвержденный и введенный в действие постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР №2240 от 27.12.1991 года.

5.6.1 Отбор проб

Для исследования в лабораторию направляют трупы мелких животных или голову (головной мозг), паренхиматозные органы (часть печени, селезенку, почку, пораженные участки легких), abortированный плод или его оболочки.

Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют истечения из половых органов abortировавших самок, молоко из пораженных долей вымени при наличии мастита - для бактериологического исследования; кровь или сыворотку крови от больных и подозрительных по заболеванию животных - для серологического исследования.

Материал для исследования в свежем или консервированном (в 30-процентном водном растворе глицерина) виде упаковывают в полиэтиленовые пакеты, помещают в ящик или контейнер, печатают и вместе с сопроводительным документом направляют в лабораторию.

В сопроводительном документе указывают наименование и адрес отправителя, описание проб патологического материала, эпизоотологические (эпидемиологические) данные.

5.6.2 Бактериологическая диагностика

Бактериологическая диагностика включает микроскопическое исследование исходного материала, посева на питательные среды, идентификацию выделенных культур по культурально-биохимическим, тинкториальным и серологическим свойствам, а также постановку биологической пробы на лабораторных животных.

Учитывая возможность существования нетипичных вариантов листерий, бактериологическое подтверждение считается обязательным для определения наличия возбудителя и распространения листериозной инфекции.

5.6.2.1. Микроскопическое исследование.

Микроскопическому исследованию подвергают мазки-отпечатки из головного мозга, внутренних органов и тканей. При приготовлении мазков-отпечатков чистым предметным стеклом 3 - 4 раза прикасаются к поверхности среза органа. Мазки готовят непосредственно из патматериала, а также после подращивания его проб при 37 °С в течение 4 - 6 часов.

Мазки окрашивают по Граму, а также методами флюоресцирующих антител.

Возбудитель листериоза - *Listeria monocytogenes* - грамположительная подвижная неспорообразующая полиморфная, чаще палочковидная бактерия длиной 0,5 - 2,0 мкм.

5.6.2.4. Бактериологическое исследование.

Из органов и обязательно головного мозга проводят обильные множественные посевы или предварительно готовят суспензию из головного мозга и паренхиматозных органов на физрастворе в соотношении 1:5 и из нее делают посевы. Для культивирования листерий используют обычные среды с добавлением 1% глюкозы и 2 - 3% глицерина или печеночный агар и бульон (рН среды 7,2 - 7,4), а также кровяной агар и элективные среды.

В качестве дополнительного метода при отрицательном результате первичного посева рекомендуется часть исследуемого материала поместить в холодильник и хранить в течение 30 дней для проведения повторных исследований через каждые 10 дней. При хранении в холодильнике при +4 °С патологического материала, помещенного в глицерин, происходит размножение и накопление листерий. Рекомендуется хранение суспензии исследуемого материала в холодильнике в физиологическом растворе или мясопептонном бульоне (МПБ) с добавлением полимиксина 15 - 25 ЕД/мл для задержки роста контаминантов.

При исследовании абортированных плодов посевы делают из содержимого желудка и внутренних органов.

При исследовании истечений из половых органов, молока и силоса (Приложение 10.6) посевы проводят на печеночный агар в чашках и МПБ с 10% хлорида натрия, из которого потом делают пересевы на твердые среды.

Посевы инкубируют в термостате при 37° с ежедневным просмотром в первые 3 - 4 дня. При отсутствии роста наблюдение за посевами проводят в течение двух недель.

Характерным для возбудителя листериоза является легкое помутнение бульона и появление мелких росинчатых колоний на агаре, наличие бета-гемолиза на кровяном агаре. Колонии листерий в проходящем свете имеют голубую окраску с зеленоватым оттенком и мелкозернистую структуру.

Из выделенной культуры делают мазки, окрашивая их по Граму, а также для люминесцентной микроскопии с применением прямого и непрямого метода флюоресцирующих антител.

При получении смешанной культуры ее очищают общепринятыми методами (отсев отдельных характерных колоний, дробный расев на 2-процентный мясопептонный агар (МПА) в чашках), а также путем заражения молодых мышей.

5.6.3. Биологическое исследование

Биологическое исследование проводят на 2 - 3 белых мышах (масса 14 - 16 г). Животных заражают под кожу или внутрибрюшинно суспензией из головного мозга и внутренних органов или культурой в дозе 0,3 - 0,5 мл. При положительной биопробе животные погибают через 2 - 6 суток после заражения. При вскрытии отмечают множественные некротические очажки в печени, селезенке, почках. В отдельных случаях этих поражений может не быть. При наблюдении более 10 дней рекомендуется дополнительно делать посев из головного мозга. Очень чувствительны к подкожному заражению 5 - 6-дневные мыши-сосуны, которые гибнут через 18 - 36 часов.

Для повышения эффективности биопробы белым мышам за 3 - 4 часа до заражения суспензией патматериала или культурой листерий инъецируют внутримышечно кортизон в дозе 5 мг.

К заражению листериями восприимчивы и кролики. Показательно внутривенное заражение кроликов культурой листерий в дозе 0,5 - 1 млрд. микробных тел (по стандарту мутности), при этом количество моноцитов в крови зараженных животных увеличивается в несколько раз. Это является дополнительной характеристикой возбудителя болезни.

Из внутренних органов (печень, селезенка, почки, сердце) павших животных делают мазки-отпечатки и высевы на питательные среды.

Срок наблюдения за подопытными животными - 14 суток.

5.6.4. Идентификация возбудителя

5.6.4.1. Определение подвижности проводят методом висячей или раздавленной капли, а также посевом методом укола в полужидкий МПА.

На подвижность исследуют 6 - 18-часовую бульонную культуру, выращенную при комнатной температуре (22 °С). Листерии, выращенные при данной температуре, обладают активной подвижностью.

5.6.4.2. Для определения ферментативных свойств чистую бульонную культуру пересевают на пестрый ряд

(глюкоза, мальтоза, маннит, салицин, трегалоза, дульцит, инулин, раффиноза), который выдерживают при 37 °С в течение 10 дней. Листерии разлагают с образованием кислоты (без газа) глюкозу, мальтозу, трегалозу, салицин и не разлагают дульцит, инулин, раффинозу, маннит.

5.6.4.3. Проба на каталазу.

К суточной бульонной культуре добавляют равный объем свежеприготовленной 5-процентной перекиси водорода, при исследовании агаровой культуры в пробирку вносят несколько капель перекиси водорода. При наличии фермента каталазы перекись водорода разлагается с образованием пузырьков газа (пена).

Способность выделять фермент каталазу является характерным признаком листерий при дифференциации от возбудителя рожи свиней.

5.6.4.4. Определение чувствительности листерий к бактериофагам.

5.6.4.4.1. Диагностический набор лиофилизированных листериозных бактериофагов включает два монофага - L2A и L4A. Набор бактериофагов позволяет идентифицировать более 85% культур листерий, однако могут быть выделены штаммы листерий, которые не лизируются данными фагами.

5.6.4.4.2. Перед применением содержимое ампул растворяют бульоном Мартена или МПБ в объеме, указанном на этикетке ампулы, и переносят в пробирки с соблюдением правил асептики. Растворенные бактериофаги не пригодны к использованию при наличии осадка, хлопьев или помутнения.

Не использованные в день исследования растворенные бактериофаги могут быть применены в дальнейшей работе в течение 5 - 10 суток при хранении в холодильнике (+2° - +6°) после предварительной проверки на отсутствие бактериального загрязнения.

Ампулы, пробирки и пипетки из-под бактериофага, а также выбракованный бактериофаг обезвреживают кипячением (не менее 30 минут).

5.6.4.4.3. Исследование проводят в бактериологических чашках, содержащих 2-процентный агар Мартена или МПА с глюкозой (0,5%), разлитый накануне или в день исследования. Перед нанесением испытуемой культуры поверхность агара необходимо подсушить. При подсушивании чашки открывают и переворачивают вверх дном. Агар, разлитый накануне, подсушивают 20 - 30 минут при комнатной температуре, а разлитый в день исследования - 1 - 1,5 часа при 37°.

Для идентификации используют 16 - 18-часовую агаровую культуру, выращенную при 37 °С. Ее засевают в бульон Мартена или МПБ с глюкозой (0,5%). Количество посевного материала должно быть таким, чтобы после встряхивания в пробирке с бульоном образовалась легкая опалесценция. Культуры подращивают в термостате (37°) 4 часа. После этого бактериальную взвесь наносят газонем на поверхность подсушенного 2-процентного агара в бактериологических чашках. Каждую культуру подвергают не менее чем 2 - 3 параллельным исследованиям.

5.6.4.4.4. В одной чашке можно одновременно проводить испытания 2-х культур. Для этого поверхность агара делят пополам и на каждую из половин наносят по 0,1 мл исследуемых культур, которые распределяют равномерно отдельным шпателем по отмеченному участку агаровой пластинки. Чашки с засеянными культурами выдерживают в термостате (37°) 1 - 1,5 часа при слегка приоткрытой крышке.

5.6.4.4.5. Для исследования действия бактериофага на культуру листерий с целью ее идентификации на газон испытуемой культуры тонко оттянутой пастеровской пипеткой или бактериологической петлей наносят по одной капле бактериофагов и отдельно каплю стерильного бульона (контроль).

Место нанесения каждой капли отмечают карандашом по стеклу с наружной стороны чашки. Расстояние между наносимыми каплями должно быть не менее одного сантиметра. Чашки после нанесения фага и бульона оставляют при комнатной температуре (22 - 23°) в затемненном месте.

5.6.4.4.6. Учет результатов проводят через 16 - 24 часа. Культуру признают листериями, если в месте нанесения одного из бактериофагов образуется прозрачная зона лизиса или полусливной лизис (в виде губки). Допускается наличие единичных колоний или сплошного нежного роста вторичной культуры в зоне лизиса при интенсивном бактериальном росте на остальной поверхности агара. В месте нанесения капли стерильного бульона зона лизиса отсутствует.

5.6.4.4.7. Если лизис культуры выражен нечетко (едва заметно место нанесения капли бактериофага) или полностью отсутствует литическая реакция, культуры идентифицируют согласно

5.6.4.5. Методика постановки реакции нарастания титра фага для обнаружения возбудителя листериоза в организме животных и людей, кормах и объектах внешней среды.

5.6.4.5.1. Реакция нарастания титра фага (РНФ) - быстрый специфический метод обнаружения листерий, обеспечивающий выявление возбудителя в исследуемом материале без выделения его культуры.

5.6.4.5.2. РНФ основана на свойстве так называемого индикаторного бактериофага строго специфично размножаться только в клетках гомологичного микроба. Размножение бактериофага сопровождается увеличением количества его частиц и повышением титра.

5.6.4.5.3. РНФ рекомендуется использовать в качестве основного метода для обнаружения листерий в кормах и объектах внешней среды, а также при диагностике листериоза.

5.6.4.5.4. Для исследования используют органы животных и людей, корма и объекты внешней среды.

5.6.4.5.5. В реакции применяют листериозные бактериофаги L2A и L4A. Штаммы листерий I (9 - 127) и II (9 - 72) серогруппы. Питательные среды, содержащие 0,5% глюкозы: мясопептонный бульон, 1,5-процентный и 0,7-процентный мясопептонный агар.

5.6.4.5.6. При постановке РНФ с пробами внутренних органов, кормов и почвы отвешивают 3 г исследуемого материала, измельчают, помещают в колбу емкостью 50 - 100 мл и добавляют 30 мл МПБ. Смесь в течение 5 - 10 минут встряхивают, затем 9 мл переносят в бактериологическую пробирку N 1 (опытная).

Для исследования воды ее наливают в количестве 8 мл в пробирку N 1 (опытная), в эту же пробирку добавляют 1 мл МПБ.

5.6.4.5.7. Бактериофаги используют в рабочем разведении (10000 фаговых корпускул в мл). Для этого их растворяют МПБ до исходного объема, указанного на этикетке ампулы, а затем на МПБ отдельными пипетками делают пять последовательных десятикратных разведений (в последнем разведении титр бактериофага составит 1 x 10). Смесь фагов готовят путем смешивания равных объемов фага L2A и L4A в рабочем разведении.

5.6.4.5.8. Для контроля титра бактериофага, который ставят один на группу анализов, проводимых одновременно, в пробирку N 2 (контроль) вносят 9 мл МПБ.

5.6.4.5.9. В пробирки N 1 и 2 вносят по 1 мл смеси фагов в рабочем разведении (схема 2) и выдерживают их в течение 16 - 24 часов при комнатной температуре, после чего в пробирки добавляют по 1 мл хлороформа. Содержимое тщательно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 - 40 минут. Хлороформ оседает на дно,

надосадочную жидкость подвергают дальнейшим исследованиям.

5.6.4.5.10. При использовании смеси фагов из опытной и контрольной пробирок (N 1 и 2) берут по 0,2 мл и переносят по 0,1 мл в две пробирки, содержащие по 0,9 мл МПА (один ряд для обнаружения фага L2A, а другой - L4A), а затем из каждой пробирки готовят еще одно десятикратное разведение.

5.6.4.5.11. Готовят 1-миллиардную взвесь штаммов I и II серогруппы по стандарту мутности путем разведения суточной агаровой культуры в физиологическом растворе. Во все пробирки с разведенным материалом добавляют по 0,1 мл взвеси штамма I серогруппы для выявления фага L2A или штамма II серогруппы для обнаружения фага L4A.

Содержимое пробирок засевают методом агаровых слоев по Грациа. Для чего накануне дня исследования в бактериологические чашки Петри разливают по 10 мл 1,5-процентного МПА; МПА можно разлить в чашки Петри и в день исследования, но в этом случае поверхность агара необходимо предварительно подсушить в течение 40 - 50 минут при 37° или 2 часов при комнатной температуре. Для второго слоя используют расплавленный и охлажденный до 48 - 50° 0,7-процентный МПА, который следует использовать в течение часа, так как позже он приобретает гелеобразную консистенцию и не пригоден для исследования.

Затем в пробирки пипеткой вносят по 2,5 - 3 мл расплавленного и охлажденного до 48 - 50° 0,7-процентного МПА. Содержимое быстро и тщательно перемешивают вращением пробирки между ладонями и выливают в чашку Петри. Смесь легким покачиванием чашки равномерно распределяют вторым слоем на поверхности 1,5-процентного МПА. Чашки оставляют на ровном месте на 20 - 30 минут (до застывания 0,7-процентного МПА), затем переворачивают и инкубируют при комнатной температуре.

5.6.4.5.12. Учет реакции проводят через 16 - 24 часа инкубирования посевов.

В опытных пробах и контроле титра фага подсчитывают число негативных колоний во всех чашках. Негативные колонии - округлые, хорошо заметные на фоне бактериального роста, прозрачные участки, образующиеся в результате лизиса бактерий.

При учете результатов сравнивают количество негативных колоний на чашках соответствующих разведений.

5.6.4.5.13. Результаты реакции оценивают по увеличению титра бактериофага (количества негативных колоний):

увеличение количества негативных колоний в опытной пробе по отношению к контролю в 5 и более раз (хотя бы по одному из разведений) оценивается как положительный результат, менее чем в 5 раз - отрицательный;

сплошной лизис или лизис с островками оценивается как положительный результат.

5.6.4.5.14. При получении положительного результата РНФ дают заключение, что в исследуемом материале (пробе) обнаружен возбудитель листериоза.

При получении отрицательного результата РНФ для окончательной постановки диагноза необходимо провести бактериологическое исследование материала.

5.6.4.6. Люминесцентно-серологическое исследование.

5.6.4.6.1. Люминесцентно-серологическое исследование проводят с использованием прямого (ПМФА) и непрямого методов флюоресцирующих антител (НМФА). С помощью этих методов можно идентифицировать возбудителя в культурах, обнаружить листерии в органах и тканях, а также определить их серогрупповую принадлежность.

5.6.4.6.2. Окраска по прямому методу флюоресцирующих антител.

5.6.4.6.2.1. Для проведения исследования необходимо иметь:

- флюоресцирующие сыворотки против листерий сероваров 1, 4а, 4в;
- нефлюоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель, приготовленный из диметилфталата чистого 100 мл, нафталина сублимированного 1,75 г или тимола

чистого 5,0 г;

- глицерин с фосфатным буфером рН 8,0 (1 часть глицерина нейтрального и 9 частей фосфатного буфера);

- физиологический раствор хлорида натрия с фосфатным буфером рН 7,4, приготовленный следующим образом: на аналитических весах отвешивают 9,078 г химически чистого однозамещенного фосфата калия, помещают его в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до 1 л; затем отвешивают 11,876 г двузамещенного фосфата натрия и в другой мерной колбе доводят дистиллированной водой до объема 1 л. При использовании двузамещенного фосфата натрия, содержащего 12 молекул воды, для получения 1 л раствора берут навеску 23,752 г, а безводного препарата - 9,476 г. Для получения буфера рН 7,4 смешивают 4 части раствора двузамещенного фосфата натрия и 1 часть раствора однозамещенного фосфата калия. Полученный буфер добавляют к физиологическому раствору (8,750 г хлорида натрия на 1 л дистиллированной воды) в соотношении 1:50. Если при смешении растворов фосфатов 4:1 не получают нужный рН, то изменяя соотношение растворов, достигают необходимой величины рН (при повышенной кислотности добавляют двузамещенный фосфат натрия, а при щелочном рН добавляют однозамещенный фосфат калия). Если при добавлении буфера в соотношении 1:50 к физиологическому раствору последний будет иметь рН ниже 7,4, то увеличением количества добавляемого буфера добиваются нужной реакции физиологического раствора;

- спирт этиловый, 96°;

- покровные стекла толщиной не более 0,2 мм;

- предметные стекла, нелюминесцирующие и хорошо обезжиренные.

Перед применением флюоресцирующие сыворотки разводят дистиллированной водой до рабочего разведения. Сыворотки в рабочем разведении могут храниться при температуре 2 - 4° в течение 2-х недель.

5.6.4.6.2.2. Определение возбудителя в культуре. Для исследования используют 18 - 24-часовые чистые или смешанные культуры, из которых готовят по два мазка на отдельных предметных стеклах для обработки листериями люминесцирующими сыворотками.

Густые мазки для исследования непригодны, так как микробы в них могут светиться менее интенсивно. Мазки готовят средней густоты (несколько десятков микробов в поле зрения микроскопа) размером не более 1 кв. см.

Место нанесения культуры очерчивают карандашом по стеклу с обратной стороны, подсушивают мазки на воздухе, маркируют и фиксируют этиловым спиртом в течение 15 минут; мазки для фиксации погружают в вертикальном положении в стеклянный сосуд со спиртом. Каждое стекло отделяют металлической проволочкой или стеклянной палочкой.

После фиксации и испарения спирта мазки ополаскивают физиологическим раствором хлорида натрия с фосфатным буфером рН 7,4.

На слегка подсушенный мазок наносят 1 - 2 капли соответствующей люминесцирующей сыворотки в рабочем разведении. Мазки с сывороткой помещают во влажную камеру (в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой на дне) и выдерживают в термостате при температуре 37° в течение 30 минут. Затем сыворотку отмывают, погружая мазки в кювету, содержащую физиологический раствор с фосфатным буфером рН 7,4, на 20 минут. Раствор в кювете периодически помешивают и меняют через 10 минут.

Отмытые мазки ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Для быстроты высушивания можно использовать настольный вентилятор.

На поверхность мазка наносят небольшую каплю глицерина с буфером рН 8,0, накрывают покровным стеклом, излишек глицерина удаляют.

На покровное стекло наносят нефлюоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель и производят люминесцентную микроскопию. Люминесцентный микроскоп

рекомендуется устанавливать в хорошо вентилируемой комнате с частично затемненным окном или в затемненной части комнаты.

Диагностическая оценка интенсивности свечения возбудителя листериоза.

Степень свечения оценивается по следующим показателям:

- " - ярко выраженное золотисто-зеленоватое свечение, четко заметны морфологические особенности бактерий, хорошо видна темная центральная зона клетки;
- ++++" - яркое свечение, хорошо заметны цвет и морфологические особенности клетки;
- +++ " - выраженное свечение, но меньшей интенсивности;
- ++ " - заметное, но слабое свечение, цвет неясен, морфологические особенности различаются плохо;
- + " - свечение не обнаруживается.
- "

Свечение бактериальных клеток на 4 и 3 креста расценивается как положительный результат.

5.6.4.6.2.3. Обнаружение возбудителя в патологическом материале.

Материал для исследования должен быть свежим.

Для люминесцентной микроскопии из паренхиматозных органов готовят суспензию на физиологическом растворе в соотношении 1:5. После осаждения крупных частиц в суспензии из разных участков ее поверхности готовят по 2 - 3 мазка.

Мазки из головного и костного мозга готовят отдельно и после фиксации спиртом дополнительно обезжиривают ацетоном в течение 5 минут, меняя его 2 - 3 раза. Дальнейшую обработку препаратов и люминесцентную микроскопию выполняют согласно п. 5.6.4.6.2.2.

При обнаружении возбудителя с типичной морфологией, специфическим свечением и интенсивностью не ниже чем на три креста ставят положительный люминесцентно-сериологический диагноз.

5.6.4.6.3. Окраска по непрямому методу флюоресцирующих антител.

5.6.4.6.3.1. Для постановки реакции необходимо иметь:

- материал для исследований (антиген) в виде микробной бульонной или агаровой культуры (500 млн. микробных тел/мл), выращенной при 22 - 37° в течение 16 часов или мазков-отпечатков из органов и тканей павшего (убитого) животного;
- гипериммунные кроличьи сыворотки: листериозные - серогрупповые и поливалентную;
- флюоресцирующую сыворотку против глобулинов кролика;
- метиловый или этиловый спирт 96°;
- глицерин на забуференном физиологическом растворе 1:10 (рН 7,2 - 7,4);
- дистиллированную воду;
- нефлюоресцирующее иммерсионное масло;
- тонкие, обезжиренные предметные стекла.

Для приготовления рабочего разведения сухую флюоресцирующую сыворотку против глобулинов кролика растворяют в указанном на этикетке ампулы объеме дистиллированной воды. После растворения сыворотку центрифугируют при 3000 - 6000 оборотах в минуту в течение 30 минут для удаления крупных конгломератов.

Разведенную сыворотку хранят в пробирке с резиновой пробкой или в запаянной ампуле при температуре +4° в течение 2 недель. Перед нанесением на препарат флюоресцирующую сыворотку необходимо развести физиологическим раствором (рН 7,2 - 7,4) в соответствии с указанным на этикетке ампулы рабочим разведением в нужном для работы объеме. Разведенная до рабочего разведения сыворотка используется в тот же день.

5.6.4.6.3.2. Методика приготовления препаратов для люминесцентной микроскопии:

- мазок из бактериальной культуры или тонкий мазок-отпечаток из органов высушивают на воздухе в течение 1 минуты и фиксируют этиловым или метиловым спиртом также в течение 1 минуты;

- наносят каплю гипериммунной листериозной кроличьей сыворотки, покрывают (разрезанным на 4 части 1 x 1 см) покровным стеклом на 5 минут при температуре 20 °С. Затем покровное стекло снимают и в течение 20 - 30 секунд препарат промывают дистиллированной водой. После этого препарат высушивают в сушильном шкафу при температуре 60 - 70° в течение 2 минут;

- наносят одну каплю флюоресцирующей сыворотки против глобулинов кролика, покрывают покровным стеклом (разрезанным на 4 части 1 x 1 см) - экспозиция 5 минут при температуре 20°. Снимают покровное стекло и под сильной струей водопроводной воды промывают препарат 5 - 10 минут;

- препарат высушивают в сушильном шкафу при температуре 60 - 70° в течение 2 минут.

Затем на препарат наносят каплю жидкости (одна часть нейтрального глицерина и 9 частей физраствора, забуференного фосфатным буфером рН 7,2 - 7,4), накрывают покровным стеклом, на которое наносят одну каплю нефлюоресцирующего иммерсионного масла, и исследуют под люминесцентным микроскопом (объектив 90, окуляр 5, 7, 10) с системой светофильтров (ФС-1-4, БС-8-2).

5.6.4.6.4. Для обнаружения листерий в органах и тканях мазки обрабатывают поливалентной сывороткой, а для серологической типизации листерий готовят несколько мазков, половину которых обрабатывают сывороткой первой серогруппы, а другую половину - сывороткой второй серогруппы.

5.6.4.6.5. При исследовании материала необходимо ставить контроли с нормальной сывороткой, проверенной на отсутствие листериозных антител, и с заведомо известной листериозной культурой.

Обязательным контролем следует считать препарат с листериями, обработанный только люминесцирующей антивидовой сывороткой.

5.6.4.6.6. Клетки листерий, обработанные гомологичной листериозной сывороткой, обладают свечением, в то время как бактерии, обработанные гетерологичной листериозной сывороткой, не светятся при исследовании в люминесцентном микроскопе. Бактерии других видов, обработанные листериозной сывороткой, также не светятся.

5.6.4.6.7. При использовании метода флюоресцирующих антител для контрастирования фона препарат можно одновременно с флюоресцирующей сывороткой окрашивать бычьим альбумином, меченным родамином, в соответствии с Временным наставлением на его применение, утвержденным Минздравом СССР 14 апреля 1962 г. Совместное применение флюоресцирующей сыворотки и альбумина значительно повышает чувствительность и надежность иммунофлюоресцентного анализа - меченый альбумин снижает неспецифическое свечение фона, сообщая посторонним бактериям и тканям, а также прочим органическим частицам, содержащимся в препаратах, оранжево-красное неспецифическое свечение, на фоне которого листерии выделяются сияющим зеленоватым цветом.

5.6.4.7. Для дифференциации листерий от возбудителя рожи свиней

можно использовать индикаторные среды; метод основан на редукции и окислении красок в средах при выращивании листерий.

Исследуемую бульонную культуру или смыв агаровой культуры засевают в объеме 2 - 4 капель не менее чем на две из пяти следующих индикаторных сред: с лакмусом, нейтраль-ротом в смеси с метиленовой синью, метил-ротом, конго-ротом, амидо-черным (приготовление сред см. Приложение 10.2.1). Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37 - 38° вместе с контрольными (незасеянными) средами. Результат

учитывают через 3 - 6, 24, 48 часов.

Возбудитель листериоза через 3 - 6 часов обесцвечивает среду с лакмусом и среду с нейтраль-ролом в смеси с метиленовой синью до цвета бульона, лишь у поверхности на границе с воздухом остается окрашенный ободок. При встряхивании цвет частично восстанавливается, поэтому посеvy просматривают, не встряхивая пробирки.

Среда с метил-ролом обесцвечивается через 3 - 6 часов, но восстановление цвета среды не происходит.

Обесцвечивание сред с конго-ролом и с амидо-черным происходит в более поздние сроки: через 6 - 48 часов, при этом исходный цвет среды после обесцвечивания не восстанавливается.

Возбудитель рожи свиней не обесцвечивает ни одну из вышеуказанных сред.

5.6.4.8. Серологическая идентификация листерий.

5.6.4.8.1. Поливалентная листериозная агглютинирующая сыворотка представляет собой смесь кроличьих листериозных агглютинирующих сывороток и содержит факторы (антитела) H-AB и 0 - II, V, VI, VII, IX. Поливалентная сыворотка в капельной реакции агглютинации на стекле агглютинирует все известные серовары листерий. Серогрупповые сыворотки агглютинируют культуры листерий соответствующих серогрупп. Сыворотка 1-го серовара ("1-я серогруппа") содержит 0-фактор II, а сыворотка 4-го "в" серовара ("2-я серогруппа") - 0-факторы V, VI.

5.6.4.8.2. Предназначенную для идентификации чистую 24-часовую бульонную культуру, выращенную при 37°, платиновой петлей засевают частым штрихом на 2 пробирки обычного МПА так, чтобы получить рост по всей поверхности агара, и выращивают в темном месте при комнатной температуре (18 - 26 °С) в течение 24 - 30 часов. Затем агаровую культуру смывают небольшим количеством физраствора, чтобы получить густую взвесь (10 - 15 млрд. микробных клеток в 1 мл).

5.6.4.8.3. Реакцию агглютинации ставят на чистых обезжиренных предметных стеклах. На предметное стекло наносят две капли: каплю поливалентной сыворотки и каплю физраствора. К обеим каплям на стекле добавляют по одной капле смыва культуры, смесь тщательно и быстро перемешивают бактериологической петлей или запаянным концом пастеровской пипетки, после чего стекла плавно покачивают круговыми движениями. Одновременно для контроля один раз в день исследуют на стекле каплю сыворотки с добавлением капли физраствора.

5.6.4.8.4. Учет результатов РА проводят в течение 3-х минут. Реакция считается положительной при появлении четкой агглютинации (образование хлопьев) в капле с сывороткой при ее отсутствии в контроле. Запоздалые реакции не учитывают.

5.6.4.8.5. Исследуемую культуру признают листериями при получении положительной реакции с поливалентной сывороткой и отсутствии агглютинации в контроле с физраствором, а также наличии характерных морфологических, культуральных и биохимических свойств.

5.6.4.8.6. При наличии самоагглютинации РА ставят повторно по указанной выше методике, но при посеве на МПА в качестве посевного материала используют суточную бульонную культуру, выращенную при комнатной температуре, что предотвращает самоагглютинацию.

5.6.4.8.7. С помощью сероваровых ("серогрупповых") сывороток определяют серовар ("серогруппу") идентифицированных культур листерий. С этой целью чистую бульонную 24-часовую культуру листерий засевают на 1 - 2 пробирки МПА, как указано в п. 4.8.2, и выращивают при 37° 18 - 24 часа. Смыв с агаровой культуры делают так же, как и для РА с поливалентной сывороткой, и исследуют в РА одновременно с сыворотками 1-го и 4-го "в" сероваров. Техника постановки и учета РА описана в п. п. 4.8.3 - 4.8.4.

5.6.4.8.8. Положительная РА с сывороткой 1-го серовара свидетельствует о принадлежности культуры к 1-му серовару ("1-я серогруппа"), а положительная РА с сывороткой 4-го "в" серовара указывает на принадлежность ее к 4-ому "в" серовару ("2-я

серогруппа") листерий. В случае отрицательных или сомнительных показаний РА с сыворотками обоих сероваров, что возможно в результате изменчивости (диссоциации) культуры, для определения ее сероваровой ("серогрупповой") принадлежности ставят пробу роста.

5.6.4.8.9. Для постановки пробы роста используют обычный МПБ в пробирках по 4 - 5 мл с добавлением 1% - 1,25% стерильной сероваровой сыворотки, проверенной на стерильность путем экспозиции в термостате в течение 24 часов.

5.6.4.8.10. Для постановки пробы роста выращенную при 37° суточную бульонную культуру листерий пересевают платиновой петлей на две пробирки МПБ - одну пробирку с сывороткой 1-го и одну пробирку с сывороткой 4-го "в" серовара, которые инкубируют при температуре 37° в течение 24 - 48 часов.

5.6.4.8.11. Если культура является смесью двух сероваров ("серогрупп"), то из верхнего слоя бульона каждой пробирки производят посев на МПА с целью получения изолированных колоний. Полученную из изолированной колонии каждой пробирки культуру снова испытывают по описанной выше методике в РА с сероваровыми сыворотками. При этом из пробирки с сывороткой 1-го серовара выделяют культуру 4-го "в" серовара ("2-я серогруппа"), а из пробирки с сывороткой 4-го "в" серовара - культуру 1-го серовара ("1-я серогруппа"). Таким образом, с помощью пробы роста удается разделить смесь культур листерий двух серогрупп.

5.6.4.9. Специфические свойства листерий проверяют также конъюнктивальной пробой на морских свинках или дермонекротической пробой на морских свинках или кроликах.

5.6.4.9.1. Конъюнктивальная проба. На конъюнктиву глаза морской свинки наносят 2 капли испытуемой бульонной культуры с последующим легким массажем век ватным тампоном. Вирулентные штаммы листерий на 2 - 4 день вызывают у морской свинки гнойный кератоконъюнктивит. Пробу с каждым штаммом желательно ставить не менее чем на двух морских свинках.

5.6.4.9.2. Дермонекротическая проба. В тщательно выстриженный участок кожи бока морской свинки или кролика внутрикожно вводят 0,3 - 0,5 мл бульонной культуры. Через 24 - 48 часов возникает воспаление с последующим некрозом и образованием струпа.

На одной морской свинке можно ставить конъюнктивальную и дермонекротическую пробу при изучении свойств одного штамма. При необходимости испытания нескольких культур в выстриженный участок кожи на правом и левом боку кролика можно инъецировать по 3 культуры с каждой стороны.

Для дифференциации возбудителя листериоза от возбудителя рожи свиней пользуются таблицей 2:

Таблица 2

Признаки	Возбудитель листериоза	Возбудитель рожи свиней
Подвижность	Подвижен в молодой 6-18- часовой культуре, выращенной при комнатной температуре	Неподвижен
Лизис листериозным бактериофагом	Лизируется	Не лизируется
Салицин	Разлагает	Не разлагает
Проба на каталазу	Положительная	Отрицательная
Индикаторные среды	Обесцвечивает	Не обесцвечивает
РА с позитивной листериозной сывороткой	Положительная	Отрицательная
Конъюнктивальная проба на	Положительная	Отрицательная

морских свинок		
Дермонекротическая проба	Положительная	Отрицательная

Диагноз на листериоз считается установленным

- при получении положительного результата РНФ;
- обнаружении листерий в патматериале иммунофлюоресцентным методом,
- при выделении грамположительной полиморфной подвижной палочки, образующей каталазу и разлагающей с образованием кислоты глюкозу, мальтозу, трегалозу и салицин; вызывающей (вирулентные штаммы) положительные конъюнктивальную и дермонекротическую пробы у морских свинок и кроликов; дающей положительную РА с листериозной сывороткой; лизирующей листериозным бактериофагом; обладающей патогенностью для лабораторных животных (вирулентные штаммы).

5.6.5. Патологогистологическая диагностика

5.6.5.1. Для патологогистологического исследования необходимо брать следующие материалы: кусочки головного мозга (все отделы), спинного мозга и паренхиматозных органов.

5.6.5.2. Материал фиксируют в 10-процентном растворе нейтрального формалина с последующим заключением в парафин и окраской гематоксилинэозином или в жидкости Карнуа с окраской по Браше, или в 96° этиловом спирте с окраской по Нисслю.

5.6.5.3. Гистологические изменения наиболее сильно проявляются в головном и спинном мозге, где хорошо выражены периваскулиты, состоящие из лимфоцитов и гистиоцитов; отек, дегенерация нейронов, нейронофагия, микроабсцессы и некротические очаги. Наличие микрофокусного энцефалита, проявляющегося очагами, состоящими из скопления моноцитарных и лимфоидных клеток с примесью сегментоядерных лейкоцитов, является отличительным признаком от энцефалита вирусного происхождения.

При септической форме болезни в печени, селезенке, надпочечниках обнаруживают гранулемы, состоящие из клеток лимфоидно-гистиоцитарного типа.

5.6.5.4. При гистологическом исследовании органов ягнят часто находят зернистую дистрофию клеток печени и почек; воспалительные изменения в тонком отделе кишечника и сычуге, мелкоочаговую бронхопневмонию.

5.6.5.5. Для экспрессной диагностики листериоза используют прямой или непрямой метод флюоресцирующих антител для выявления листерий в гистологических срезах проб органов и тканей животных и человека.

5.6.5.5.1. Для исследования необходимо иметь:

- листериозную культуру для контроля активности люминесцирующих сывороток;
- пробы органов и тканей для исследования, которые в случае хранения замораживают при -8 - -10 °С;
- люминесцирующую листериозную сыворотку (для прямого метода) или поливалентную листериозную кроличью сыворотку (если имеются, то и серогрупповые) и флюоресцирующую сыворотку против глобулинов кролика;
- микротом с ножом глубокого охлаждения или микрокриостат (криостат);
- люминесцентный микроскоп;
- чистый ацетон;
- 0,15 М раствор хлорида натрия;
- смесь глицерина (1 часть) и 0,15 М NaCl (9 частей);
- нефлюоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель - диметилфталат;
- предметные и покровные стекла;
- 10-процентный формалин.

5.6.5.5.2. Если невозможно исследовать материал на месте, то кусочки органов и тканей размером 1 x 1, 5 x 2 см помещают в плотно закрываемую стеклянную тару и

заливают 10-процентным формалином. В таком виде материал пересылают в лабораторию.

5.6.5.5.3. Для приготовления рабочих разведений сухую люминесцирующую сыворотку (для прямого метода) или флюоресцирующую сыворотку против глобулинов кролика (для непрямого метода) сначала растворяют в указанном на этикетке ампулы объеме дистиллированной воды.

При наличии осадка сыворотку центрифугируют. Перед нанесением на гистологические срезы тканей флюоресцирующую сыворотку разводят раствором 0,15 М хлорида натрия до рабочего титра, который указан на ампуле.

5.6.5.5.4. Методика приготовления гистологических срезов: из нефиксированных проб органов и тканей готовят на замораживающем микротоме с ножом глубокого охлаждения или криостате (микростате) срезы толщиной не более 5 - 8 микрон в количестве 2 - 3 с каждой пробы; полученные срезы наклеивают на обезжиренные предметные стекла без клеящих растворов, фиксируют чистым ацетоном в течение 15 минут и подсушивают на воздухе; материал, фиксированный в 10-процентном формалине, режут на обычном замораживающем микротоме толщиной не более 5 - 8 микрон, срезы промывают 30 минут в физиологическом растворе и наносят на чистые обезжиренные предметные стекла с наклеивающей жидкостью (белок). Приготовленные срезы на предметных стеклах подсушивают при комнатной температуре или в термостате до полного высыхания.

5.6.5.5.5. Окрашивание срезов прямым методом люминесцирующих антител: на срезы наносят 2 капли флюоресцирующей листериозной сыворотки и препараты выдерживают во влажной камере (в чашках Петри с увлажненной фильтровальной бумагой) при комнатной температуре в течение 30 минут; препараты промывают 2 раза по 10 минут раствором 0,15 М хлорида натрия и 1 раз 10 минут дистиллированной водой, затем высушивают при температуре 35 - 40 °С в течение 15 - 20 минут.

5.6.5.5.6. Окрашивание срезов непрямым методом флюоресцирующих антител: на срезы наносят 1 - 2 капли поливалентной листериозной агглютинирующей кроличьей сыворотки, выдерживают в течение 60 минут во влажной камере при комнатной температуре; сыворотку смывают в течение одной минуты физиологическим раствором хлорида натрия. Остатки раствора удаляют со стекла фильтровальной бумагой; наносят 1 - 2 капли флюоресцирующей сыворотки против глобулинов кролика в рабочем разведении и выдерживают 30 минут при комнатной температуре в закрытых чашках Петри; препараты промывают 2 раза по 10 минут физиологическим раствором хлорида натрия и 10 минут дистиллированной водой, а затем высушивают в термостате при 35 - 40 °С в течение 15 - 20 минут.

5.6.5.5.7. Для люминесцентной микроскопии окрашенные препараты (как прямым, так и непрямыми методами) заключают в буферную смесь из 1 части глицерина и 9 частей 0,15 М NaCl. Гистологические срезы накрывают покровным стеклом, на которое наносят одну каплю нефлюоресцирующего иммерсионного масла (или диметилфталата) и исследуют в люминесцентном микроскопе.

5.6.5.5.8. Для контрастирования фона препарата при окрашивании гистологических срезов можно применять совместно с флюоресцирующей сывороткой бычий альбумин, меченный родамином (согласно наставлению по его применению), который окрашивает исследуемую ткань и постороннюю микрофлору в оранжево-красный цвет (различных оттенков). На этом фоне листерии четко выделяются специфическим золотисто-зеленоватым свечением.

5.6.5.5.9. В качестве контроля при исследовании проб органов и тканей необходимо ставить контроли с нормальной сывороткой, а также во всех случаях проводить окрашивание культуры листерий люминесцирующей сывороткой.

5.6.5.5.10. Положительным результатом обнаружения листерий считается наличие светящихся клеток соответствующей для листерий морфологии, свечение которых

оценивается на 4 и 3 креста.

5.6.6. Серологическая диагностика

Для серологического исследования берут пробы от животных любого возраста, подозреваемых в заболевании листериозом, а также от животных из поголовья, где заболевание подтверждено.

От каждого животного берут из яремной вены 5 - 10 куб. см крови в стерильные пробирки или используют кровь, полученную при убойе животного.

Из отобранных проб крови получают сыворотку методом отстаивания. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают 30 - 60 мин. при температуре 20 - 30 °С, а затем при температуре 4 - 10 °С. Сыворотка крови должна быть прозрачной, без признаков гемолиза.

Допускается консервировать сыворотку 5-процентным раствором карболовой кислоты (1 - 2 капли на 1 куб. см сыворотки) или сухой борной кислоты (2% кислоты к объему сыворотки).

Неконсервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 6 суток со дня взятия пробы, сыворотки консервированные - в течение 30 суток.

5.6.6.1. Реакция агглютинации

5.6.6.1.1. Реакцию агглютинации (РА) в диагностике листериоза применяют для исследования сывороток животных с целью обнаружения листериозных агглютинирующих макроглобулиновых (19S) и микроглобулиновых (7S) антител.

5.6.6.1.2. Результаты РА используют при постановке диагноза в комплексе с другими данными (бактериологическое исследование, эпизоотическая ситуация, клинические признаки, патологоанатомические изменения), а также для выявления скрыто больных и переболевших животных.

5.6.6.1.3. Компоненты реакции и условия их применения.

5.6.6.1.3.1. Для исследования используют консервированные и неконсервированные сыворотки крови без признаков гнилостного распада и гемолиза.

5.6.6.1.3.2. В реакции применяют антигены первой и второй серогрупп, представляющие собой взвесь инактивированных листерий, выпускаемые в лиофилизированном виде. Перед применением необходимо добавить к ним физиологический раствор рН 7,2 в количестве, указанном на этикетке. Разведенные антигены можно хранить при 4° в течение 1,5 - 2 месяцев. Перед употреблением антигены тщательно встряхивают.

5.6.6.1.3.3. Для контроля используют первую и вторую серогрупповые агглютинирующие листериозные сыворотки, содержащие 19S- и 7S-антитела, а также нормальную (отрицательную) сыворотку.

5.6.6.1.3.4. Для дифференцирования 19S- и 7S-антител используют 2-меркаптоэтанол (2-МЭ) или солянокислый цистеин, которые избирательно разрушают макроглобулины (19S).

5.6.6.1.4. Постановка реакции агглютинации.

5.6.6.1.4.1. Испытуемые сыворотки исследуют параллельно с двумя антигенами. При исследовании сывороток крупного рогатого скота и лошадей реакцию ставят в разведениях 1:160 и 1:320, овец, коз и свиней - 1:80 и 1:160, кроликов - 1:20 и 1:40. Разведения сывороток делают в физиологическом растворе.

5.6.6.1.4.2. Реакцию проводят в объеме 1 мл. При исследовании сывороток кроликов в первую пробирку наливают 0,9 мл физиологического раствора, во вторую - 0,5 мл. Затем в первую пробирку добавляют 0,1 мл сыворотки, перемешивают и переносят 0,5 мл во вторую пробирку. Из второй пробирки 0,5 мл смеси удаляют. Получают разведение сывороток 1:10 и 1:20. Затем в обе пробирки добавляют по 0,5 мл разведенного антигена. Получают разведение сывороток 1:20 и 1:40.

5.6.6.1.4.3. При исследовании сывороток крови крупного рогатого скота и лошадей

сначала готовят основное разведение сыворотки - 1:40, для чего в пробирки наливают 0,1 мл сыворотки и 3,9 мл физиологического раствора. Затем из полученного разведения готовят рабочие разведения сыворотки: наливают в две пробирки по 0,5 мл физиологического раствора. В первую пробирку переносят 0,5 мл основного разведения сыворотки, перемешивают и 0,5 мл смеси переносят во вторую пробирку. Затем из нее удаляют 0,5 мл смеси, после чего в обе пробирки добавляют по 0,5 мл разведенного антигена. Получают разведение сывороток 1:160 и 1:320.

5.6.6.1.4.4. При исследовании сывороток крови овец, коз и свиней готовят основное разведение сыворотки - 1:20 (0,1 мл сыворотки + 1,9 мл физиологического раствора). Для приготовления рабочих разведений наливают в две пробирки по 0,5 мл физиологического раствора. В первую пробирку переносят 0,5 мл основного разведения сыворотки, перемешивают и 0,5 мл смеси из нее переносят во вторую пробирку. Из второй пробирки удаляют 0,5 мл смеси. Затем в обе пробирки добавляют по 0,5 мл разведенного антигена. Получают необходимое разведение сыворотки 1:80 и 1:160.

5.6.6.1.4.5. При постановке реакции с испытуемыми сыворотками одновременно ставят следующие контроли:

- с отрицательной сывороткой в тех же разведениях, как и испытуемые;
- с положительной агглютинирующей сывороткой соответствующего серовара, содержащей 7S-антитела, в разведении до ее предельного общего титра;
- 1 мл разведенного антигена первой серогруппы (одну пробирку) и 1 мл разведенного антигена второй серогруппы (одну пробирку) - для контроля антигена.

5.6.6.1.4.6. Пробирки с испытуемыми и контрольными сыворотками и антигенами выдерживают в термостате 18 - 20 часов при 37°, затем при комнатной температуре в течение 1,5 - 2 часов, после чего учитывают результаты реакции.

5.6.6.1.5. Учет и диагностическая оценка реакции.

5.6.6.1.5.1. Результаты реакции оценивают в крестах по следующей схеме:

"++++" - полное просветление жидкости при наличии четко выраженного зонтика, который при встряхивании разбивается на мелкие хлопья, комочки;

"+++" - те же явления, но надосадочная жидкость слегка опалесцирует;

"++" - просветление жидкости выражено слабее, имеется недостаточно четко сформированный зонтик, при встряхивании разбивается на мелкие хлопья и крупинки;

"+" - незначительное просветление при наличии зонтика, при встряхивании - мелкие крупинки и комочки;

"-" - отрицательная, отсутствие просветления и зонтика.

5.6.6.1.5.2. Реакция признается положительной при обнаружении агглютинации с оценкой не менее чем на два креста в разведениях сыворотки 1:160 для овец, свиней и коз; 1:320 для крупного рогатого скота, лошадей; 1:40 для кроликов. Сыворотки, давшие отрицательную реакцию в указанных разведениях, подлежат дополнительной обработке 2-МЭ или солянокислым цистеином.

5.6.6.1.6. Обработка сывороток 2-МЭ.

5.6.6.1.6.1. 2-МЭ - бесцветная жидкость, обладающая запахом, поэтому работу с 2-МЭ проводят в вытяжном шкафу. Рабочий раствор 2-МЭ готовят непосредственно перед применением, разводя исходный препарат дистиллированной водой согласно титру, указанному на этикетке флакона.

5.6.6.1.6.2. Сыворотки крови кроликов разводят физиологическим раствором 1:5 (0,2 мл сыворотки + 0,8 мл физиологического раствора), сыворотки овец, коз и свиней - 1:10 (0,1 мл сыворотки + 0,9 мл физиологического раствора), сыворотки крови крупного рогатого скота и лошадей - 1:20 (0,05 мл сыворотки + 0,95 мл физиологического раствора).

5.6.6.1.6.3. Затем к 1 мл разведенной сыворотки добавляют 1 - 2 капли рабочего разведения 2-МЭ. Пробирки плотно закрывают резиновыми пробками и помещают в водяную баню (37°) на 1 час. После этого сыворотку, обработанную 2-МЭ, разливают в 2

пробирки по 0,5 мл и в одну из них добавляют 0,5 мл разведенного антигена первой серогруппы, в другую - 0,5 мл разведенного антигена второй серогруппы. Получают разведение 1:10 для сывороток кроликов, 1:20 - овец, коз и свиней, 1:40 - для сывороток крови крупного рогатого скота и лошадей.

5.6.6.1.6.4. При постановке реакции с испытуемыми сыворотками одновременно ставят следующие контроли:

- с отрицательной сывороткой в том же разведении, как и испытуемые;
- с агглютинирующей сывороткой, содержащей 19S-антитела, в том же разведении, что и испытуемые;
- с агглютинирующей сывороткой, содержащей 7S-антитела, в разведении до предельного титра 7S-антител;
- 1 мл разведенного антигена первой серогруппы (одна пробирка) и 1 мл разведенного антигена второй серогруппы (одна пробирка) - для контроля антигена.

5.6.6.1.6.5. Агглютинирующие контрольные сыворотки обрабатывают 2-МЭ так же, как и испытуемые. Отрицательная сыворотка обработке 2-МЭ не подлежит.

5.6.6.1.6.6. Пробирки с контрольными и испытуемыми сыворотками и антигенами выдерживают в термостате 18 - 20 часов при 37°, затем при комнатной температуре 1,5 - 2 часа, после чего учитывают результаты реакции.

5.6.6.1.7. Обработка сывороток солянокислым цистеином.

Раствор цистеина готовят непосредственно перед применением. Для получения рабочего раствора цистеина 35,1 мг препарата растворяют в 1 мл 0,2 М NaOH. Для приготовления 0,2 М раствора едкого натра растворяют 8 г реактива в 1 л дистиллированной воды.

Сыворотки крови кроликов разводят в 2,5 раза (0,2 мл сыворотки + 0,3 мл физраствора), сыворотки овец, коз и свиней - 1:5 (0,1 мл сыворотки + 0,4 мл физраствора), сыворотки крупного рогатого скота и лошадей - 1:10 (0,05 мл сыворотки + 0,45 мл физраствора). Затем к 0,5 мл разведенной сыворотки добавляют 0,5 мл рабочего раствора цистеина. Пробирки закрывают резиновыми пробками и выдерживают в течение 18 - 20 часов в термостате при 37°. После этого сыворотку, обработанную цистеином, разливают в 2 пробирки по 0,5 мл, в одну из них добавляют 0,5 мл разведенного антигена первой серогруппы, в другую - 0,5 мл разведенного антигена второй серогруппы. Получают разведение сыворотки 1:10 для кроликов, 1:20 - для овец, коз и свиней и 1:40 - для крупного рогатого скота и лошадей.

Контроли реакции ставят как при обработке сывороток 2-МЭ с последующим выдерживанием испытуемых и контрольных проб при 37° (18 - 20 часов) и при комнатной температуре (1,5 - 2 часа).

5.6.6.1.8. Учет и оценка реакции после обработки сывороток 2-МЭ или солянокислым цистеином.

5.6.6.1.8.1. Реакция признается положительной при обнаружении агглютинации с оценкой не менее чем на два креста в сыворотках, обработанных 2-МЭ или цистеином, в разведении 1:10 для кроликов, 1:20 - для овец, коз и свиней, 1:40 - для крупного рогатого скота и лошадей. При этом контрольная агглютинирующая сыворотка, содержащая 19S-антитела, должна дать отрицательную реакцию в том же разведении, а контрольная сыворотка, содержащая 7S-антитела, - положительную реакцию в разведении до предельного титра 7S-антител.

5.6.6.1.8.2. При оценке реакции необходимо учитывать, что цистеин легко окисляется на воздухе, образуя мелкие крупинки, которые можно легко отличить от специфической агглютинации.

5.6.6.1.8.3. В заключении лаборатории о результатах исследования проб сывороток крови должна быть сообщена диагностическая оценка результатов исследования (положительная или отрицательная).

5.6.6.2. Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) с листериозным антигеном применяется для исследования на листериоз сывороток крови всех видов животных и человека.

Применение РСК не исключает применения других методов диагностики листериоза, однако ценность этой реакции состоит в том, что она ускоряет постановку диагноза и позволяет выявлять больных животных, не имеющих выраженных клинических признаков болезни (листерионосителей).

Реакцию ставят в водяной бане в общем объеме 1,0 мл всех компонентов при температуре 37 - 38°.

5.6.6.2.1. Компоненты реакции и условия их применения:

- гемолизин с рабочим титром не ниже 1:500; титрование гемолизина по общепринятой схеме проводят периодически 1 раз в 3 месяца, а также при получении каждой новой серии;

- листериозный антиген для РСК; применяют в рабочем титре, указанном на этикетке флакона; срок годности антигена - 2 года, при условии хранения его в темном прохладном месте (5 - 10 °С);

- позитивные листериозные сыворотки (ТУ 46-21-182-75); используют при титровании комплемента в бактериолитической системе и для контроля реакции в главном опыте после предварительной инактивации в день постановки реакции в разведении 1:10 в течение 30 минут при 56 - 60 °С (сыворотки крупного рогатого скота и свиней при 56 - 57 °С, лошадей и овец при 58 - 59 °С, кроликов - 60 °С);

- нормальные сыворотки заведомо здоровых животных тех же видов, как и испытуемые; применяют при титровании комплемента в бактериолитической системе и для контроля реакции в главном опыте так же, как и позитивные сыворотки после предварительной инактивации при указанном режиме и в таких же дозах;

- комплемент сухой для РСК (ГОСТ 16446-78); применяется в титре, установленном в день постановки реакции путем титрования в бактериолитической системе;

- 2,5-процентная взвесь эритроцитов барана в физиологическом растворе; лучше применять сенсibilизированные эритроциты (гемолитическую систему). Для сенсibilизации эритроцитов гемолитическую систему (смесь равных объемов 2,5-процентной взвеси эритроцитов и рабочего разведения гемолизина) выдерживают в водяной бане при 37 - 38 °С в течение 20 минут; гемолитическую систему применяют в реакции в дозе 0,4 мл;

- физиологический раствор (0,85-процентный) химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде, рН 7,0 - 7,2.

5.6.6.2.2. Титрование компонентов.

Перед постановкой главного опыта проводят титрование компонентов реакции: гемолизина и комплемента в гемолитической и бактериолитической системах.

Титрование гемолизина.

Гемолизин титруют в разведениях: 1:1000, 1:1200, 1:1500, 1:1800, 1:2000, 1:2500, 1:3000 и т.д., которые готовят из основного его разведения 1:100.

Комплемент используют в реакции в разведении 1:10 или 1:20 по 0,2 мл. Взвесь эритроцитов барана по 0,2 мл. Взамен антигена и сыворотки в пробирки прибавляют по 0,4 мл физиологического раствора. Время течения реакции - 10 минут в водяной бане при температуре 37 - 38 °С.

При титровании гемолизина ставят следующие контроли:

- гемолизин 1:100 с эритроцитами и физраствором в отсутствии комплемента;

- комплемент с эритроцитами и физраствором в отсутствии гемолизина;

- эритроциты с физраствором в отсутствии гемолизина и комплемента.

Во всех контролях гемолиз эритроцитов должен отсутствовать.

Титром гемолизина считается наименьшее количество его, потребное для полного

гемолиза 0,2 мл взвеси эритроцитов при комплементе 0,2 мл в разведении 1:10 или 1:20.

Для титрования комплемента и постановки главного опыта гемолизин применяют в рабочем титре, который является четырехкратной дозой по сравнению с предельным титром. Например, если предельный титр равен 1:2000, то в реакции следует применять разведение 1:500, для чего к 1 мл гемолизина приливают 499 мл физиологического раствора (табл. 3).

Таблица 3

Титрование гемолитической сыворотки

№ пробирки	Разведенная гемолитическая сыворотка, мл	2,5-процентная взвесь эритроцитов, мл	Комплемент 1:20, мл	Физиологический раствор, мл	Результат опыта
1	0,2 (1:1000)	0,2	0,2	0,4	Полный гемолиз
2	0,2 (1:1200)	0,2	0,2	0,4	
3	0,2 (1:1500)	0,2	0,2	0,4	
4	0,2 (1:1800)	0,2	0,2	0,4	
5	0,2 (1:2000)	0,2	0,2	0,4	
6	0,2 (1:2500)	0,2	0,2	0,4	Частичный гемолиз
7	0,2 (1:3000)	0,2	0,2	0,4	
8	0,2 (1:3500)	0,2	0,2	0,4	
9	0,2 (1:4000)	0,2	0,2	0,4	
10	0,2 (1:5000)	0,2	0,2	0,4	
Контроль-ные	0,2 (1:100)	0,2	-	0,6	Полная задержка гемолиза
	-	0,2	0,2	0,6	
	-	0,2	-	0,8	

Примечание: В данном примере предельный титр гемолитической сыворотки равен 1:2000, а для реакции следует применять ее в титре 1:500.

Титрование комплемента в гемолитической системе.

Комплемент титруют в дозах 0,02, 0,04, 0,06 и т.д. (с интервалом по 0,02 мл) до 0,20 мл основного его разведения. В каждую пробирку к недостающему до 0,2 мл количеству основного разведения комплемента добавляют физиологический раствор: в первую пробирку 0,18 мл, во вторую 0,16 мл и т.д. После этого во все пробирки наливают по 0,4 мл физиологического раствора и по 0,4 мл гемолитической системы. Реакция должна сопровождаться контролями компонентов в смеси с эритроцитами (контроль гемолизина, контроль комплемента, контроль физраствора), а также контролем гемолитической системы при максимальной дозе комплемента (0,2 мл основного разведения). После тщательного смешивания компонентов путем встряхивания штативы с пробирками помещают на 10 минут в водяную баню при 37 - 38 °С.

Титром комплемента в гемолитической системе считается наименьшее его количество, необходимое для полного гемолиза в указанных условиях 0,2 мл взвеси эритроцитов при рабочей дозе гемолизина (табл. 4).

Таблица 4

Титрование комплемента в гемолитической системе

1. Комплемент в разведении 1:10 или 1:20	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
2. Физраствор до объема 0,2 мл	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	0
3. Сенсibilизированные эритроциты барана (гемолитическая)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

система)										
4. Физраствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня при 37-38°C в течение 10 минут										
Результат реакции	ЗГ	ЗГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примечание:

ЗГ - задержка гемолиза;

ЧГ - частичная задержка гемолиза;

ПГ - полный гемолиз.

Если титр комплемента в гемолитической системе определяется дозой 0,18 мл и выше (основное разведение 1:20), то титрование в гемолитической системе повторяют, пользуясь основным разведением комплемента 1:10.

Титрование комплемента в бактериолитической системе.

В бактериолитической системе комплемент титруют, начиная с дозы на один-два интервала ниже против его титра в гемолитической системе. Если титр комплемента в гемолитической системе определяется дозой 0,08 мл основного разведения, то в бактериолитической системе его титруют в дозах: 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 и т.д. до 0,20 мл того же основного разведения.

Каждую дозу комплемента исследуют с двумя листериозными и с двумя нормальными сыворотками в присутствии антигена (в рабочем титре) и с контролем сывороток без антигена.

Инактивированные в разведении 1:10 листериозные и нормальные сыворотки разливают по 0,2 мл в пробирки соответствующих рядов.

Таким образом, в бактериолитической системе комплемент титруют в 8-ми рядах пробирок (по 9 пробирок в каждом ряду) (табл. 5).

Таблица 5

Титрование комплемента в бактериолитической системе

1. Комплемент в разведении 1:10	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
2. Физраствор до объема 0,2 мл	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	0
3. Антиген в рабочем титре (первый ряд пробирок) или физиологический раствор (второй ряд пробирок без антигена)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
4. Нормальная сыворотка в разведении 1:10	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня при 37-38°C в течение 20 минут										
5. Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня при 37-38°C в течение 20 минут										
Результат реакции	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примечание: ЧГ - частичный гемолиз; ПГ - полный гемолиз.

Требуемые разведения комплемента целесообразно готовить сразу для всего опыта титрования; с этой целью берут дополнительный ряд пробирок, в который разливают применяемые при титровании дозы комплемента в десятикратном объеме, т.е. - 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 и т.д. до 2,0 мл. Недостающий до 2 мл объем жидкости в пробирках доливают

соответствующим количеством физиологического раствора: 1,6; 1,4; 1,2; 1,0 и т.д. Приготовленные таким способом разведения комплемента разливают пипеткой или аппаратом Флоринского в соответствующие опытные пробирки по 0,2 мл: в первые пробирки всех 8-ми рядов из первого разведения (доза основного разведения 0,04 мл), во вторые пробирки всех 8-ми рядов из второго разведения (доза основного разведения 0,06 мл) и т.д. После разлива комплемента в первые ряды пробирок с листериозными и нормальными сыворотками наливают по 0,2 мл антигена в рабочем титре, во вторые - по 0,2 мл физиологического раствора. Компоненты смешивают энергичным встряхиванием штативов и помещают в водяную баню при 37 - 38° на 20 минут (связывание комплемента). Затем во все пробирки наливают по 0,4 мл гемолитической системы, компоненты смешивают и штативы снова помещают в водяную баню при 37 - 38° на 20 минут (фаза гемолиза).

Титром комплемента в бактериолитической системе является минимальное его количество, вызывающее полный гемолиз в пробирках с нормальными сыворотками с антигеном и без антигена, с листериозными сыворотками без антигена, при задержке гемолиза в пробирках с листериозной сывороткой и антигеном в течение 20 минут при 37 - 38 °С (таблица 4), что принимается за рабочий титр комплемента для главного опыта.

5.6.6.2.3 Главный опыт

Разведение комплемента для главного опыта.

Количество чистого комплемента, необходимого для всего опыта, определяется по формуле:

$$\frac{A - B}{C} \times 2,$$

где:

A - титр комплемента, установленный в баксистеме;

B - количество проб, подлежащих исследованию;

C - разведение комплемента.

Например, требуется произвести исследование 100 проб сывороток (с антигеном и без, т.е. 200 пробирок). Титр комплемента в бактериолитической системе 0,10 мл основного разведения 1:10. Доза чистого комплемента равна 2,0 мл ($\frac{0,10 \times 100 \times 2}{10}$).

Количество разведенного комплемента для исследования 100 проб равно 40 мл (0,2×200), поэтому к 2,0 мл чистого комплемента следует добавить 38,0 мл физраствора.

Основные условия постановки главного опыта.

Реакцию ставят в общем объеме 1,0 мл всех компонентов, т.е. каждый компонент применяют в объеме 0,2 мл. Испытуемые сыворотки исследуют с антигеном и без антигена в разведении 1:10 после предварительной инактивации в водяной бане при температуре 56 - 60 °С и выше, в зависимости от вида животных, в течение 30 минут. Комплемент применяют в установленном титре. Время связывания комплемента в бактериолитической системе - 20 минут, реакция гемолиза - 20 минут (в водяной бане при 37 - 38 °С).

Основные контроли главного опыта:

- отрицательная и положительная (листериозная) сыворотки в разведении 1:10 с антигеном и без антигена;

- антиген на антикомплемментарность и гемотоксичность (двойная доза антигена с комплементом в рабочем титре и без комплемента), компоненты смешивают и ставят в водяную баню на 20 минут, после чего добавляют гемолитическую систему по 0,4 мл и снова выдерживают в водяной бане в течение 20 минут;

- гемолитическая система с комплементом и без комплемента;

- комплемент в двойной дозе с эритроцитами без гемолизина.

5.6.6.2.4 Учет и оценка результатов реакции.

Результаты реакции оценивают по степени задержки гемолиза эритроцитов в крестах 2 раза: первый раз - тотчас после водяной бани, второй раз - через 14 - 18 часов выдерживания проб при комнатной температуре по следующей схеме:

"++++" (4 креста) - отсутствие гемолиза эритроцитов, надосадочная жидкость прозрачная;

"+++" (3 креста) - гемолиз 25% эритроцитов;

"++" (2 креста) - гемолиз 50% эритроцитов;

"+" (1 крест) - гемолиз 75% эритроцитов;

"-" (минус) - полный гемолиз, осадок отсутствует.

Реакцию считают: положительной - при задержке гемолиза эритроцитов на 3 - 4 креста; сомнительной - при задержке гемолиза на 2 креста; отрицательной - при задержке гемолиза на 1 крест или полном гемолизе эритроцитов.

Животные, с сыворотками крови которых получены сомнительные реакции, подлежат повторному исследованию через 2 - 3 недели. При повторном получении сомнительной реакции результат исследования считают отрицательным.

5.6.6.3. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) при листериозе людей и животных.

5.6.6.3.1. Общие положения.

РНГА с листериозным антигенным инактивированным эритроцитарным диагностикумом (ЭД) применяют при исследовании сывороток крови людей и животных для обнаружения листериозных антител с целью диагностики болезни.

РНГА рекомендуется для оперативных и диагностических серологических обследований с целью выявления закономерностей формирования противолистерийного иммунитета у различных групп людей и животных.

Определение возрастных, сезонных, профессиональных среднесезонных колебаний уровня иммунитета является необходимым для всестороннего анализа напряженности эпизоотического и эпидемического процесса на конкретной географической территории.

РНГА используют для дифференциации противолистерийных 19S- и 7S-антител, что дает возможность отличить свежий инфекционный процесс от скрытого бактерионосительства и хронических малосимптомных форм заболевания.

РНГА также применяют для дифференциации поствакцинальных антител от постинфекционных.

РНГА - доступный, экономичный, легко воспроизводимый метод, позволяющий получать стандартные результаты и исследовать большое количество проб сывороток крови в весьма короткие сроки.

5.6.6.3.2. Компоненты реакции и условия их применения.

Солевые растворы и их приготовление:

- физиологический раствор (рН 7,0 - 7,2) для растворения сухой гипериммунной листериозной кроличьей сыворотки: 8,5 г хлорида натрия на 1 л дистиллированной воды;

- 0,15 М фосфатный буферный раствор (рН 7,2) для приготовления сходных разведений исследуемых сывороток, 0,2М раствора солянокислого цистеина и постановки РНГА:

раствор 1 - 21,19 г двузамещенного фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) предварительно высушенного в течение 3 суток при 37 °С, растворяют в 1 л дистиллированной воды;

раствор 2 - 20,41 г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) растворяют в 1 л дистиллированной воды. Для получения 100 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2) 76,1 мл раствора 1 смешивают с 23,9 мл раствора 2;

- раствор мертиолат для консервирования исследуемых сывороток: препарат растворяют в дистиллированной воде в соотношении 1:1000. Для консервирования

сывороток используют приготовленный раствор мертиолата из расчета 1:10, т.е. конечная концентрация реактива должна составлять 1:10000.

Сухая гипериммунная листериозная кроличья сыворотка, используемая как положительный контроль, характеризующий чувствительность эритроцитарного диагностикума. Сыворотку растворяют физиологическим раствором до ее первоначального объема, указанного на этикетке ампулы.

50-процентная взвесь формализированных бараньих эритроцитов для адсорбции исследуемых сывороток, содержащих антитела к эритроцитам барана.

Сухие контрольные формализированные эритроциты барана, представляющие 0,33-процентную взвесь после растворения в фосфатном буферном растворе (рН 7,2) в объеме, указанном на этикетке ампулы.

Сухой ЭД, представляющий формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные инактивированным антигеном возбудителя листериоза. Антиген приготовлен из штамма листерий 9-127 первого серовара методом гидролиза предварительно высушенной в ацетоне бактериальной массы в фосфатном буферном растворе (рН 6,4).

Сухой ЭД и контрольные к нему эритроциты имеют вид пористой коричневой таблетки, которая при добавлении дистиллированной воды в течение 2 минут образует однородную взвесь коричневого цвета.

Для исследования используют свежие и консервированные сыворотки крови без признаков гнилостного распада и гемолиза.

Для дифференциации 19S- и 7S-антител, позволяющей отличить свежий инфекционный процесс от скрытого бактерионосительства и хронических малосимптомных форм заболевания, а также постинфекционное иммунное состояние от поствакцинального, используют 0,2 М раствор солянокислого цистеина. Его готовят перед использованием: 35,1 мг препарата растворяют в 1 мл 0,2 М раствора едкого натра.

Приготовление 0,2 М раствора едкого натра: 8 г реактива растворяют в 1 л фосфатного буферного раствора (рН 7,2).

5.6.6.3.3. Исследование сывороток крови людей и животных в РНГА.

Подготовка сывороток к исследованию.

Испытуемые сыворотки крови людей и животных разводят 1:5 в пробирках 0,15 М фосфатным буферным раствором (рН 7,2) для выявления наиболее специфичных 7S-антител, а для выявления антител суммарной активности (19S- + 7S-антитела) сыворотки крови кроликов разводят 1:10, сыворотки крови людей - 1:40, мелкого рогатого скота и свиней - 1:80, а крупного рогатого скота - 1:160. До постановки РНГА разведенные сыворотки, предназначенные для обнаружения антител суммарной активности, сохраняют при 4 °С.

В пробирки с сыворотками, разведенными 1:5, вносят равный объем 0,2 М раствора солянокислого цистеина, получая исходное разведение 1:10. Эти пробирки закрывают резиновыми пробками и выдерживают при 37 °С 2 часа. После этого обработанные и необработанные раствором солянокислого цистеина сыворотки исследуют в РНГА.

Подготовка к работе эритроцитарного диагностикума.

Для получения 0,33-процентной взвеси сенсibilизированных эритроцитов сухой препарат растворяют 0,5 мл дистиллированной воды и к полученному объему добавляют 5,5 мл 0,15 М фосфатного буферного раствора (рН 7,2). Эритроцитарный диагностикум выдерживают 20 минут, хорошо перемешивая, при комнатной температуре.

Постановка РНГА микрометодом.

Реакцию ставят в объеме 0,1 мл. В каждую лунку капельницей вносят по 0,05 мл 0,15 М фосфатного буферного раствора (рН 7,2). В первую лунку ряда прибавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки в соответствующем разведении. С помощью микродильторов по 0,05 мл сыворотки переносят из первой лунки во вторую, из второй в третью и т.д., т.е. готовят последовательные двукратные разведения. С целью выявления 7S-антител у

людей и всех видов животных разведения в лунках должны соответствовать значениям 1:20 и 1:40. Для выявления антител суммарной активности пробы сывороток крови кроликов должны быть разведены в лунках с 1:20 до 1:80, людей - с 1:80 до 1:640, мелкого рогатого скота и свиней - с 1:160 до 1:640, а крупного рогатого скота - с 1:320 до 1:640. При получении положительных результатов определяется максимальный титр сывороток. После титрования в каждую лунку вносят по 0,05 мл 0,33-процентной взвеси ЭД. Панели оставляют при комнатной температуре и через 3 - 4 часа проводят предварительный учет результатов, а окончательный учет осуществляют на следующий день. Можно учитывать результат однократно после выдерживания панелей при 4 °С в течение 16 - 18 часов.

Контроли, используемые в реакции:

- контроль ЭД и несенсибилизированных эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации.

Для этого в одну лунку к 0,05 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2) добавляют 0,05 мл 0,33-процентной взвеси ЭД, а в другую лунку к тому же количеству буферного раствора - 0,05 мл контрольных 0,33-процентных несенсибилизированных эритроцитов;

- контроль специфичности РНГА для каждой исследуемой сыворотки.

Для этого к 0,05 мл исследуемой сыворотки в наибольшей для данного опыта концентрации добавляют 0,05 мл 0,33-процентной взвеси несенсибилизированных эритроцитов.

Во всех указанных случаях контроли должны быть отрицательными, т.е. агглютинации не должно быть. В случае положительного контроля исследуемой сыворотки ее адсорбируют 50-процентной взвесью формализированных эритроцитов барана согласно п. 5.6.8.3.3.5;

- контроль чувствительности эритроцитарного диагностикума: титруют в объеме 0,05 мл гипериммунную листериозную кроличью сыворотку до титра, указанного на этикетке ампулы; в каждую лунку добавляют 0,05 мл 0,33-процентной взвеси ЭД. С учетом результатов серологических реакций в дальнейшем может быть использован ЭД, дающий реакцию с листериозной сывороткой не менее 1/3 ее предельного титра (положительный контроль).

В случае необходимости адсорбции исследуемых сывороток бараными эритроцитами к 1 мл сыворотки добавляют 2 капли (0,1 мл) 50-процентной взвеси формализированных эритроцитов. Смесь встряхивают и выдерживают 30 минут при 37 °С или 60 минут при 20 - 22 °С либо 18 часов при 4 °С. Сыворотку центрифугируют при 1,5 тыс. оборотов в мин. в течение 10 минут или отстаивают, после чего проводят ее повторное исследование в РНГА.

При использовании макрометода РНГА ставят в объеме 0,4 мл. В каждую лунку пипеткой вносят по 0,2 мл 0,15 М фосфатного буферного раствора (рН 7,2). В первую лунку ряда прибавляют 0,2 мл исследуемой сыворотки в соответствующем разведении. С помощью пипеток переносят по 0,2 мл сыворотки из первой лунки во вторую, из второй в третью и т.д., т.е. готовят последовательные двукратные разведения. После титрования в каждую лунку вносят по 0,2 мл 0,33-процентной взвеси эритроцитарного диагностикума. Учет результатов проводят так же, как и при микрометоде.

5.6.6.3.4. Учет и оценка РНГА.

Учет результатов реакции проводят по четырехплюсовой системе:

"++++" - эритроциты покрывают все дно лунки ровным слоем, наблюдается картина "зонтика" с ровными краями;

"+++ " - эритроциты покрывают дно лунки "зонтиком" несколько меньшего размера;

"++" - маленький "зонтик" с неровными краями и "пуговкой" в центре;

"+" - "пуговка" в центре лунки, имеются отдельные зерна агглютината;

"-" - "пуговка" с ровными четко очерченными краями.

Реакция считается положительной, если наблюдается агглютинация на три и четыре плюса.

Оценку результатов РНГА проводят согласно титрам, указанным в таблице 6, с учетом антител суммарной активности и 7S-антител.

Во всех случаях более достоверные результаты могут быть получены при исследовании парных сывороток.

Для определения динамики нарастания антител суммарной активности первое исследование проводят на 8 - 9 день от начала болезни, а второе - на 16 - 18 день.

Для определения динамики нарастания 7S-антител первое исследование проводят также на 8 - 9 день от начала болезни, а второе - через 21 - 30 дней.

Наращение титра антител суммарной активности в 4 и более раза, а 7S-антител - в 2 и более раза подтверждает диагноз листериоза.

Примерные значения титров антител суммарной активности и 7S-антител по срокам болезни указаны в таблице 7:

Таблица 6

Исследуемые сыворотки	Положительные результаты		Сомнительные результаты	
	Титр антител суммарной активности	Титр 7s-антител	Титр антител суммарной активности	Титр 7s-антител
Люди	1:640	1:40	1:320	1:20
	1:640	1:20	1:320	-
	1:640	-		
	1:320	1:40	1:160	1:20
	1:160	1:40	1:80	1:20
	1:80	1:40		
	-	1:40		
Крупный рогатый скот	1:640	1:40	1:320	1:40
	1:640	1:20	1:320	1:20
	1:640	-		
Мелкий рогатый скот	1:640	1:40	1:320	1:20
	1:640	1:20	1:320	-
	1:640	-	1:160	1:20
	1:320	1:40		
	1:160	1:40		
Свины	1:640	1:40	1:160	1:20
	1:640	1:20	1:160	-
	1:640	-		
	1:320	1:40		
	1:320	1:20		
	1:320	-		
	1:160	1:40		
Кролики	1:80	1:40	1:40	1:20
	1:80	1:20	1:40	-
	1:80	-	1:20	1:20
	1:40	1:40		

Таблица 7

Сроки болезни	Значения титров	
	Антител суммарной активности	7s-антител
8-9 день	1:20 и 1:160	0
16-18 день	1:320 и более	0 – 1:40
21-30 день	1:160 и менее	1:20 и более

Наиболее специфичные 7S-антитела сохраняются в сыворотке крови людей и животных более трех месяцев, что дает возможность проводить ретроспективный анализ исследуемого материала.

6. САЛЬМОНЕЛЛЕЗ

(лат., англ. – **Salmonellosis**; фр., нем. – **Salmonellose**)
(синонимы болезни – тиф, паратиф)

Сальмонеллез, как зоонозная инфекция, по заключению экспертов ВОЗ, не имеет себе равных по сложности эпизоотологии, эпидемиологии и трудностям борьбы с ним. Во многих странах, в т.ч. и в России, сальмонеллез людей, животных и птиц является важнейшей социально-экономической проблемой. Ущерб от сальмонеллеза связан с большими потерями из-за смертности молодняка, снижения продуктивности, качества продукции и наложения ограничительных мероприятий на выпуск продукции, затрат на диагностические и лечебно-профилактические мероприятия. Обсемененные сальмонеллами яйца и мясо птиц являются основными причинами пищевых токсикоинфекций у людей. Сальмонеллез тормозит развитие животноводства требует углубленного изучения. Несмотря на проведение профилактических мероприятий в борьбе с сальмонеллезом, в некоторых регионах страны тенденции к снижению интенсивности эпизоотического процесса не наблюдается. Особенно значительный ущерб отмечается в свиноводческой отрасли, составляя 25-35% от всех инфекционных болезней. В.А. Мандрыко (2003) установлено, что за период с 1996 по 2002 гг. в Ростовской области сальмонеллез свиней занимал второе место по количеству заболевших животных (11,6% от всех инфекционных болезней) и удельный вес его имел тенденцию к увеличению. В 2006 г. на территории России было установлено 249 неблагополучных пунктов по сальмонеллезу свиней. С.Н. Латышев (2009) и М.М. Микаилов (2012) отмечают, что в нозологической структуре инфекционных болезней овец сальмонеллез также является одним из наиболее распространенных: от общего количества болезней инфекционной патологии на его долю приходится более 26%.

Сальмонеллезы – большая группа зоонозных болезней преимущественно сельскохозяйственных животных, характеризующихся у молодняка при остром течении лихорадкой, септициемией, токсикозом и диареей, а при подостром и хроническом – пневмонией и артритом; у взрослых самок – абортми; у людей протекает в виде пищевых токсикоинфекций.

В Европе болезнь известна с конца 18 века под названием “суставолом” жеребят. В 1885 г. американские ветеринарные врачи Даниэль Сальмон и Теобальд Смит выделили из трупов свиней *V. suispestifer* – возбудителя, как они считали, чумы свиней. В 1888 году немецкий врач Гертнер (Gärtner, 1848–1934), выделил из мяса больной коровы особые микробы, которые оказались идентичны бактериям, обнаруженным им в селезенке умершего больного, употреблявшего в пищу это мясо. Микроорганизм получил название *S. enteritica* (палочка Гертнера). Затем Ф. Лёффлер (1890), С.С. Мережковский (1893), Ж. Даниш (1900) выделили возбудитель, также вызывающий аналогичные поражения у человека и у мышей (мышиный тиф).

Зарегистрирован паратиф: в 1892 г. Лёффлером (F. Löffler) - у птиц; в 1897 г. Томассеном (Thomassen) в Голландии - у телят; в 1907 г. Глессером (Glasser) в Германии -

у свиней; в 1919 г. Баром в Дании – у пчел; в 1920 г. Тен Бруком (Ten Broek) – у кроликов; в России паратиф лошадей описан в 1901 году Д.В. Поляковым; в 1910 г. П.Н. Андреевым – у овец; в 1913 году О. Майером и Р. Беркером - у жеребят; в 1930 г. А.П. Любимовым - у серебристо-черных лисиц.

Все они были объединены в группу паратифозных микробов и в 1934 г. получили название сальмонеллы, а болезнь - сальмонеллез.

6.1. Этиология

Бактерии рода *Salmonella*, отнесенные к семейству энтеробактерий, в настоящее время объединяют более 2300 сероваров, разделенных на 52 серогруппы, большинство из которых имеют самостоятельные названия. Патогенны для животных и человека. Основные возбудители сальмонеллеза животных относятся к серогруппам В, С и D. Перечень основных и редко встречающихся возбудителей сальмонеллеза животных приведен в таблице 8.

Таблица 8.

Возбудители сальмонеллеза животных

Виды животных	Основные возбудители		Редко встречающиеся	
	серовар	серогруппа	серовар	серогруппа
Крупный рогатый скот	dublin	D	enteritidis	D
Свиньи	choleraesuis	C	dublin	D
Мелкий рогатый скот	abortusovis	B	dublin	D
Лошади	abortusequi	B	–	–
Куры	gallinarum	D	–	–
	pullorum			
	enteritidis	–	–	–
	typhimurium	–	–	–
	anatum			
Индейки	gallinarum-pullorum	D	enteritidis	D
Утки	typhimurium	B	enteritidis	D
Песцы, лисицы	dublin	D	–	–
	typhimurium	B	–	–
	choleraesuis	C	–	–

Возбудители сальмонеллеза — мелкие, прямые, с закругленными концами грамотрицательные палочки, спор и капсул не образуют, подвижные (исключение *S. gallinarum-pullorum*), факультативные анаэробы. Большинство сальмонелл хорошо растет на обычных питательных средах при температуре 37°C. Для идентификации и дифференциации от эшерихий используют выращивание на специальных средах Эндо, Плоскорева, Левина, висмут-сульфит-агаре. Для полной типизации по О- и Н-антигенам используют реакцию агглютинации с поливалентными и монорецепторными О- и Н-сыворотками.

По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам сальмонеллы относятся к группе малоустойчивых (первая группа). В почве, навозе сохраняются в течение 9...10 мес, в питьевой воде – 10-120 дней, в комнатной пыли – 8-18 мес, в соленом и копченном мясе – 2,5-3 мес, в твороге, масле – 6 мес. Замораживание переносят в течение 4-5 мес, нагревание до 80°C – до 15 мин. 2%-ные горячие растворы гидроксида натрия или калия, 2%-ные растворы формальдегида, хлорсодержащие препараты (однохлористый йод, хлорная известь и др.) с содержанием не менее 2 % активного хлора, 1%-ный йодез, 3%-ный пероксид водорода, виркон С 1: 100 и другие средства губительно действуют на

сальмонелл при экспозиции не менее 1 ч.

6.2. Эпизоотология

Эпизоотологический показатель	Характеристика
Восприимчивые виды животных	Телята – до 4мес (чаще 10-60-дневного возраста); поросята – после отъема до 4мес (реже в предотъемный период); ягнята – в первые дни и недели после рождения, иногда 2-3 мес; жеребята – в первые 8-10 дней (реже до 3 мес); щенки серебристо-черных лисиц, песцы, нутрии – чаще 1...2мес; цыплята – до 20-дневного возраста. Взрослые животные (самки) лошади, овцы
Источники и резервуары возбудителя инфекции	Больные и переболевшие животные — сальмонеллоносители, включая грызунов и диких птиц
Способ заражения и механизм передачи возбудителя	Основной способ заражения — алиментарный (инфицированное молоко, обрат, вода и др.) и реже —аэро-генно; возможно — внутриутробно. У птиц не исключена трансовариальная передача сальмонелл. Пути выделения возбудителя у взрослых животных — с молоком и калом, аборт тированными плодами, околоплодными водами и истечениями из родовых путей; у молодняка — с фекалиями, мочой, но соевым истечением, слюной
Интенсивность проявления эпизоотического процесса	В виде эпизоотических вспышек и спорадических случаев
Сезонность, стационарность	Заболевание в течение года. У телят чаще в зимне-весенний период, у поросят — после отъема. Стационарность обусловлена животными-бактерионосителями
Предрасполагающие факторы	Скученное содержание, антисанитарные условия, неудовлетворительное кормление, параметры микроклимата, переохлаждение, перегревание
Заболееваемость, летальность	Заболееваемость телят 50...80%, летальный исход до 70% поросят, ягнят и жеребят соответственно 20...40 % до50; 40...45 и 30...45%

6.3. Клинические признаки

Сальмонеллез у молодняка протекает остро, подостро, хронически и атипично (у телят). При внутриутробном заражении народившийся молодняк погибает в первые дни жизни, а иногда и часы.

Продолжительность инкубационного периода: свиньи – от 2 до 15 дней; телята – от 5 до 24 дней (иногда от 4-6 часов); козы и овцы (ягнята) – 2-5 дней; лошади – от 2 до 8 недель; жеребята – 2-5 дней; пушные звери – от 3 до 20 дней.

Вид животных	Течение болезни			
	Острое	Подострое	Хроническое	Атипичное
Телята	Болеют в возрасте до 1,5 мес. Лихорадка, понос, гибель на 5-10 день.	Болеют в возрасте старше 1,5-2 месяцев. Понос перемежающийся.	Болеют в возрасте старше 2-х мес. Перемежающаяся лихорадка, иногда понос, кашель, хрипы, очаги	Болезнь длится 3-5 дней, понос 1-2 дня. Выздоровление.

		Кашель. Болезнь длится 10-20 дней.	притупления в легких.	
Поросята	Длится 2-7 дней. Лихорадка, конъюнктивит, понос, истощение, рвота, посинение кожи в области живота, пахов и ушей. Погибают 70- 80%	Длится 10-20 дней. Лихорадка, понос, кашель, одышка, учащенное дыхание. Погибают 40-50% больных.	Перемежающийся понос, плохой аппетит, жажда. Кашель, лихорадка. Погибают 40-50%. Остальные становятся заморышами.	
Ягнята и козлята	В первые недели жизни, понос со зловонным запахом кала, лихорадка, гибель в первые 4 дня.			
Пушные звери	Отказ от корма, возбуждение сменяется угнетением. Лихорадка. Понос, иногда рвота. Гибель - через 10-15 часов, чаще на 2-3-й день болезни.	Понос - фекалии жидкие с примесью слизи и крови. Истощение, лихорадка. Гибель на 7-14 день, летальность - 40-60%.	Понос, плохой аппетит, прогрессирующее исхудание, анемия. Гибель - через 3-4 недели с крайним истощением.	

У взрослых овец и коз - аборт и септические явления. Аборты - на последнем месяце беременности, за 5-30 дней до массового окота.

У крупного рогатого скота за 12-24 часа до аборта - беспокойство, угнетенное состояние, понижение или отсутствие аппетита, животные чаще лежат, температура тела повышается до 42°C. Аборты - на последнем месяце беременности.

У больных самок отмечают:

- прохолостование и пропустование (до 20%);
- аборты (до 16%);
- рождение мертвых щенков;
- большой отход молодняка в первые 10 дней после щенения (до 20-22%).

6.4. Патологоанатомические изменения

Патологические изменения при сальмо-неллезах имеют определенное диагностическое значение.

У телят при *остром* течении в брюшной полости скапливается экссудат, брюшные лимфатические узлы увеличены. Желчь желто-зеленого цвета, сливкообразной консистенции, нередко кровоизлияния и язвы на слизистой оболочке желчного пузыря. Селезенка увеличена, серого или серо-желтого цвета; почки розового или серо-желтого цвета, местами видны точечные кровоизлияния, капсула легко снимается. При разрезе пораженных долей легких выделяется слизисто-гнойная масса. Бронхиальные и средостенные лимфатические узлы увеличены, с кровоизлияниями. При *подостром* течении печень увеличена, заметны точечные кровоизлияния с наличием сальмонеллезных узлов. Селезенка увеличена. Однако чаще изменения отмечают в легких. При *хроническом* течении легкие сине-красного цвета, возникают очаги некроза различной величины, нередко поверхность легкого срастается с реберной плеврой.

Бронхиальные лимфатические узлы резко увеличены, бугристые, на разрезе розово-красного цвета. Печень увеличена, дряблой консистенции, легко разрывается.

У поросят при *остром* течении болезни выражены кровоизлияния в селезенке, почках, на эпикарде, слизистой оболочке желудка и кишечника, под легочной плеврой. Слизистая оболочка тонкого кишечника отекая, гиперемированная, с очагами поверхностного некроза, в толстом кишечнике усилена складчатость слизистой оболочки. Лимфатические узлы увеличены, есть кровоизлияния. Селезенка темно-красного цвета, с плотной пульпой, размер ее больше нормы. Печень незначительно увеличена, неравномерно окрашена. Почки темного цвета. Легкие иногда отекающие. При *подостром* течении в толстом кишечнике выявляют некроз лимфатических фолликулов и дифтеритическое воспаление слизистой оболочки. Слизистая оболочка желудка частично некротизирована; характерна очаговая фибринозная пневмония. При *хроническом* течении патологоанатомические изменения в толстом кишечнике и легких более выражены.

У овец обнаруживают геморрагическое воспаление слизистой оболочки сычуга и тонкого кишечника у павших ягнят. Незначительно увеличены селезенка и лимфатические узлы. Легкие воспалены, на поверхности точечные кровоизлияния, а иногда фибринозное наложение. У абортированных плодов выражена отекаемость подкожной клетчатки, иногда ее эмфизематозность. На эндокарде, эпикарде и в серозных оболочках кровоизлияния. Печень увеличена, темно-вишневого цвета, дряблая. Почки размягчены, дряблые, иногда кашицеобразной консистенции, капсула с них снимается легко. Селезенка увеличена, пульпа стекает с поверхности разреза. Слизистая оболочка сычуга и кишечника набухшая, покрасневшая, а иногда с кровоизлияниями.

У лошадей — селезенка павших жеребят увеличена в 2...3 раза, острый серозный лимфаденит, перерождение паренхиматозных органов, геморрагический или дифтеритический энтерит, катаральная бронхопневмония. У абортированных плодов желтушность и отекаемость кожи, подкожной клетчатки, слизистых и серозных оболочек. В серозных полостях скопление жидкости. Кровоизлияния в слизистых оболочках и перикарде. Селезенка, печень, почки увеличены, дряблой консистенции.

6.5. Сальмонеллез у человека

Заражаются при употреблении продуктов питания, обсемененных сальмонеллами в процессе их получения, переработки, транспортировки и реализации, прошедших недостаточную кулинарную обработку или хранившихся с нарушением установленных режимов. Возможно заражение через предметы бытовой и производственной обстановки, а также через воду.

Сальмонеллы, кроме того, вызывают у человека брюшной тиф (*Salmonella typhi*) и паратиф (*Salmonella paratyphi* А, В, С), к которым животные не восприимчивы.

С целью профилактики сальмонеллеза у людей во всех случаях вынужденного убоя животных, мясо и органы подвергают обязательному бактериологическому исследованию на сальмонелллез и, в случае подтверждения диагноза, мясо перерабатывают в соответствии с действующими Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветсанэкспертизы мяса и мясных продуктов.

6.6. Лабораторная диагностика

Лабораторная диагностика сальмонеллеза проводится на основании Методических указаний «Лабораторная диагностика сальмонеллезом человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды» разработанных Всесоюзным центром по сальмонеллам Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Минздрава СССР, Центральной ветеринарной лабораторией Главного управления ветеринарии при Государственной комиссии Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам, Всесоюзным государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов и Всесоюзным научно-исследовательским ветеринарным институтом птицеводства.

Исследование на сальмонеллез проводят с целью диагностики заболеваний, выявления сальмонеллоносительства, определения соответствия гигиеническим требованиям безопасности пищевых продуктов, выявления обсемененности объектов внешней среды, а также при расследовании вспышек сальмонеллезозов с целью установления источников и факторов передачи возбудителей инфекции.

6.6.1 Исследование клинического материала

6.6.1.1. Взятие и транспортировка.

6.6.1.1.1. Для исследования на наличие сальмонелл отбирают испражнения, рвотные массы и промывные воды желудка, кровь, мочу, а при наличии специальных показаний - желчь, дуоденальное содержимое, спинномозговую жидкость и секционный материал.

6.6.1.1.2. Патологический материал следует доставлять в лабораторию в возможно короткий срок, но не позднее 12 ч после отбора, испражнения (фекалии) - не позднее 3-4 ч; кровь высевают у постели больного.

В случае невозможности доставки в установленные сроки материал посылают в консерванте или в транспортной среде. Такой материал до исследования хранят при 4-6 °С не более 24 ч.

При отборе проб необходимо исключить возможность контаминации их за счет смежных областей кожи, других органов, внешней среды и т.п.

6.6.1.1.3. Испражнения собирают сразу после дефекации с помощью стерильной стеклянной палочки или деревянного шпателя. При наличии патологических примесей (слизь, кровь, гной и т.п.) их включают в отбираемую пробу. В случае невозможности получения испражнений после дефекации материал берут непосредственно из прямой кишки с помощью "зонд тампона", вводя его в кишку на 8-10 см. Тампон помещают в пробирку с консервантом.

6.6.1.1.4. При профилактических обследованиях здоровых лиц на сальмонеллоносительство накануне взятия испражнений для исследования можно применить солевое слабительное (25-30 г магнезии сульфата – $MgSO_4$), растворенное в теплой воде. Не принимается для исследования на сальмонеллоносительство материал, взятый на дому в отсутствие медицинского работника.

6.6.1.1.5. Кровь для исследования берут в начале заболевания, а также повторно в период лихорадки или в разгар рецидивов стерильным шприцем из локтевой вены в объеме 2-10 мл (в зависимости от возраста пациента); в более поздние сроки или при слабовыраженной клинической картине - 15-20 мл. Взятую кровь высевают у постели больного.

У детей до одного года кровь берут в доступных количествах из пальца, пятки или мочки уха.

6.6.1.1.6. Рвотные массы и промывные воды желудка отбирают при заболевании, сопровождающемся соответствующей симптоматикой, в объеме до 100 мл. Для исследования используют первые порции промывных вод, полученные без применения бактерицидных средств.

В случае кислой реакции ($pH < 4,5$) рвотных масс их перед посевом нейтрализуют 10%-ным раствором бикарбоната натрия, промывные воды центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин и в дальнейшем используют осадок. В случае невозможности центрифугирования допускается высеив нативного материала.

6.6.1.1.7. Желчь (дуоденальное содержимое) собирают в стерильные пробирки. При этом отдельно собирают дуоденальное содержимое, пузырную желчь и желчь из желчных протоков (порции А, В и С соответственно).

Кислая реакция, белесоватый оттенок, наличие хлопьев свидетельствуют о примеси желудочного сока и делают материал непригодным для бактериологического исследования.

6.6.1.1.8. Мочу для исследования собирают после тщательного туалета. Первую

порцию мочи не берут для анализа, остальную в количестве 20-30 мл собирают в стерильную посуду и доставляют в лабораторию. Мочу центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. Для исследования используют осадок. Допускается высеивать нативного материала.

6.6.1.1.9. Спинномозговая жидкость подлежит исследованию при наличии менингеального или менингоэнцефалитического синдромов.

Пробу (3-5 мл) помещают в стерильную пробирку и доставляют в лабораторию, предохраняя материал от замораживания (можно использовать термос).

6.6.1.1.10. Операционный и секционный материал для исследования отбирают в случае необходимости при оперативных вмешательствах или на месте вскрытия. Масса пробы должна быть не менее 20 г.

В сопроводительном документе необходимо указать, какое учреждение направляет материал, фамилию, имя, отчество и возраст обследуемого, место работы (для детей - название детского учреждения или школы), дату заболевания, предполагаемый диагноз или показания к обследованию, дату и час взятия пробы материала, фамилию и должность лица, посылающего материал.

6.6.1.2. Подготовка к исследованию клинического материала.

6.6.1.2.1. Доставленные в лабораторию образцы клинического материала подготавливают к посеву в среды обогащения и на дифференциально-диагностические среды.

6.6.1.2.2. Операционный и секционный материал массой не менее 20 г растирают в ступках;

6.6.1.2.3. Рвотные массы, промывные воды желудка и мочу центрифугируют. При кислой реакции ($pH < 4,5$) рвотные массы перед центрифугированием нейтрализуют 10% раствором пищевой соды ($pH 7,0-7,4$).

6.6.1.3. Методы выделения.

Эффективность проводимого исследования, направленного на выделение сальмонелл из разных материалов, в первую очередь зависит от применения соответствующих сред обогащения и адекватных дифференциально-диагностических сред.

В настоящее время освоен коммерческий выпуск большинства питательных сред рядом производителей, имеющих регистрационные удостоверения и сертификаты производства. В тех случаях, когда рекомендуемые среды отсутствуют, их готовят в лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ Р 52814-2007 или МУ по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями, 1984 г. Контроль питательных сред осуществляют в соответствии с МУК 4.2.2316-08.

Рекомендуемые среды обогащения делятся на неселективные первичные (забуференная пептонная вода) и среды селективного обогащения (магниевая, селенитовая, Мюллер-Кауфмана, Раппапорт-Вассилиадис, селенит-цистиновая).

Дифференциально-диагностические среды в свою очередь делятся на слабо селективные и высоко селективные. К первым относятся Эндо агар, Мак-Конки агар, бриллиант-грюн агар. Ко вторым - Плоскирева агар, SS-агар, ксилозо-лизин деоксихолат агар, висмут-сульфит агар.

Характер роста сальмонелл на указанных средах приведен в таблице 9.

6.6.1.3.1. После подготовки материала от больных к исследованию производят его посев на среду обогащения.

При этом можно использовать как среды отечественного производства, так и импортные, разрешенные к реализации в России. При необходимости допускается приготовление некоторых сред в лабораторных условиях (магниевая среда, селенитовая среда, Мюллер-Кауфман среда, среда Раппапорт-Вассилиадис).

Непосредственный высеивание материала из среды обогащения до ее инкубирования в термостате может заменить прямой высеивание на дифференциально-диагностические среды.

Таблица 9.

Характер роста сальмонелл на различных дифференциально-диагностических средах

Название среды	Вид колоний сальмонелл
1. Бриллиант-грюн агар	Розовые
2. Мак-Конки агар	Бесцветные
3. Ксилозо-лизин-деоксихолат агар	Черные с бесцветным ободком за исключением <i>S.Typhi</i> , которые растут в виде светлых колоний
4. Сальмонелла шигелла агар (SS)	С черным центром
5. Висмут сульфит агар	Черные, среда под колонией прокрашивается. Некоторые серовары сальмонелл (<i>S.Para A</i> , <i>S.Gallinarum</i> могут быть слегка зеленоватыми)
6. Агар Эндо	Бесцветные, слегка розовые
7. Агар Плоскирева	Бесцветные, слегка розовые, иногда с черным центром

6.6.1.3.2. Испражнения, доставленные в фосфатно-буферном растворе, высевают в среду обогащения двойной концентрации в соотношении 1:1. Фекалии, доставленные в глицериновом консерванте или транспортной среде, помещают в обычную среду обогащения в соотношении 1:10. Испражнения, доставленные без консерванта, суспендируют в среде обогащения в соотношении 1:5. Из указанных суспензий делают высев на дифференциально-диагностические среды, оставшуюся часть инкубируют в термостате.

6.6.1.3.3. Кровь, взятую из вены, высевают в двойную среду. В случае крайней необходимости в 10-20%-ный желчный бульон. После 16-20 ч инкубирования делают высев на одну из дифференциально-диагностических сред. При отрицательном результате делают повторные посевы на 3-и, 5-е, 8-е сутки.

6.6.1.3.4. Рвотные массы, промывные воды желудка и мочу после центрифугирования высевают в среды обогащения. В случае исследования материала без центрифугирования посев проводят в среду обогащения двойной концентрации в соотношении 1:1 и после 18-24 ч инкубирования делают высев на дифференциально-диагностические среды.

6.6.1.3.5. Каждую фракцию желчи (дуоденального содержимого) высевают во флаконы со слабощелочным питательным бульоном в соотношении 1:10 и на дифференциально-диагностические среды. Через 18-24 ч из флаконов осуществляют повторный высев на дифференциально-диагностические среды. В случае получения отрицательных результатов высев повторяют на 3-и, 5, 7-е сутки, используя среды слабой селективности.

6.6.1.3.6. Спинномозговую жидкость высевают на шоколадный агар.

6.6.1.3.7. Операционный и секционный материал высевают в одну из сред обогащения в отношении 1:10. Допускается одновременный высев суспензии материала в среду обогащения и на дифференциально-диагностические среды.

6.6.1.3.8. При наличии другого клинического материала его высевают на две-три дифференциально-диагностические среды (комбинируя высоко- и низко селективные среды и в емкости со средой обогащения одновременно).

При посеве на плотные среды исследуемый материал наносят с помощью бактериологической петли (материал от больных), пипетки, стеклянной палочки или тампона (пробы продуктов и смывы) с последующим втиранием материала шпателем по всей поверхности среды. На высоко селективные среды посевной материал вносят в

большом объеме (в 3-5 раз), чем на слабо селективные.

Пластинчатые среды подсушивают, на их поверхности не должна оставаться конденсационная жидкость, что обеспечивает рост изолированных колоний.

6.6.1.3.9. После инкубирования посевов на средах обогащения делается повторный высев на дифференциально-диагностические среды с последующим отбором подозрительных колоний.

Необходимо учитывать, что при исследовании различных материалов на инфицированность сальмонеллами отличаются только начальные этапы анализа (правила взятия материала, его обработка, выбор адекватных питательных сред). Начиная с отбора колоний на дифференциально-диагностических средах, последующие этапы бактериологического исследования идентичны.

6.6.2. Исследование пищевых продуктов

6.6.2.1. Взятие проб и их транспортировка

6.6.2.1.1. Объектами исследования могут являться продукты, указанные в СанПиН 2.3.2.1078-01, а также остатки пищи, употребленной заболевшими, а также исходные продукты и полуфабрикаты, которые использовали при ее приготовлении, суточные пробы готовой пищи и др. подозреваемые в качестве фактора передачи возбудителя инфекции.

6.6.2.1.2. Пробы для исследования отбирают по ГОСТ 26668-85 "Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологического анализа, по ГОСТ 9792-73, "Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб", а также "Мясо птицы" (ГОСТ 7702.20-95). "Субпродукты и полуфабрикаты птицы. Методы отбора проб".

6.6.2.1.3. Остатки консервов направляют в лабораторию непосредственно в той банке, из которой их использовали в пищу. При отсутствии остатков консервов исследованию подлежит содержимое 2-5 нескрытых банок с аналогичной маркировкой.

6.6.2.1.4. Мелкую рыбу отбирают в количестве 2-3 шт., у крупной вырезают 3-4 куска из спинки, ближе к голове, и из участков около анального отверстия общей массой не менее 200 г.

6.6.2.1.5. Солонину и соленые продукты, находящиеся в бочечной таре, берут сверху, из середины и со дна бочки. Общая масса пробы должна быть не менее 200 г. В отдельную посуду набирают 100-200 мл рассола.

6.6.2.1.6. Пробы жидких и полужидких продуктов и кормов (супы, соусы, заменитель цельного молока - ЗЦМ) отбирают после тщательного перемешивания в количестве около 200 г.

6.6.2.1.7. Молочные продукты заводского приготовления доставляют в лабораторию в оригинальной упаковке, прочие - в объеме до 200 мл.

6.6.2.1.8. Суточные пробы направляют для исследования непосредственно в той посуде, в которой они хранились в холодильнике. Остатки фактически употребленной пищи отбирают в той посуде, в которой их обнаружили.

6.6.2.1.9. Яйца отбирают по 5 шт. из шести разных мест обследуемой партии; в первую очередь берут яйца, хранившиеся более 7 дней.

6.6.2.1.10. Материал, подлежащий исследованию, помещают в стерильную посуду (банки, пробирки, флаконы), новые полиэтиленовые пакеты, стерильную пергаментную бумагу, тщательно укупоривают и упаковывают.

Пробы можно брать в стерильные одноразовые емкости, стаканы или банки, прокипяченные 15 мин. Обработка посуды дезинфицирующими средствами не допускается.

Каждую пробу снабжают этикеткой с наименованием материала и источника его получения.

При направлении проб продуктов дополнительно указывают, какой из продуктов

подозревается в качестве фактора риска.

6.6.2.2. Подготовка к исследованию

6.6.2.2.1. При исследовании пищевых продуктов делают навеску. Величина навески определяется видом продукта, масса которого должна соответствовать величине норматива на отсутствие в нем бактерий рода сальмонелла. Чаще всего масса навески составляет 25 г.

6.6.2.2.2. Продукты плотной консистенции гомогенизируют или растирают в ступках.

6.2.2.2.3. Пищевые продукты, бактериологическое исследование которых проводят в соответствии с требованиями МУК 4.2.577-96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов» и ГОСТ 30705-2000 «Продукты молочные для детского питания. Методы микробиологического анализа», берут для исследования в количестве, предусмотренном в указанных документах.

6.2.2.2.4. Крем, сливочное масло, мороженое и т.п. перед посевом расплавляют в водяной бане.

6.2.2.2.5. Жидкие продукты, имеющие кислую реакцию (рН меньше 4,5), перед посевом нейтрализуют 10%-ным стерильным раствором бикарбоната натрия до слабощелочной реакции (рН 7,0-7,4).

6.2.2.2.6. При исследовании яиц скорлупу обрабатывают спиртом и обжигают, после чего яйца разбивают и отделяют желток и белок в стерильную посуду, объединяя отдельно по пять желтков и белков в одной пробе. Желтки и белки гомогенизируют и используют для посева.

6.2.2.3. Методы выделения

6.2.2.3.1. Подготовленные пробы продуктов питания высевают в неселективную среду обогащения в соотношении 1:10.

Одновременно делают посев материала из указанной среды до ее инкубирования на дифференциально-диагностические среды.

Предпочтительно использовать одну чашку с низко селективной средой и одну с высоко селективной. Инкубируют посеvy при 37 °С в течение 18-24 часов (чашки с висмут-сульфит агаром - 48 часов).

После инкубирования посевов на неселективной среде обогащения проводится посев материала в две среды селективного обогащения. При этом должно соблюдаться следующее соотношение посевной дозы и объема среды обогащения. Для всех указанных сред обогащения оно составляет 1 мл надосадочной жидкости на 10 мл среды и инкубировании 18-20 час при 37 °С. Для среды Мюллер-Кауфмана 1 мл надосадочной жидкости на 10 мл среды инкубирование 18-20 час при 41,5-42 °С.

При использовании среды Раппапорт-Василиадис вносить 0,1 мл из неселективной среды обогащения (забуференной пептонной воды) в 10 мл указанной среды и инкубировать при 42 °С в течение 18-24 час.

Материал, прошедший инкубацию на средах селективного обогащения, высевается на чашки Петри с двумя-тремя дифференциально-диагностическими средами.

6.6.3 Исследование объектов окружающей среды

Основными объектами окружающей среды, подлежащими исследованию на наличие сальмонелл, являются смывы с различных предметов на эпидемиологически значимых объектах и в лечебно-профилактических учреждениях, а также вода (питьевая, открытых водоисточников, сточная), воздух и почва.

6.6.3.1. Взятие проб и их транспортировка

6.6.3.1.1. Отбор проб смывов осуществляют стерильными ватными или ватно-марлевыми тампонами. Тампоны монтируют на деревянной палочке или проволоке, пропущенной через пробку, помещают в пробирку и стерилизуют 30 мин при температуре 120 °С. Затем в каждую пробирку наливают 2 мл предварительной среды обогащения -

забуференной пептонной воды рН 7,0. Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняют, наклоня пробирку, излишек влаги отжимают о стенку пробирки.

Смывы берут с площади не менее 100 см², если нет специальных указаний для данного объекта.

При взятии смывов с яичной скорлупы один тампон используют для исследования 10 яиц.

6.6.3.1.2. Для отбора проб воды используют стерильные флаконы вместимостью 0,5 л с притертой, каучуковой или корковой пробкой.

Пробы воды (питьевой) отбирают при соблюдении правил стерильности, после предварительной стерилизации кранов обжиганием пламенем горящего тампона, смоченного спиртом, и последующего спуска воды в течение 10-15 мин при полностью открытом кране. Пробы должны быть исследованы не позже чем через 2 ч после их отбора.

При невозможности выполнения этих условий анализ допускается проводить не позже чем через 6 ч после отбора проб, сохраняя их при температуре 4±2 °С.

Пробы воды открытых водоемов или сточных вод отбирают в соответствии с МУК 4.2.1884-04.

6.6.3.1.3. Анализ почвы на наличие сальмонелл проводят по эпидпоказаниям. Навеску в 50 г помещают в среду неселективного обогащения в соотношении 1:10 и дальнейшее исследование выполняют аналогично пищевым продуктам.

6.6.3.1.4. Отбор проб воздуха

Определение наличия сальмонелл в воздухе проводится по эпидпоказаниям.

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью аппаратов и устройств, разрешенных к применению в установленном порядке.

Количество пропущенного воздуха должно составлять 250 дм³ на одну чашку с дифференциально-диагностической средой. В качестве таких сред используют 2 чашки с агаром эндо и две чашки с висмут-сульфит агаром.

Таким образом, объем пропущенного через аппарат воздуха составляет 1000 дм³.

6.6.3.2. Подготовка к исследованию

6.6.3.2.1. Подготовка к исследованию воды необходима при использовании метода мембранной фильтрации при определении наличия в ней сальмонелл. Для этого берутся 2 объема воды по 500 мл каждый. Каждый объем фильтруют через один или несколько мембранных фильтров.

6.6.3.3. Методы выделения

6.6.3.3.1. При исследовании смывов после высева на среду Кесслера смывную жидкость заливают 5 мл одной из рекомендуемых для выделения сальмонелл сред обогащения (магниевая, селенитовая или среда Раппапорт-Василиадис) и помещают в термостат при 37 °С на 18-20 ч. После инкубации делают высев на среду Эндо и висмут-сульфит агар с последующим отбором подозрительных колоний и их идентификацией.

6.6.3.3.2. При исследовании воды питьевой, поверхностных водных объектов и сточных вод берутся 2 пробы по 500 мл каждая и вносятся в равный объем селективной среды обогащения двойной концентрации. При использовании мембранной фильтрации для исследования полученные фильтры помещают в 50 мл в каждой из двух сред накопления, например магниевую и селенитовую, или среду Раппапорт-Василиадис и селенитовую.

Посевы инкубируют при 37 °С 18-20 ч. Затем делают высев на дифференциально-диагностические среды. Дальнейший анализ ведут так же, как и при выделении сальмонелл из других объектов исследования.

6.6.3.3.3. При исследовании воздуха

Чаши с агаром эндо помещают в термостат при 37 °С на 18-20 ч, а чашки с висмут-

сульфит агаром инкубируют при той же температуре 48 час.

Колонии подозрительные на сальмонеллы идентифицируют по той же схеме, что и изолированные из других объектов.

6.6.4 Идентификация сальмонелл

После 18-20 часового инкубирования чашек с дифференциально-диагностическими средами (висмут-сульфит агар 48 час) производится учет характера роста с отбором 3-5 подозрительных колоний на одну из сред для первичной идентификации (Клиглера, Ресселя, Олькеницкого) и на скошенный питательный агар. В случае чрезвычайной эпидемической ситуации культуру, выросшую на указанных средах, используют для последующей постановки реакции агглютинации. Результаты этой реакции ориентировочны и требуют подтверждения на этапе завершения биохимической идентификации.

6.6.4.1. Определение ферментативных свойств выделенных микроорганизмов.

Если культуры не ферментируют лактозу, не расщепляют мочевины, но ферментируют глюкозу и образуют сероводород, то они подозрительны на принадлежность к роду сальмонелла и подвергаются дальнейшему изучению.

О ферментации лактозы (и сахарозы) в среде Олькеницкого и ферментации лактозы в среде Клиглера и Ресселя судят по появлению желтой окраски в скошенной части агара, а о ферментации глюкозы - по такому же окрашиванию в столбике. Газообразование устанавливают по наличию пузырьков газа и разрыву агара, а образование сероводорода - по почернению среды. В среде Олькеницкого при росте культуры, гидролизующей мочевины, среда приобретает диффузный яркий красно-малиновый цвет.

В случае если в результате прямого посева испражнений не выросло ни одной колонии или выросли единичные колонии, необходимо произвести повторный высев, увеличив порцию засеваемого материала. При повторном отсутствии роста следует получить материал для исследования еще раз.

У подозрительных культур изучают их ферментативные характеристики, позволяющие определить родовую принадлежность выделенных бактерий. Для этих целей используют тесты, позволяющие определить способность к образованию индола, наличие роста на средах с цитратами, разложение салицила и малоната натрия, наличие лизиндекарбоксилазы, фенилаланиндезаминазы, способность к разложению мочевины, образованию ацетил-метил-карбинола в реакции Фогес-Проскауэра. Ставится также проба с метиловым красным и определяется подвижность.

Сальмонеллы индола не образуют, способны расти на средах с цитратами, декарбоксилировать лизин (за исключением некоторых штаммов *S.Typhimurium*, *S.Enteritidis*), не имеют фенилаланиндезаминазы, не разлагают мочевины, отрицательны в реакции Фогес-Проскауэра, положительны в пробе с метил-рот, подвижны (за исключением *S.Gallinarum*). Подавляющее большинство сальмонелл не ферментируют салицин.

Для определения родовой принадлежности культур можно использовать системы для идентификации энтеробактерий, в т.ч. пластины биохимические, дифференцирующие энтеробактерий (ПБДЭ), Api20E, Бак трак, Vidas, mini-Vidas и другие приборы, прошедшие соответствующие испытания и рекомендованные к применению в лабораториях системы Роспотребнадзора РФ.

При необходимости получения срочного, предварительного ответа, определяется антигенная структура выделенных возбудителей в реакции агглютинации на стекле с О и Н-агглютинирующими диагностическими сальмонеллезными сыворотками.

Серотипирование штаммов сальмонелл включает в себя выявление соматического антигена (О-антигены сальмонелл), являющегося липополисахаридом (ЛПС), и жгутиковых антигенов (Н-антигены), представленных термолабильными белками.

Большинство сероваров сальмонелл имеют Н-антигены двух фаз. Такие сальмонеллы называются двуфазными (например - *S. Typhimurium*. Антигенная формула - O: 1, 4, 5, 12; H:i; 1.2). Известны монофазные (например - *S. Enteritidis*, антигенная формула - O:1, 9, 12; H:gm). Неподвижные (бесфазные) - *S. Gallinarum*.

Определение сероваров основано на антигенной комбинации отдельных О- и Н-антигенов.

6.6.4.2. Определение О-антигенов, выделенных микроорганизмов

Определение О-антигена проводится в реакции агглютинации на стекле. В сыворотке находятся антитела к О-антигенам сальмонелл, которые образуют агглютинат с бактериями, обладающими соответствующими антигенами.

Растворять сухие сальмонеллезные О-сыворотки следует в 1,0 мл изотонического раствора хлорида натрия (или 2,0 мл), согласно прилагаемой инструкции.

На предметное стекло наносится одна капля сыворотки и одна капля изотонического раствора хлорида натрия. С питательного агара берется полная петля культуры, выращенной в течение 18-24 часов при 37 °С. Культура наносится на предметное стекло вблизи капли изотонического раствора хлорида натрия и эмульгируется (контроль на отсутствие спонтанной агглютинации). При отсутствии спонтанной агглютинации манипуляцию повторяют в капле О сыворотки, формируя равномерную непрозрачную суспензию. Учет результатов проводят в течение 1-2 минут, мягко покачивая стекло. Гомогенная суспензия свидетельствует об отрицательном результате. Образование хлопьев агглютината внутри капли расценивается как положительный результат.

Агглютинация проявляется через несколько секунд (или 1 минуты) в виде хлопьев (зерен) агглютината формирующихся внутри капли на фоне ее просветления. Штаммы, находящиеся в R-форме, обладают самопроизвольной агглютинацией. Их дальнейшее серотипирование не представляется возможным без дополнительных манипуляций. Такие штаммы пересевают на слабощелочной агар для того, чтобы выбрать колонию с ровными краями и вернуть штамм в S (гладкую) форму и повторить агглютинацию. Если агглютинация с поливалентными О-антисыворотками не происходит, маловероятно, что штамм относится к роду *Salmonella*.

6.6.4.3. Определение Н-антигена выделенных микроорганизмов

Для определения Н-антигенов используют ту же культуру, выросшую на питательном агаре. Если культура малоподвижна, можно применять полужидкий (0,7%) агар, условно называемый агаром для роения, формируя посев в виде небольшого пятна в центре чашки Петри. Посев инкубируют в течение ночи при 37 °С. Сухие сальмонеллезные Н-сыворотки растворяются также как и О-сыворотки, согласно прилагаемой инструкции. На предметное стекло наносят одну каплю Н-сыворотки и одну каплю изотонического раствора хлорида натрия. С периферии указанного агара для роения или из конденсата на косяке берут полную петлю культуры. Наносят ее на предметное стекло вблизи капли изотонического раствора хлорида натрия и эмульгируют (контроль на отсутствие спонтанной агглютинации). При отсутствии спонтанной агглютинации манипуляцию повторить в капле Н-сыворотки, формируя равномерную непрозрачную суспензию. Учет результатов проводят в течение 1-2 минут, мягко покачивая стекло. Гомогенная суспензия свидетельствует об отрицательном результате. Образование хлопьев (зерен) агглютината внутри капли расценивается как положительный результат.

Результаты определения О- и Н-антигенов сальмонелл фиксируются в протоколе. В случае отсутствия реакции агглютинации с сыворотками одной из Н-фаз проводят инверсию (подавление) обнаруженной Н-фазы (метод Свена-Гарда).

Для определения невыявленного Н-антигена готовят чашки Петри с полужидким (0,7%) агаром. После застывания агара в центр чашки добавляют 0,1 мл антисыворотки

против выявленного Н-антигена первой или второй фазы. Дают сыворотке впитаться в агар, а затем в центр капли петлей наносят культуру.

Вместо чашки можно также использовать U-образную трубку. Инкубировать посев при 37 °С 18-24 часа (чашки не переворачивать!). Соответствующая антисыворотка связывает выявленный Н-антиген, подвижность (роение) штамма будет происходить за счет клеток, содержащих Н-антиген не обнаруживаемой фазы. Неизвестная фаза Н-антигена определяется тем же способом, что и выявленная. При этом культура берется с периферии выросшей макроколонии или с противоположного относительно посева колена U-образной трубки. Затем после суммирования результатов О и Н-серотипирования определяется серовар штамма, согласно схемы Кауфмана-Уайта.

Серологическую идентификацию сальмонелл начинают с испытания их в реакции агглютинации на стекле с агглютинирующей адсорбированной поливалентной сывороткой к сальмонеллам групп А, В, С, Д, Е, а в случае получения отрицательного результата с агглютинирующей адсорбированной поливалентной сывороткой к сальмонеллам редких групп.

При получении положительных результатов агглютинации со смесью О-сывороток, культуру испытывают с каждой О-сывороткой, входящей в смесь. После установления принадлежности культуры к одной из О-групп, выявляют наличие дополнительных О-антигенов, присущих представителям указанной группы.

После этого проводят реакцию агглютинации с Н-сыворотками. При этом вначале используют Н-сыворотки, соответствующие Н-антигенам 1 фазы, а потом Н-антигенам 2 фазы. Начинать следует с Н-сывороток, соответствующих более распространенным сероварам данной группы.

Для реакции агглютинации с О-сывороткой следует брать культуру с верхней части скошенного агара, для Н-сывороток - конденсат или с нижнего участка роста (наиболее подвижные особи).

Для подтверждения принадлежности культуры к роду *Salmonella*, в случае затруднений с идентификацией, можно пользоваться пробой с бактериофагом, используя лечебный бактериофаг сальмонеллезный.

Для этого две капли четырех- или восемнадцатичасовой бульонной культуры испытуемого штамма наносят тонко оттянутой пастеровской пипеткой или петлей на хорошо подсушенный слабощелочной агар в чашке Петри. После подсыхания на одну из капель петлей или пастеровской пипеткой меньшего диаметра, наносят каплю бактериофага, а на другую, в качестве контроля - каплю бульона.

На одной чашке, таким образом, можно испытать одновременно 5-6 культур.

Чашки с нанесенными культурами и бактериофагом помещают в термостат на 18-24 часа, после чего учитывают результаты по появившейся на месте нанесения фага четко очерченной зоне сливного лизиса или большего или меньшего числа негативных колоний.

При отсутствии лизиса в местах нанесения фага будет сплошной рост культуры, как в контроле.

Атипичные сальмонеллезные культуры в большинстве случаев чувствительны к фагу, в то время как штаммы представителей других родов семейства *Enterobacteriaceae*, как правило, не лизируются этим фагом.

6.6.4.4. Определение биоваров сальмонелл

В пределах некоторых сероваров сальмонелл наблюдается различная ферментативная активность в отношении отдельных углеводов, органических кислот или многоатомных спиртов. Это позволяет проводить биохимическое типирование штаммов сальмонелл, относящихся к таким сероварам.

Типирование можно осуществлять по любой комбинации тестов, по отношению к которым выявлены переменные свойства у штаммов одного серовара.

Наибольшее число биоваров сальмонелл выявлено среди штаммов *S. typhimurium* (табл.10).

Таблица 10.

Биовары *S. Typhimurium*

Биовар	Арабиноза	Ксилоза	Рамноза	d-тарtrat	i-тарtrat	Мукаг	Инозит
1-й	+	-	-	-	-	-	-
2-й	+	+	-	-	-	-	-
3-й	+	+	+	-	-	-	-
4-й	+	+	+	+	-	-	-
5-й	+	+	+	+	+	-	-
6-й	+	+	+	+	+	+	-
7-й	+	+	+	+	+	+	+
8-й	+	-	+	+	+	+	+
9-й	+	+	-	+	+	+	+
10-й	+	+	-	+	+	-	+
11-й	-	+	+	-	-	+	+
12-й	+	+	-	+	+	+	-
13-й	-	-	-	+	+	+	+
14-й	-	-	+	+	+	+	+
15-й	+	-	+	+	+	+	-
16-й	+	-	+	-	-	+	+
17-й	+	+	+	-	-	+	-
18-й	+	+	+	-	-	+	+
19-й	+	+	+	-	-	-	+
20-й	+	+	+	-	+	-	-
21-й	+	+	+	+	-	+	+
22-й	+	+	+	-	+	+	-
23-й	+	+	+	-	+	+	+
24-й	+	+	+	+	-	+	-
25-й	+	+	+	+	+	-	+

В настоящее время типирование среди *S. enteritidis* проводят по способности к ферментации бульона Штерна и наличию лизиндекарбоксилазы. *S. enteritidis* var. *ratin* характеризуется отсутствием указанных ферментов, а *S. enteritidis* var. *jena* - их наличием.

По способности ферментировать d-тарtrat различают *S. java* (d-тарtrat положительна) и *S. paratyphi B* (d-тарtrat отрицательна).

Необходимо учитывать, что в последнем издании съемы Кауфмана-Уайта (2001 г.) выделяемые ранее как серовары сальмонелл, имеющие одну и ту же антигенную структуру и отличающиеся только по некоторым биохимическим характеристикам, объединены в один серовар (*S. isangi* объединена с *S. mission*, *S. gallinarum* с *S. pullorum*, *S. paratyphi B* с *S. java*). Кроме этого, O-группа E₁ объединена с O-группой E₂ и E₃.

7. ЭМФИЗЕМАТОЗНЫЙ КАРБУНУЛ (ЭМКР)

(лат. – *Gangraena emphysematosa*; англ. – *Blackleg, Blackquarter, Quarter ill, Symtomatic untrax, Carbon symptomatic*; фр. – *Blackleg*)
(синонимы болезни – шумящий, симптоматический карбункул)

Клостридиозы - острые инфекционные заболевания человека и животных, вызываемые патогенными штаммами анаэробов семейства *Clostridiaceae* (род *Clostridium*). Клостридиозы объединяют большую группу сапронозных инфекций.

Инфекции клостридиальной этиологии в соответствии с механизмами передачи возбудителей и путями заражения макроорганизма могут быть как энтеральными (кормовыми), так и травматическими. Это остропротекающие токсикоинфекции, обычно заканчивающиеся летальным исходом. Все клостридии анаэробы, в основном пребывающие в почве, водоемах, навозе, иле, нередко и в сене. Их споры могут находиться в кишечнике клинически здоровых животных.

Среди клостридиозов следует отметить эмфизематозный карбункул крупного рогатого скота, являющийся энтеральной и травматической инфекцией, которая встречается во всех странах мира, в т.ч. России. Споры проникают в организм животных при приеме инфицированных кормов и воды через незначительные повреждения слизистой оболочки.

Эмфизематозный карбункул – острая инфекционная слабоконтагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся появлением крепитирующих припухлостей мускулатуры, повышенной температурой тела, хромотой и быстрой гибелью животных.

Болезнь чаще появляется в пастбищный период, энзоотически.

Эмфизематозный карбункул известен скотоводам с давних времен. Эмкар длительное время не отличали от сибирской язвы, т.к. эта болезнь имеет сходство с сибирской язвой по клиническим признакам - припухлости, и часто появлялась в тех же местностях.

Впервые в 1870 году Ф. Шабер (Ph. Chabert) дал описание эмкара позволившее дифференцировать его от сибирской язвы. Французские исследователи О. Боллингер (O. Bollinger), Ш. Корневен (Ch. Cornevin) и американский ученый И. Фезер (I. Feser) в 1875 году, а также С. Арлуэн (S. Arloing) и Ж. Тома (J. Tomas) в 1887 году во Франции дали точное определение болезни и описали возбудителя, и в честь своего учителя профессора Лионской ветеринарной школы Chauveau назвали его *B. Chauvoie*. В 1925 году французские исследователи Э. Лекленш (E. Leclainche) и А. Валле (A. Vallee) получили формолвакцину против эмкара.

В нашей стране первое упоминание о наличии эмфизематозного карбункула было в отчетности за 1889 год. До этого времени болезнь диагностировали как сибирскую язву. Хотя в Киргизии чабаны отличали эту болезнь от сибирской язвы и называли ее кара-зан (*черная кожа*). В дореволюционной России Эмкар, как стационарную болезнь, наблюдали в разных зонах страны. В СССР после Октябрьской революции были разработаны мероприятия по профилактике и ликвидации этой болезни.

В настоящее время зона распространения болезни значительно сократилась и она регистрируется в виде спорадических случаев.

7.1. Этиология

Возбудитель – *Clostridium chauvoei*, представляет собой прямые или слегка изогнутые, с закругленными концами палочки, *длина их 2-8 микрон, толщина 0,5-1 микрон*, располагаются одиночно, парами или по 3-4. По Граму в молодых культурах красится положительно. В старых культурах – грамотрицательно. *Cl. chauvoei* – строгий анаэроб, хорошо растет на средах с добавлением крови, кусочков печени, мозга (среда Китт-Тароцци, Хоттингера и др.); рост микробов наблюдают через 16-20 ч.

В организме животных и на жидких питательных средах образует гемолизин и агг्रेसины. Гемолизин лизирует эритроциты барана и крупного рогатого скота и не лизирует эритроциты лошади и кролика. Агг्रेसины парализуют защитные силы (фагоцитоз) организма.

Возбудитель образует споры, которые располагаются в центре или на конце палочки. Наличие спор обуславливает появление различных форм - в виде веретена, лимона, груши и т.д., иногда споры образуются на двух концах палочки. Спорообразование наблюдается как в организме, так и на питательных средах. Споры быстрее образуются в мышцах, чем органах, при температуре ниже 14°C спорообразование прекращается. Споры возбудителя очень устойчивы. Они несколько лет

сохраняют жизнеспособность в почве, а в гниющих мышцах, навозе – до 6 мес. Прямые солнечные лучи убивают их за 24 ч, кипячение – за 2 ч, автоклавирование – 30-40 мин. Лучшим дезинфицирующим средством является 4 %-ный р-р формальдегида.

В жидких питательных средах вегетативные формы возбудителя быстро теряют вирулентность. Для усиления и поддержания вирулентности проводят пассаж культур через организм восприимчивых животных (телят или морских свинок).

7.2. Эпизоотология

К болезни наиболее восприимчив молодняк крупного рогатого скота в возрасте до 4 лет; до 3 месячного возраста телята устойчивы за счет пассивного иммунитета, приобретаемого с молоком матери. Принято считать, что животные старше 4 лет резистентны благодаря ранее приобретенному иммунитету (*явление иммунизирующей субинфекции*), но устойчивость эта не абсолютна. Описаны случаи заболевания телят 3-х дневного возраста и взрослого скота 10 лет и старше.

Установлено, что породистый скот, особенно мясных пород, более восприимчив, чем степной и рабочий скот. Повышенной чувствительностью к заражению обладают упитанные животные. Реже болеют овцы, козы, лоси и олени. Абсолютной устойчивостью к возбудителю эмкара обладают лошади, ослы, свиньи, собаки, кошки, куры и т.д. К экспериментальному заражению особенно чувствительны морские свинки. Кролики резистентны, что можно использовать для дифференциации *Cl. chauvoei* от *Cl. Septicum*.

Источником возбудителя эмкара являются больные животные, от которых возбудитель выделяется во внешнюю среду с содержимым припухлостей, с кровью в последней стадии болезни, либо в труп (кровососущие насекомые, операции).

В период стойлового содержания заражение животных возможно через корм убраный с лугов, почва которых загрязнена спорами возбудителя эмфизематозного карбункула или при водопое из инфицированного источника. Распространение болезни связано с определенной местностью, где почва обсеменена возбудителем, и споры с травой и водой попадают в организм животных.

Споры долго сохраняются в заболоченных почвах. Поэтому весьма опасно несвоевременно сжигать трупы, учитывая, что в трупе и вне его образуются споры и место где лежал труп бывает инфицировано спорами. Споры эмфизематозного карбункула вымываются, разносятся водой во время весенних паводков и ливней, приводя к новым вспышкам болезни. Болезни свойственна стационарность, она возникает в одних и тех же хозяйствах. В засушливые годы при выпасе животных на скошенных площадях, возникновение болезни связывают с наличием травм слизистой оболочки ротовой полости, чем создается еще большая возможность к заражению.

Кровососущие насекомые, питаясь кровью больных животных, могут явиться переносчиками возбудителя инфекции. То же самое можно сказать о переносе возбудителя кровососами, которые садятся на трупы животных.

За несколько часов до смерти животного возбудитель находится в коже, подкожной клетчатке, периферических кровеносных сосудах, и кровососущие насекомые, питаясь кровью, могут переносить возбудителя.

Серьезную опасность представляют и другие насекомые: мухи, слепни механически переносят на лапках, теле, крыльях.

Овцы чаще заболевают во время ягнения, стрижки, кастрации и зачастую появление этой болезни связано с ранениями, ушибами, а также при скармливании инфицированного корма и поения из непроточных водоёмов.

Невысокая контагиозность и явление иммунизирующей инфекции приводит к невысокой интенсивности эпизоотического процесса - спорадия (чаще всего в России) или энзоотия (Индия 400 овец в отаре).

7.3. Клинические признаки

Типичное течение болезни острое. Инкубационный период продолжается 1-2 дня,

редко 5 дней.

Болезнь начинается внезапно и почти всегда заканчиваясь гибелью животного. Температура тела повышается после заражения незначительно до 40-40,2°C, отмечается угнетение, отказ от корма, прекращение жвачки

Одним из ранних симптомов является беспричинная хромота, свидетельствующая о поражении глубоких слоев мускулатуры. На отдельных частях тела (на голове жевательных мускулах, на бедре, на крупе, крестце, шее, груди, в подчелюстной области) в течение 8-10 часов образуются резко очерченные неправильной формы быстро увеличивающиеся болезненные отечные припухлости. Эти припухлости вначале теплые и болезненные, затем с прекращением циркуляции крови, вследствие сжатия сосудов газами, становятся холодными и безболезненными. При надавливании слышится треск (крепитация). При перкуссии - тимпанический звук, а при разрезе из них вытекает грязно-бурая пенная жидкость с запахом прогорклого масла. Кожа на поверхности отека теряет эластичность, становится сухой и окрашивается в темно-бурый или черный цвет, легко прорывается.

С развитием местных патологических изменений резко ухудшается общее состояние. Животное становится угнетенным, полностью отказывается от корма, изо рта выделяется слюна, жвачные периоды отсутствуют, животное больше лежит и с трудом поднимается, держа на весу больную конечность. Сердечная деятельность и дыхание нарушаются (до 90 -100 движений в минуту). Пульс становится слабым, слизистые оболочки цианотичны и через 24-72 часа при появлении гипотермии (понижение температуры) животное гибнет. В редких случаях болезнь затягивается до 3 - 10 дней.

Наряду с типичным течением болезни отмечают сверхострое течение.

В случаях, когда болезнь принимает характер септицемии, обычно у животных старше 3 месяцев, наблюдают только общие лихорадочные явления, и гибель наступает иногда через 6-12 часов. У животных старшего возраста наблюдают abortивную форму болезни, которая длится 1-3 дня, а иногда 4-5 дней.

У овец после короткого инкубационного периода снижается аппетит, они отстают от стада, отмечается хромота. Из ротовой полости выделяется пенная слюна, дыхание учащенное, появляется истечение из носовых полостей, скрежет зубами. В некоторых участках тела появляются отеки различного характера, которые крепитируют. Иногда болезнь протекает и без крепитирующих отеков.

7.4. Патологоанатомические изменения

Если диагноз на эмфизематозный карбункул поставлен по клинико-эпизоотологическим показателям, трупы во избежание распространения возбудителя болезни вскрывать не рекомендуется.

Трупы животных вздуты газами, посмертно образующимися в брюшной полости и проникающими в подкожную клетчатку. Из естественных отверстий вытекает пенная кровянистая жидкость. В подкожной клетчатке и в пораженных мышцах обнаруживают геморрагические участки; мышцы в этих местах темно-красного цвета, пронизаны пузырьками газа, при их разрезе ощущается запах прогорклого масла. Регионарные лимфоузлы увеличены, на разрезе темно-красного цвета с очагами кровоизлияний. Кровь темного цвета, свернувшаяся. В грудной и брюшной полостях, в сердечной сумке скапливается мутная жидкость желтовато-красного цвета. Легкие отечны и кровенаполнены. Селезенка набухшая и дряблая. Печень увеличена, иногда с очагами некроза, пронизана пузырьками газа. В почках могут быть подобные изменения. Серозные оболочки часто воспалены, покрыты фибринозными наложениями. Следует отметить, что изменения внутренних органов непостоянны, а при атипичной форме болезни могут быть выражены слабо.

7.5 Лабораторная диагностика

Лабораторная диагностика эмфизематозного карбункула проводится на основании

Методических указаний № 115-ба, утвержденных 10.10.1982 года ГУВ МСХ СССР.

Для исследования в лабораторию направляют кусочки пораженных мышц, экссудат из крепитирующего отека. При этом прокипяченными инструментами вскрывают кожу, после чего инструменты меняют. Пораженный участок разрезают в глубину и из средней части мышцы отбирают кусочки пораженной ткани размером 3×3×3 см. в случае вскрытия трупа берут также кучоки печени и селезенки, кровь сердца. Материал для лабораторного исследования отбирают не позднее, чем через 4 часа с момента гибели животного. В жаркое время года патологический материал консервируют 30%-ным стерильным водным раствором глицерин.

Исследование на эмфизематозный карбункул включает микроскопию мазков из патологического материала, посевы на питательные среды и заражение лабораторных животных.

7.5.1 Микроскопическое исследование

Кусочками мышц и другого патологического материала на обезжиренных предметных стеклах делают мазки-отпечатки и окрашивают по Граму или Муромцеву.

При микроскопии видны отдельные или попарно лежащие полиморфные (веретенообразные, шаровидные, грушевидные) зернистоокрашенные грамположительные палочки со спорами, которые расположены центрально или субтерминально, но могут лежать и свободно. Споры окраску не воспринимают.

7.5.2 Бактериологическое исследование

7.5.2.1. Высевы из патологического материала делают в среду Китт-Тароцци, МПБ и на МПА.

Для этого кусочки мышц, печени, селезенки обжигают на пламени и помещают в пробирки или флаконы со средой Китт-Тароцци; высевы в МПБ и на МПА, а также посевы крови и экссудата делают пастеровской пипеткой.

Среду Китт-Тароцци предварительно регенерируют – прогревают в кипящей водяной бане в течение 15-30 минут, после чего быстро охлаждают до 45-50°C. Одновременно высев можно делать и на глюкозо-кровяной агар Цейслера в чашках Петри.

При поступлении несвежего патологического материала из него готовят суспензию на физиологическом растворе (1:4), которую прогревают в течение 15-20 минут при 80°C, после чего делают высев.

Засеянные пробирки помещают в термостат на 24-48 часов при 37-38°C. Чашки выдерживают в анаэробных условиях 24-48 часов.

Для создания анаэробных условий наиболее приемлем физический метод. Чашки, не переворачивая (дном вниз), помещают в микроанаэроостат или эксмикатор, из которого удаляют воздух при помощи вакуум-насоса.

Из других методов можно применять химический с использованием гидросульфита натрия и бикарбоната натрия. Засеянные чашки Петри ставят на обычное стекло дном вверх. Кислородо-поглощающую смесь насыпают в 2-3 чашки Петри с разбитыми крышками и слегка увлажняют. Одну чашку ставят под чашки с посевами, другую между ними, а третью – сверху. Все чашки закрывают стеклянным цилиндром, предварительно поместив под цилиндр индикаторную марлю. Герметичность создают, обмазывая пластилином края цилиндра в месте соприкосновения со стеклом, обесвечивание индикаторной марли через сутки инкубации посевов в термостате указывает на создание условий анаэробноза. если марля не обесцветилась, необходимо добавить к поглощающей смеси гидросульфит.

Приготовление индикатора. Марлю или фильтровальную бумагу пропитывают раствором следующего состава: 10%-ного раствора глюкозы 4,2 мл, нормального раствора едкого натра – 0,1 мл, 1,5%-ного раствора метиленовой сини в дистиллированной воде – 0,1 мл. После высыхания марлю или бумагу режут на кусочки и хранят в банках из

темного стекла.

7.5.2.2 При росте *Cl. chovoei* на среде Китт-Тароцци сначала наблюдается помутнение бульона, равномерно распределяющееся по всему столбику. Через 20-24 часа питательная среда начинает просветляться и к 36-48 часам столбик ее становится прозрачным, а на дне пробирки или флакона образуется осадок микробных клеток. Газообразование незначительное. При микроскопии культур обнаруживают отдельные или попарно лежащие грамположительные палочки и палочки со спорами.

7.5.2.3 Для выделения чистой культуры возбудителя из жидких питательных сред делают дробный рассев на 3-4 чашки с глюкозо-кровяным агаром Цейслера, предварительно подсушенным в термостате в течение 5-6 часов. Засеянные чашки выдерживают в анаэробных условиях 24-48 часов в термостате при 37-38°C.

7.5.2.4 На агаре Цейслера наблюдается характерный рост колоний в виде преламутровой пуговицы или с изрезанными краями (виноградный лист), вокруг колоний неширокая зона гемолиза. Если в первичных посевах была получена смешанная культура, характерные колонии отсеивают в пробирки со средой Китт-Тароцци и выращивают 24-36 часов, отмечая характер роста, морфологию и тинкториальные свойства.

7.5.2.5 В случае, когда к моменту выделения чистой культуры возбудителя морские свинки, зараженные исходным материалом, живы, полученную культуру проверяют на патогенность путем заражения морских свинок в дозе 0,5 мл.

7.5.2.6 При наличии типичного роста на жидкой и плотной питательной средах, характерных морфологических и тинкториальных свойств, выделенную культуру относят к *Cl. chovoei*.

7.5.3 Биологическое исследование

7.5.3.1 Одновременно с посевами проводят заражение лабораторных животных, для этого кусочки мышц, селезенки или печени измельчают и тщательно растирают в стерильной ступке с небольшим количеством МПБ в равномерную взвесь. Полученную взвесь (1:10) в дозе 0,5-1,0 мл вводят подкожно в области брюшных мышц двум морским свинкам массой 350-400 г. Кровь и мышечный экссудат вводят таким же способом в дозе 0,5-1,0 мл. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 8 суток.

7.5.3.2 При наличии *Cl. chovoei* животные погибают в течение 24-96 часов. У павших морских свинок на коже отмечается серозно-некротический выпот, разлитые или точечные кровоизлияния. Кожа от пораженных мышц отделяется с трудом. Мышцы груди, брюшного пресса, иногда и задних конечностей темно-красного цвета. В паховых и, реже, в подмышечных областях обнаруживают незначительные скопления пузырьков газа. Газообразование незначительно. Кишечник не вздут, а как бы уложен, органы брюшной полости без видимых изменений. Желчный пузырь переполнен желчью.

7.5.3.3 Из трупа или убитой в агональном состоянии морской свинки делают посевы из места введения материала, крови сердца и печени в среду Китт-Тароцци, МПБ и на МПА. Готовят мазки-отпечатки из тех же органов, а также с диафрагмальной поверхности печени.

7.5.3.4 В мазках-отпечатках с диафрагмальной поверхности печени, окрашенных по Грамму или Муромцеву, обнаруживают отдельно лежащие палочки, редко встречаются цепочки из 2-3 члеников, что является одним из дифференцирующих признаков от *Cl. septicum*, при заражении которым в мазках с поверхности печени обнаруживают нити или длинные цепочки.

7.5.3.5 При необходимости дифференциации эмфизематозного карбункула от злокачественного отека суспензией из органов (1:10) или культурой заражают кролика массой 2,0-2,5 кг подкожно в область спины в дозе 1,0-1,5 мл. При наличии возбудителя эмфизематозного карбункула кролик не погибает.

7.5.4 Диагноз на эмфизематозный карбункул считают установленным в случае:

- выделения из патологического материала культуры со свойствами, характерными

для возбудителя этого заболевания, и гибели хотя бы одной морской свинки с типичной патологоанатомической картиной и выделением из ее органов культуры возбудителя;

- гибели хотя бы одной морской свинки из двух зараженных исходным материалом при наличии у нее типичной для данного заболевания патологоанатомической картины и выделении из ее органов культуры возбудителя, если даже в посевах из исходного материала культура возбудителя не выделена.

Срок исследования – 8 дней

8. ПАСТЕРЕЛЛЕЗ

**(лат., англ. – Pasteurellosis; фр., нем. Pasteurellose)
(синонимы болезни: Геморрагическая септицемия)**

Болезнь распространена во всех странах мира. В нашей стране пастереллез регистрируется во всех регионах, но самая высокая заболеваемость отмечается в средней полосе России. Экономический ущерб от пастереллеза складывается из потерь от падежа, вынужденного убоя больных животных и затрат на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий.

Пастереллез – контагиозная инфекционная болезнь животных многих видов, характеризующаяся при остром течении септическими явлениями, крупозным воспалением легких, плевритом, отеками в различных областях тела, а при подостром и хроническом течениях гнойно-некротизирующей пневмонией, поражением глаз, суставов, молочной железы и геморрагическим энтеритом. Диссеминированная инфекция развивается при гематогенном распространении возбудителя из первичного очага инфекции. Риск гематогенной диссеминации повышен у детей с заболеваниями печени и снижением фагоцитарной активности ретикулоэндотелиальной системы.

Инфекционная природа болезни была установлена в 1878 — 1887 гг., после того как Боллингер (1878) описал пастереллез у крупного рогатого скота, а Китт (1885) выделил возбудителя. Выявлены и описаны возбудители пастереллеза кур (Е. М. Земмер, 1878; Пастер, 1880). В эти же годы Пастер провел первые опыты по ослаблению культур бактерий и осуществил иммунизацию птиц. В честь его заслуг в микробиологии этот возбудитель был назван пастереллой, а вызываемая им болезнь — пастереллезом.

А.А. Колосов и С.И. Джупина (1992) считают, что у крупного рогатого скота болезнь проявляется двояко: 1. Сверхостро и остро в септической форме с отеками подкожной клетчатки – геморрагическая септицемия; 2. Подостро и хронически – у молодняка крупного рогатого скота, свиней всех возрастов и реже овец – пастереллез!

8.1. Этиология

Возбудители геморрагической септицемии животных и птиц были названы в 1910 году пастереллами в честь Л. Пастера, который впервые приготовил вакцину против холеры (пастереллеза) кур из возбудителя. Болезнь вызывают биовары бактерий рода *Pasteurella*

Семейство Pasteurellaceae включает в себя нескольких родов: *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Lonepinella* и *Phocoenobacter* (Taxonomic relationships ..., 1999; Harper M. et al., 2006). Выделяют инфекции, обусловленные антигенно различающимися бактериями данного семейства: *Mannheimia haemolytica* биотип А (сероварианты 1, 2, 5-9, 11) и биотип Т (сероварианты 3, 4, 10), а также *P. multocida* (сероварианты А, В, D, Е, F) (Сидоров М.А. и др., 1983; Rice J.A. et al., 2008). *M. haemolytica* вызывает респираторные болезни с острым течением, *P. multocida* - пневмонии, имеющие тенденцию к хроническому течению (Virulence genotype ..., 2006; Dabo S.M. et al., 2008). По данным М.А. Шибеева с соавт. (2009), при исследовании 390 мазков из носовой полости телят установлена циркуляция возбудителя одной серогруппы - *P. multocida* типа А. При изучении частоты выделения *P. multocida* и *M. haemolytica* из

609 проб биоматериала КРС в трех регионах Сибири не выявлено существенных различий между показателями изоляции указанных бактерий от животных по регионам и возрастным категориям (Пастереллез ..., 2012). Пастереллезом болеют дикие животные многих видов, сельскохозяйственные животные всех видов, а также птицы (Целовальников А.И. и др., 1962; Curtis P. et al., 1981). Заражение происходит аэрогенным и алиментарным путём (Амитров В.К. и др., 1961; Бакулов И.А. и др., 1979; Smith E., 1973; Schimmel D. et al., 1983; Kielstein P., 1983). Кошки, собаки, кролики, крысы, мыши, являющиеся носителями пастерелл, заражают других животных и человека преимущественно при укусах и нанесении царапин (Домарадский И.В., 1971; Tindall M. et al., 1972; Черкасский Б.Л., 1983). Кроме этого, показана взаимосвязь патоморфогенеза пастереллеза в системе «мать-плацента-плод» (Чекакина Л.И., 2009). В возникновении пастереллеза большое значение имеет ослабление антиинфекционной резистентности организма (Никифорова Н.М., 1961; Owen C., 1968; Шегидевич Э.А., 1984; Gilmeur N. et al., 1982; Kielstein P., 1983; Schimmel D. et al., 1983). Г.Д. Веревкиным с соавт. (2010) установлено, что наиболее подвержены заболеванию пастереллезом свиньи в возрасте 2-7 месяцев. С.Н. Треглазовым с соавт. (2003) выявлена сезонность пастереллеза нутрий. Бактерии рода *Pasteurella* могут вызывать несколько видов заболеваний (Домарадский И.В., 1971; Буткин Е.И., 1972). Легочный пастереллез (*P. multocida*) является основной формой пастереллеза у свиней и довольно широко распространенной – у КРС, МРС (Шевцов А.А. и др., 2008).

Род *Pasteurella* с 1939 г. включает виды: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*.
Pasteurella multocida - серологически неоднороден, представлен четырьмя капсульными серогруппами – А, В, D, Е и 12 соматическими типами, адаптированными к определенным классам и видам теплокровных. Вызывает разнообразные патологические процессы (геморрагическую септицемию, пневмонию, энтерит, мастит, артрит, пастереллезы на фоне вирусных и гельминтозных болезней), которые обобщены под общим названием пастереллезы.

Pasteurella multocida открыт Л. Пастером в 1880 году, представляет собой неподвижную короткую, овальной формы бактерию. В тканях и крови животных и птиц микроб по морфологии однороден, в культурах - полиморфен (наряду с овоидами встречается большое количество коккообразных форм). У большинства вирулентных культур, особенно выделенных при остром течении болезни, обнаруживают капсулу. Пастереллы окрашиваются всеми анилиновыми красителями, грамотрицательно. Биполярное окрашивание имеет ценное диагностическое значение. На МПБ пастереллы вызывают в первые дни культивирования помутнение среды, а затем - на дне пробирки образуется слизистый осадок, поднимающийся косичкой при встряхивании. На МПА S-формы образуют гладкие, выпуклые, слегка опалесцирующие серо-белые колонии с ровными краями. R-формы - голубоватые, матовые, шероховатые колонии с неровными краями. Изучение антигенной структуры штаммов *P. multocida* имеет большое значение для подбора вакцинных штаммов.

В частности для изготовления вакцины против пастереллеза: крупного рогатого скота используют сероварианты группы В; птиц - группы А и D; свиней - группы А, В, D.

Штаммы *P. multocida* высоковирулентны для белых мышей.

Pasteurella haemolytica - имеет 2 биотипа (А и Т) и 11 серологических вариантов. Характерным свойством *P. haemolytica*, существенно отличающим её от *P. multocida*, является выраженная резистентность белых мышей. Устойчивость пастерелл во внешней среде: в навозе, крови, холодной воде остаются жизнеспособными в течение 2-3 недель; в трупах - до 4-х месяцев; в замороженном мясе - в течение 1 года.

8.2. Эпизоотология

К пастереллезу восприимчивы все виды домашних млекопитающих и птицы. Наиболее чувствительны буйволы, крупный рогатый скот, кролики и куры. Относительно высокую устойчивость к пастереллезу имеют лошади и плотоядные. Проявляется

пастереллез в виде спорадических случаев, но при условиях, способствующих его распространению, может приобретать характер эпизоотии. Болеет пастереллезом и человек.

Основным источником возбудителя инфекции служат больные и переболевшие животные, а также клинически здоровые животные, бывшие в тесном контакте с больными пастереллезом. Большое значение в эпизоотологии болезни имеет пастереллоносительство, которое в неблагополучных хозяйствах среди крупного рогатого скота достигает 70 %, овец - 50, свиней - 45, кроликов - более 50 и среди кур - от 35 до 50 %.

К факторам, способствующим эпизоотическому распространению пастереллеза, следует отнести массовые передвижения животных без должного учета степени благополучия хозяйств по пастереллезу, отсутствие надлежащей организации хозяйственных и ветеринарно-санитарных мероприятий в животноводческих и птицеводческих хозяйствах, широкое использование в качестве кормов недостаточно обезвреженных боенских отходов.

Пути выделения возбудителей из зараженного организма различны: с калом, мочой, особенно с истечениями из носа при кашле, фырканье, с кровью при кровотечениях. Больные коровы могут выделять пастереллы также и с молоком.

Передача возбудителя осуществляется при прямом контакте (совместном содержании здоровых и больных животных), а также через инфицированные корма, воду, почву, предметы ухода, молоко, отходы мясоперерабатывающей промышленности, мышевидных грызунов, насекомых, дикую птицу и человека.

Заражение животных возможно через органы дыхания (аэрогенный путь), травмированную кожу и слизистые оболочки.

Заболеваемость и летальность при пастереллезе могут сильно варьироваться в зависимости от вирулентности возбудителя, иммунологической структуры стада, условий содержания и кормления, наличия сопутствующих инфекций и своевременности проведения оздоровительных мероприятий. В современных условиях содержания животных пастереллез может протекать одновременно с другими болезнями: парагриппом, инфекционным ринотрахеитом, аденовирусной инфекцией, сальмонеллезом, стрептококкозом, диплококкозом; у свиней - с рожей, чумой, сальмонеллезом; у кур - с колибактериозом и стафилококкозом. Смешанные инфекции протекают обычно более продолжительно и злокачественно.

Пастереллез животных наблюдается в любое время года, у свиней чаще в марте-апреле и сентябре-ноябре, у крупного рогатого скота в июле-августе и сентябре-ноябре.

8.3. Клинические признаки

Инкубационный период у КРС и овец длится от нескольких часов до 2-3 дней, у свиней – от 5 до 14 дней.

У КРС заболевание протекает сверхостро и остро, подостро и хронически. По локализации процесса и клиническому проявлению различают септическую, отечную, грудную и кишечную формы болезни.

Сверхострое течение пастереллеза сопровождается внезапным повышением температуры тела (41-42С), появлением поноса, часто кровавого. Животные быстро слабеют. Гибель наступает через несколько часов до появления других клинических признаков. В случае острого течения болезнь может проявиться в отечной, грудной или кишечной формах. При всех формах температура тела повышается.

При отечной форме наблюдается быстро увеличивающиеся в подкожной и межмышечной соединительной ткани отеки в области головы, глотки, шеи, подгрудка, реже в других местах, болезненные на ощупь. Дыхание и глотание затрудненное. Смерть наступает на 1-2 сутки.

Грудная форма протекает с явлениями фибринозной плевропневмонии. Дыхание затрудненное и учащенное, а кашель сухой и болезненный. Наблюдают истечения из носа,

в начале серозное, затем серозно-гнойное. Пульс учащен, жвачка отсутствует, появляется понос. В большинстве случаев животное погибает или болезнь переходит в хроническую форму.

Кишечную форму регистрируют главным образом у молодняка. Болезнь сопровождается поносом, в фекалиях жидкого типа обильное количество слизи с примесью крови. Животное слабеет, лежит и затем через 3-4 недели погибает. Незадолго до гибели температура тела становится ниже нормы.

У овец пастереллез нередко принимает значительное распространение, протекая остро с признаками септицемии.

При остром течении наблюдается угнетение, повышение температуры тела до 41-42С, отсутствие аппетита, учащенное дыхание. Заболевание сопровождается слизисто-гнойным ринитом, конъюнктивитом, крупозной плевропневмонией, геморрагическим энтеритом, серозно-фибринозными отеками подкожной клетчатки в области межжелудочного пространства, шеи, подгрудка. Животное обычно погибает на 2-5 день.

Для подострого течения свойственны фибринозная плевропневмония, кератит, слизисто-гнойный ринит, артриты. При подостром течении болезнь длится 7-20 дней.

Хроническое течение наблюдается у взрослых овец длительность 3 недели и более. Отмечают ринит, конъюнктивит, понос, хроническую бронхопневмонию, отек подкожной клетчатки и воспаление суставов.

У свиней при остром течении внезапно повышается температура тела до 41С и выше. Развивается одышка, угнетение, отказ от корма, покраснение и цианоз кожи в области живота, ушей, бедер. Быстро развивается явление сердечной слабости. Смерть наступает через 1-2 дня.

Подострая форма болезни характеризуется признаками плевропневмонии. Температура держится все время высокой (41С), появляется одышка, болезненный кашель, при надавливании на грудную клетку животные болезненно реагируют. Смерть наступает от асфиксии через 5-8 дней. Хроническая форма пастереллеза развивается постепенно из острой и характеризуется затрудненным дыханием, кашлем и прогрессирующим исхуданием животного. Болезнь затягивается до 1 месяца и более.

У птиц при подостром и хроническом течении болезнь сопровождается длительным поносом, истощением, у молодых кур наблюдается воспаление суставов, абсцессы, насморк и фибринозные наложения на слизистых оболочках ротовой полости.

8.4. Патологоанатомические изменения

При сверхостром и остром течении у павших животных находят геморрагический диатез (в большинстве органов, на слизистых и серозных оболочках множественные кровоизлияния и воспалительная гиперемия), печень и почки перерождены, селезенка слегка отечная, лимфоузлы припухшие, темно-красного цвета. В подкожной клетчатке, особенно при отечной форме болезни, выражены в различных частях тела разлитые серозно-фибринозные инфильтраты.

Легкие отечные, с изменениями, свойственными начальным стадиям крупозной пневмонии. При кишечной форме ярко выражено фибринозно-геморрагическое воспаление желудка и всего кишечника. Трупы животных, павших при подостром и хроническом пастереллезе, сильно истощены и анемичны. На серозных оболочках грудной и брюшной полостей могут быть плотные фибринозные наложения. Перибронхиальные лимфоузлы увеличены, гиперемированы, с множеством кровоизлияний. В легких находят различные стадии красной и серой гепатизации, в отдельных участках очаги некроза, при осложнениях – гнойно-фибринозные фокусы. Селезенка незначительно увеличена, в печени и почках имеются мелкие очаги некроза.

Патологоанатомические изменения у кур почти такие же, как и у млекопитающих.

8.5. Пастереллез у человека

Наиболее часто источником заражения человека являются домашние животные и птицы, а также грызуны. Возбудитель может попадать в организм со слюной при укусе животными. Считают возможной передачу возбудителей слепнями при укусе. Не исключён алиментарный путь передачи при загрязнении пищевых продуктов выделениями грызунов. Случаи заражения человека от человека не наблюдались.

Пастереллез распространён во многих странах мира, однако случаи заболевания регистрируются сравнительно редко и носят обычно проф. характер (болеют работники животноводческих и птицеводческих хозяйств).

Патогенез, патологическая анатомия, иммунитет изучены мало.

Клиническая картина. Инкубационный период 1 — 5 дней. В тех случаях, когда заражение Пастереллез происходит через кожу, болезнь проявляется в виде пустул, сменяющихся образованием струпа, местных подкожных поражений (абсцессы, флегмона), наблюдаются воспалительные явления (припухлость, покраснение, болезненность при движении, повышение температуры). Иногда возможно развитие остеомиелита, артрита, септицемии, появление на теле полиморфной сыпи, угасание которой сопровождается шелушением. Поражения лёгких протекают по типу пневмонии, эмпиемы, бронхоэктазов. Известны случаи конъюнктивита, менингита, абсцесса мозга пастереллезной этиологии. При алиментарном заражении наблюдаются явления энтерита.

8.6 Лабораторная диагностика

Лабораторную диагностику пастереллеза животных и птиц осуществляют на основании Методических указаний № 22-7/82, утвержденных 20.08.1992 года зам. начальника ГУВ Минсельхоза РФ В.М. Авиловым

Включает микроскопию мазков и отпечатков, выделение культур пастерелл и их идентификацию и при необходимости постановку биопроб.

Для исследования в лабораторию направляют 2-3 трупа мелких животных, от крупных животных – сердце с перевязанными сосудами, части селезенки, печени, почек, экссудат из грудной полости и трубчатую кость. При поражении легких берут также их кусочки (5X5 см) на границе нормального и измененного участков, миндалина, бронхиальные, средостенные и заглочные лимфатические узлы.

Патологический материал берут от павших (не позднее 3-5 ч после гибели) или убитых животных, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами.

Для диагностики пастереллеза у птиц в лабораторию направляют, кроме свежих трупов, 5-6 живых птиц с явными признаками болезни. Больную птицу убивают в лаборатории и делают высевы из костного мозга, сердца, печени и селезенки.

Взятие и доставку материала осуществляют в соответствии с действующими Правилами взятия патологического материала, крови, кормов, и пересылки их для лабораторного исследования.

8.6.1 Выделение и идентификация культур

8.6.1.1 Посевы из патологического материала делают в МПБ и на МПА или бульон и агар Хоттингера рН 7,2-7,4 с добавлением 10% нормальной сыворотки крови лошади (см. приложение пп. 1-4) или 5-10% аминокептида-2.

Посев в пробирки с жидкими и твердыми питательными средами проводят пастеровской пипеткой. Пробирки с посевами инкубируют при 37-38 градусов в течение 20-48 часов.

Одновременно с посевами из каждого органа делают мазки – отпечатки, фиксируют 10-15 мин смесью равных объемов этилового спирта и эфира, окрашивают по Леффлеру или Романовскому-Гимза и микроскопируют. В мазках из патологического материала пастереллы выглядят овоиды или короткие палочки с закругленными концами и заметной биполярностью, вокруг которых может быть видна прозрачная капсула.

8.6.1.2 В жидких питательных средах рост пастерелл сопровождается сначала слабым помутнением, затем через 24-36 часов возможно просветление среды и выпадение на дно пробирки осадка, поднимающегося при встряхивании в виде косички.

На сывороточном агаре или агаре с аминокептидом-2 пастереллы растут в виде прозрачных, средней (диаметром до 3 мм), округлых с ровными краями колоний слизистой консистенции, серого цвета.

На простых питательных средах без добавления сыворотки крови пастереллы растут не всегда удовлетворительно. У выделенных культур изучают культуральные, тинкториальные и морфологические свойства. В мазках из культур при окраске по Граму пастереллы имеют вид грамотрицательных овоидов или коккобактерий, расположенных одиночно и попарно.

8.6.1.3 Идентификацию выделенных культур проводят по ферментативным свойствам и подвижности.

Суточную агаровую культуру высеваяют в среды Гисса с глюкозой, маннитам, сахарозой, маннозой, в ПМА, молоко, желатин, на кровяной сывороточной МПА или агар Хоттингера (см. приложение п. 5), в МПБ с 1% нитрата калия, в среду с мочевиной.

Для определения редукиции нитратов исследуемые культуры засевают в МПБ с 1% нитрата калия и выращиванием в течение 48-72 ч. Затем в пробирку добавляют 1 куб см 2%-ного водного раствора крахмала, 1 куб см 1%-ного раствора йодистого калия и 1-2 капли 5%-ного водного раствора серной кислоты и взбалтывают.

При положительной реакции среда приобретает окраску от темно-синего до коричневого цвета; при отрицательной – цвет среды желтый или слабо синий.

Индол выявляют с помощью индикаторных бумажек или по методу Легаль-Вейла. Индикаторные бумажки готовят из полосок фильтровальной бумаги длиной 10-12 см, пропитывая их горячей щавелевой кислотой, высушивают в термостате и хранят в банке с притертой пробкой.

С целью выявления индола в пробирку с МПБ после засева культуры под ватную пробку помещают полоску индикаторной бумажки с таким расчетом, чтобы нижний ее конец не касался среды, и инкубируют при 37 градусах С 24-72 ч. При выделении индола нижняя часть бумажки приобретает розовую окраску.

Метод Легаль-Вейла. В пробирку с суточной бульонной культурой пастерелл вносят 4-5 капель 5%-ного водного раствора нитропруссиды натрия, перемешивают и добавляют вначале такой же объем 40%-ного водного раствора N2OH, а спустя 1-2 мин 4-5 капель ледяной уксусной кислоты. При наличии индола бульонная культура приобретает сине-зеленую окраску.

Для определения уреазы в пробирку, содержащую среду с мочевиной, закапывают 2-3 капли 24-часовой изучаемой бульонной культуры. Посевы культивируют 20-24 ч. при 37 гр. С. При наличии фермента уреазы происходит покраснение среды.

Все виды пастерелл неподвижны, не свертывают молоко, не разжижают желатин, редуцируют нитраты, ферментируют с образованием кислоты без выделения газа глюкозу, маннозу, сахарозу.

P. agrogenes в отличие от других видов ферментирует углеводы с выделением газа.

На кровяном сывороточном МПА или агаре Хоттингера *P. haemolytica* образует колонии с отчетливой зоной гемолиза, которая лучше просматривается после снятия колонии со среды. Остальные виды пастерелл гемолиза не вызывает.

Основные дифференцирующие признаки видов рода пастерелла представлены в таблице 11.

Таблица 11.

Признаки	<i>P. multocida</i>	<i>P. pneumotropica</i>	<i>P. haemolytica</i>	<i>P. ureae</i>	<i>P. aerogenes</i>	<i>P. gallinarum</i>
Гемолиз на	-	-	+	-	-	

кровяном агаре						
Образование индола	+	+	-	-	-	-
Наличие уреазы	-	+	+	+	+	-
Ферментация маннита	+	-	+	+	-	-

Условные обозначения:

+ результат положительный

- результат отрицательный

8.6.1.4. Дифференциация серовариантов Р.

Исследуемую 18-часовую бульонную культуру бактериологической петлей высевают на чашку Петри со свежеприготовленным 1,5%-ным агаром Хоттингера. Посев проводят, не отрывая петли от поверхности агара, параллельными штрихами на расстоянии 7-10 мм один от другого.

Затем бактериологической петлей одним штрихом по диаметру чашки, перпендикулярно нанесенным штрихам, высевают суточную бульонную культуру *Staphylococcus aureus* (культура должна обладать хорошей гемолитической активностью, что определяют высевом ее на кровяной сывороточный МПА).

Чашки с посевами инкубируют при 37градусов С и через 18-24 час учитывают результаты. Штаммы, образующие вблизи (до 5 мм) от линии роста стафилококка более мелкие колонии, чем на удалении от этой линии, относятся к сероварианту А. Кроме того колонии *P. multocida* сероварианта А, растущие вблизи стафилококка, при просмотре в проходящем свете имеют окраску в отличие от остальных флуоресцирующих колоний. Размер колоний серовариантов В и Д в данном тесте не изменяются.

Исследуемую бульонную культуру (5-6 куб см) центрифугируют при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют в оставшейся в пробирке надосадочной жидкости до получения гомогенной суспензии. К полученной суспензии приливают 0,5 куб см водного свежеприготовленного раствора акрифлавина 1: 1000 и тщательно перемешивают.

Штаммы, относящиеся к сероварианту Д, в течении 10-15 мин после добавления раствора акрифлавина образуют крупнохлопчатый неразбивающийся при встряхивании флоккулят. Кроме штаммов *P. multocida* сероварианта Д, флоккулят могут образовывать диссоциированные культуры других серовариантов, но в этом случае флоккулят мелкохлопчатый и легко разбивается при встряхивании.

Сероварианты Ф и В дают отрицательную реакцию флоккуляции.

Штаммы *P. multocida*, не обладающие указанными выше свойствами, относятся к сероварианту В.

8.6.2 Биологическое исследование.

8.6.2.1 Биологическое исследование проводят для определения патогенности выделенной культуры пастерелл и при необходимости с целью обнаружения возбудителя в патологическом материале.

8.6.2.2 Патогенность культур определяют на белых мышах массой 16-18 гр. С этой целью двум белым мышам вводят подкожно по 0,2 куб см 18-24 – часовой бульонной культуры.

Вирулентные штаммы *P. multocida* , относящиеся в основном к сероварианту В и являющиеся возбудителями геморрагической септицемии, вызывают гибель зараженных белых мышей в течении 24-72 час; слабовирулентные штаммы серовариантов А и Д, участвующие в развитии пневмоний – через более продолжительный срок (до 7 сут.).

R. haemolytica может вызвать гибель белых мышей только при внутрибрюшинном заражении. Остальные виды пастерелл, как правило, для лабораторных животных непатогенны.

8.6.2.3 Патогенность культур, выделенных от птиц, проверяют на белых мышях или цыплятах. Суточную бульонную культуру вводят двум белым мышам внутрибрюшинно по 0,2 куб см или двум цыплятам 90-120 – дневного возраста внутримышечно по 1,0 куб см.

8.6.2.4 Для обнаружения возбудителя пастереллеза в патологическом материале суспензий из органов (см. п. 1.6) заражают двух белых мышей подкожно в дозе 0,2 куб см. При этом надо учитывать, что не все виды пастерелл, играющие роль в патологии сельскохозяйственных животных, вызывают гибель зараженных белых мышей.

8.6.2.5 Культуру считают патогенной, а биопробу положительной при гибели через 24-72 ч хотя бы одного из зараженных животных и выделении от него культуры пастерелл.

8.6.2.6 Срок наблюдения за зараженными животными – 7 сут.

8.6.3. Диагноз считают установленным в случае:

- выделение из патологического материала культуры со свойствами, характерными для возбудителя пастереллеза, и установления ее патогенности на лабораторных животных;

- гибели хотя бы одного лабораторного животного из двух зараженных исходным материалом и выделения из его органов культуры со свойствами, характерными для возбудителя пастереллеза, если даже в посевах из исходного материала культуры возбудителя не выделено.

Рецепты приготовления питательных сред

1. Сывороточный мясо-пептонный бульон.

В качестве основы используют мясо-пептонный бульон рН 7,2-7,4, к которому, соблюдая правила асептики, добавляют 10% стерильной без консерванта сыворотки крови лошади.

2. Сывороточный мясо-пептонный агар.

В качестве основы используют 2,0-2,5%-ный мясо-пептонный агар, рН 7,2-7,4 расплавленный и охлажденный до 45-50 гр С, к которому, соблюдая правила асептики, 10% стерильной сыворотки крови лошади без консерванта. Смесь тщательно перемешивают, следя за тем, чтобы не образовывалась пена, и разливают в чашки Петри.

3. Сывороточный бульон Хоттингера.

Для приготовления бульона основой перевар Хоттингера разводят дистиллированной водой до содержания в нем 180-200 мг % аминного азота, добавляют 0,5% хлорида натрия, 0,1% двузамещенного фосфата калия (K_2HPO_4), устанавливают рН 7,2-7,4 и кипятят 15-20 мин.

Приготовленный таким образом бульон фильтруют через ватно-марлевый или бумажный фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при 120°C в течение 20-30 мин. Перед употреблением к бульону Хоттингера добавляют 10% неинaktivированной стерильной сыворотки крови лошади.

4. Сывороточный агар Хоттингера.

К бульону Хоттингера добавляют 2,0-2,5% мелконарезанного агар-агара, после его набухания ставят на огонь и кипятят до полного растворения агара, постоянно помешивая во избежания пригорания.

По окончании кипячения следует восстановить объем среды добавлением горячей дистиллированной воды. После установления нужного рН агар кипятят дают отстояться в теплом месте, чего фильтруют в горячем состоянии через ватно-марлевый фильтр. Осадок на фильтр не выливают. Разливают во флаконы и стерилизуют 30 мин при 1 атм.

Перед употреблением к расплавленному и охлажденному до 40-45 гр.С агару добавляют 10% стерильной сыворотки крови лошади и разливают в чашки Петри.

5. Кровяные сывороточные МПА и агар Хоттингера.

Разливают определенное количество МПА и агара Хоттингера, охлаждают до 45 гр.С и прибавляют 5% стерильной сыворотки крови лошади. После тщательного перемешивания добавляют 5-7% дефибринированной стерильно взятой крови барана. Готовую среду разливают в чашки Петри и дают ей застыть. Слои питательной среды должны быть равномерно окрашены в красный цвет.

6. Среда с мочевиной.

В 100 куб.см дистиллированной воды растворяют: 1г пептона, 5 гр хлорида натрия, 1 гр глюкозы, 2 гр однозамещенного фосфорнокислого калия (КНРО), 20 гр мочевины, добавляют 6 см³ 0,2%-ного водного раствора фенолового красного и устанавливают рН 6,8-6,9. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 мин.

К 900 куб.см дистиллированной воды добавляют 15 гр агар-агара и стерилизуют при 120 гр.С 30 мин. Охлаждают до 40-45?С и смешивают со 100 см³ раствора упомянутого выше. Разливают в стерильные пробирки и скашивают. Цвет готовой среды желтовато-зеленый.

7. Среда для определения редукции нитратов.

В 1000 мл свежеприготовленного МПБ растворяют 2 гр нитрата калия (К № ОЗ), разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 1 атм. (120 гр.С) 15 мин. Готовая среда имеет желтоватый цвет.