

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.11 Ветеринарная микробиология

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 «Возбудители рожи свиней и листериоза».....	3
1.2 Лекция № 2 «Возбудитель туберкулеза».....	7
1.3 Лекция № 3 «Возбудитель сибирской язвы».....	12
1.4 Лекция № 4 «Возбудители клостридиозов».....	15
1.5 Лекция № 5 «Возбудители эшерихиоза и сальмонеллеза».....	20
1.6 Лекция № 6 «Возбудитель бруцеллеза».....	26
1.7 Лекция №7 «Возбудители чумы верблюдов и туляремии».....	29
1.8 Лекция №8 «Возбудители пастереллеза и гемофилёзов»	34
1.9 Лекция №9 «Возбудители лептоспироза и кампилобактериоза».....	37
1.10 Лекция №10 «Возбудители некробактериоза и копытной гнили.....	41
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ.....	44
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 «Устройство ветеринарной микробиологической лаборатории и методы лабораторной диагностики бактериальных инфекций животных».	44
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 «Экспериментальное заражение лабораторных животных»	46
2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 «Лабораторная диагностика стафилококкозов и стрептококкозов».....	47
2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 «Лабораторная диагностика рожи свиней и листериоза».....	51
2.5 Лабораторная работа № ЛР-5 «Лабораторная диагностика туберкулеза».....	53
2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 «Лабораторная диагностика сибирской язвы».....	55
2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 «Лабораторная диагностика клостридиозов».....	57
2.8 Лабораторная работа № ЛР-8 «Лабораторная диагностика эшерихиоза и сальмонеллеза».....	63
2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 «Лабораторная диагностика бруцеллеза».....	64

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1. Лекция № 1 (2 часа)

Тема: «Возбудители рожи свиней и листериоза»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания, краткие клинические признаки рожи свиней. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде возбудителя рожи свиней. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика.
2. Определение заболевания, краткие клинические признаки листериоза. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде возбудителя листериоза. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика листериоза.

1.1.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

Рожа свиней - инфекционная болезнь, характеризующаяся при остром течении - септициемией и воспалительной эритемой кожи, при хроническом - эндокардитом и артритом. Болеют животные преимущественно в возрасте 3-12 мес. Инкубационный период 2 — 5 дней, но может быть и более продолжительным. В зависимости от количества и вирулентности возбудителя, ворот инфекции, восприимчивости животных и факторов внешней среды рожа может протекать молниеносно, остро, поостро и хронически. Различают также септическую, кожную (крапивница) и латентную формы. Молниеносное течение регистрируют сравнительно редко, преимущественно у откармливаемых подсвинков в возрасте 7-10 мес. Острое течение наиболее типично для септической формы рожи. Болезнь начинается угнетением общего состояния и внезапным повышением температуры тела до 42 °С и выше. Ослабление сердечной деятельности приводит к отеку легких, затрудненному дыханию и цианозу кожи в подчелюстной области, а также шеи и брюшной стенки. Эритематозные пятна бледно-розового, а в последующем темно-красного цвета различной величины и формы появляются на 1 — 2-й день после начала заболевания лишь у отдельных животных. Заболевание продолжается 2—4 дня и без лечебной помощи часто заканчивается гибелью животного. Подострое течение рожи проявляется сравнительно легче в кожной форме (крапивница), для которой свойственны повышение температуры до 41 °С и выше, слабость, снижение аппетита и жажда. Для крапивницы характерным признаком служат образование через 1—2 дня на коже головы и туловища, реже на других участках тела, плотных воспаленных припухлостей квадратной, ромбической и реже округлой формы. Количество и размеры эритематозных пятен сильно варьируют между собой, захватывая обширные участки кожи. В большинстве случаев крапивница протекает доброкачественно, и при выздоровлении животного пятна постепенно бледнеют и исчезают. Хроническое течение рожи в редких случаях представляет самостоятельное проявление болезни. Большей частью это лишь продолжение септической формы или крапивницы с осложнениями, проявляющимися разлитым (рожистым) некрозом кожи, веррукозным эндокардитом и хроническим поражением других органов.

Возбудитель рожи свиней - бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Бактерию открыли Л. Пастер и Л. Тюилье в 1882 г. Представитель отдела *Fermicutes* и рода *Erysipelothrix*.

Морфология. Возбудитель - тонкая прямая или слегка изогнутая мелкая палочка размером 0,2-0,3 x 1,5-2 мкм. В старых бульонных культурах и в наложениях на сердечных клапанах при веррукозном эндокардите обнаруживают удлинённые и

нитевидные формы. Бактерии неподвижны. Споры и капсул не образуют. Грамположительные, хорошо окрашиваются обычными анилиновыми красителями.

Культивирование. Факультативный анаэроб. Растет в МПБ, на МПА, МПЖ, ПЖА (0,15-0,2% агара), бульоне Хоттингера, элективной среде Сент-Иваньи (агаровая среда с 0,1 % кристаллвиолета и 1 % азида натрия). Оптимальные условия для роста: температура 36-37°C, pH 7,2-7,6. В МПБ вызывает слабое помутнение без образования пристеночного кольца и пленки, при встряхивании пробирки хорошо заметны муаровые волны: через 48-72 ч среда несколько просветляется, на дне пробирки образуется осадок, который при встряхивании поднимается в виде облачка. На МПА растет в виде мелких росинчатых просвечивающихся колоний (8-форма), с трудом различимых невооруженным глазом: 8-формы выделяют при септицемии. При хроническом течении болезни могут вырастать колонии R-формы крупные, с неровной шероховатой поверхностью и отходящими от края корнеобразными отростками. В столбике желатина при посеве уколом через 6-10 суток от серовато-белого стержня отходят горизонтальные нежные отростки, напоминающие по форме щетку; желатин не разжижается.

Биохимические свойства. Возбудитель выделяет сероводород, не образует индол и каталазу; большинство штаммов разлагают с образованием кислоты без газа лактозу, глюкозу, галактозу, левулезу, редко - ксилозу, арабинозу, мальтозу и рамнозу, не ферментируют сахарозу, маннит и салицин.

Антигенная структура. По содержанию антигенов бактерии рожи свиней могут быть разделены на три группы: А, В и N. Антиген N -общий видовой. Серовары А и В отличаются своими гаптенами. Штаммы серовара В несут гемагглютинирующий и растворимый иммуногенный антиген, поэтому они особенно пригодны для активной иммунизации. От больных свиней, а также здоровых бактерионосителей выделяют преимущественно штаммы серовара А (до 95 %), реже серовара В и очень редко - N.

Устойчивость. Возбудитель обладает высокой устойчивостью во внешней среде. В трупах животных может сохраняться, а иногда и размножаться в течение 3-4 месяцев. В почвах, богатых органическими веществами, сохраняется 7-8 месяцев, в навозной жиже - до 20 суток, в водопроводной воде - 108, в речной воде при 4°C - 75-86, в моче свиней - 135-145, в фекалиях - 38-75 суток. В засоленной свинине бактерии выживают до 6 месяцев, в копченых продуктах -до 3 месяцев. Прямые солнечные лучи убивают через 10-12 суток, высушивание при рассеянном свете - через 3-4 недели; нагревание при 50°C - через 15 мин, при 70°C - через 5 мин. Бактерия не устойчива к антибиотикам и дезинфектантам. Особенно эффективны 2-3% растворы гидроксида натрия, 20% взвесь свежегашеной извести, 2% раствор формальдегида, 5% горячий раствор кальцинированной соды. Патогенность и патогенез. Восприимчивы к бактериям свиньи, особенно в возрасте от 3 месяцев до 1 года. Спорадические случаи болезни отмечены у лошадей, крупного рогатого скота, овец, оленей, собак. Восприимчивы дельфины, многие виды грызунов и насекомых, утки и гуси, а также куры и индейки. Бактерии рожи патогенны и для человека. Обнаружены на поверхности тела, в кишечнике и даже мышцах некоторых видов морских и пресноводных рыб, для которых они непатогенны.

К экспериментальному заражению восприимчивы белые мыши и голуби, они гибнут через 2-5 суток. Менее чувствительны кролики, которые после внутривенного заражения гибнут на 3-6-е сутки.

Заражение свиней и других видов животных, в том числе птиц, происходит при проникновении возбудителя алиментарно, через поврежденную кожу или при укусах кровососущих насекомых. Попадающие в организм бактерии не сразу проникают в кровь и внутренние органы, часто оседают в миндалинах и солитарных фолликулах кишечника. Размножаясь в месте первичной локализации, выделяют токсические вещества, обуславливающие сенсibilизацию организма. При неблагоприятном течении болезни наблюдается диссеминация возбудителя лимфогенным и гематогенным путями, развивается сепсис, накапливаются токсические продукты бактерий, происходят

дистрофические и некробиотические изменения в тканях, подавляется фагоцитоз, наступают тяжелые функциональные расстройства сердечно-сосудистой системы и гибель животных. При подостром и хроническом течении болезни происходит локализация возбудителя и обезвреживание его токсических продуктов, активизируется синтез специфических иммуноглобулинов и фагоцитоз, преобладают аллергические реакции, проявляющиеся в виде кожной экзантемы, веррукозного эндокардита и серозно-фибринозных артритов. Возможна персистенция возбудителя рожи свиней в организме животных.

Лабораторная диагностика. Выявление возбудителя рожи проводят с использованием микроскопического, бактериологического и серологического (РА, РИФ) методов. РА ставят с гипериммунной лечебной сывороткой. На предметное стекло наносят каплю сыворотки в разведении 1:50, затем петлей вносят суточную агаровую культуру и тщательно растирают ее. В положительном случае агглютинация наступает быстро, агглютинат имеет вид плотных мелких комочков.

Биологическая проба. Белых мышей или голубей заражают суспензией (1:10) из органов или бульонной культурой; мышей заражают подкожно (0,1-0,2 мл), голубей - внутримышечно (0,2-0,3 мл). Мыши и голуби погибают через 2-4 суток. Из органов павших делают посев в МПБ и на МПА для выделения чистой культуры возбудителя.

Бактерию рожи свиней необходимо дифференцировать от возбудителя листериоза.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие свиньи приобретают стойкий и длительный иммунитет. Поствакцинальный активный иммунитет продолжается в среднем 4-6 месяцев, пассивный - до 2 недель. Для профилактики применяют живую вакцину жидкую и лиофилизированную против рожи свиней из штамма ВР-2. Для пассивной профилактики и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку. Положительный эффект при лечении оказывают антибиотики (пенициллин, стрептомицин, окситетрациклин, эритромицин и др.), особенно в сочетании с гипериммунной сывороткой.

2. Наименование вопроса №2

Листериоз (*Listeriosis*) - инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся у животных поражением нервной системы, септическими явлениями, абортами и маститами. Летальность при листериозе 47% , а при нервных формах болезни - 98-100%.

Инкубационный период - 7-30 дней. Протекает остро, подостро, хронически. Отличается многообразием форм клинического проявления: нервная, септическая, генитальная, атипичная, бессимптомная. При нервной форме повышается температура до 40-41 градусов по Цельсию, отмечаются угнетение, потеря аппетита, слабость, светобоязнь, слезотечение, истечение слизи из ноздрей, «ходульная походка», атаксия. Периоды депрессии чередуются с периодами возбуждения (животные не обращают внимания на препятствия, неудержимо стремятся вперед или движутся по кругу), наблюдаются судороги, дрожь, гиперкениез жевательной мускулатуры, в конце болезни быстро прогрессируют парезы и параличи; ослабление или полная потеря зрения. Болезнь длится от нескольких часов до 10 дней и в 60-100% случаев заканчивается смертью. Септическая форма регистрируется у животных в первые месяцы жизни и сопровождается повышением температуры тела, угнетением, снижением и потерей аппетита, поносами. Длится 7-14 дней, в большинстве случаев животные погибают. Генитальная форма проявляется абортами во второй половине беременности, задержанием последа, эндометритами, маститами у коров. Атипичная форма встречается сравнительно редко, отмечаются лихорадочное состояние, пневмонии и гастроэнтериты. У лошадей болезнь протекает в виде энцефалита. У птиц - септически (конъюнктивит, угнетение чередуется с возбуждением, судороги, парезы и параличи).

Возбудитель листериоза, *Listeria monocitogenes*, был выделен в 1892 г. Лусетом от больных кроликов. В 1927 г. Пири выделил возбудителя при септическом заболевании

крысоподобных грызунов с типичным поражением печени и назвал его «листерелла», но в 1940 г. он переименовал его на «листерия». По современной классификации отнесены к роду *Listeria*, в котором насчитывается пять видов. Основной вид - *Listeria monocitogenes* - вызывает болезнь у животных многих видов и человека.

Морфология. *Listeria monocitogenes* - полиморфная палочка с закругленными концами, длиной 0,5...3 мкм и шириной 0,3...0,5 мкм; подвижная, грамположительная. В мазках палочки располагаются поодиночке или под углом в виде римской цифры V. Спор и капсул не образуют.

Культивирование. Листерии - факультативные аэробы. Оптимум температурного роста на питательных средах с pH 7,2-7,4 составляет 36-38°C, однако они могут расти при температуре от 4 до 45°C. На МПА образуют мелкие, круглые, выпуклые, прозрачные колонии диаметром от 0,2-0,4 до 2 мм. В МПБ вызывают помутнение среды с образованием слизистого осадка. Листерии хорошо растут на печеночных средах с добавлением 1 % глюкозы и 2-3 % глицерина. В качестве элективных сред используют МПБ с 0,05 % теллурита калия или 0,01-0,02 % теллурита калия в водном растворе глицерина и растворе флоримицина или полимиксина. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона гемолиза.

Биохимические свойства. Ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, левулезу, рамнозу и салицин, замедленно сахарозу, крахмал и глицерин; некоторые культуры разлагают лактозу и мальтозу. Не ферментируют арабинозу, дульцит, инулин и сорбит, не образуют индола и сероводорода, не разжижают желатин, не восстанавливают нитраты в нитриты, дают положительную пробу на каталазу, обладают редуцирующими свойствами.

Антигенная структура. Листерии имеют два антигена: соматический (O) и жгутиковый (H). Различают две серологические группы, объединяющие различные в антигенном отношении листерии. Установлено 16 основных серологических групп, многие из которых подразделены на подгруппы. Наиболее часто выделяют 1-й и 4-й серотипы листерии.

Устойчивость. Листерии устойчивы во внешней среде. В почвах они сохраняют жизнеспособность от 6 до 11 мес и размножаются в почвенных экстрактах; в воде - в течение года и более, в навозе - до 7 месяцев, в силосе - более года, в мясе - до года. В бульонных культурах листерии погибают при 100°C через 10-15 мин, при 55°C - через 1 ч; 2,5%-й раствор формальдегида обезвреживает их через 20 мин, 2,5%-й раствор гидроксид натрия, раствор хлорной извести с содержанием 2%-го активного хлора - через 20 мин.

Патогенность и патогенез. Листерии патогенны для многих видов млекопитающих, в том числе грызунов, хищных и копытных, а также для птиц. Из домашних животных листериоз зарегистрирован у овец, коз, свиней, крупного рогатого скота, лошадей, кроликов, кур, уток и др. Наиболее чувствительны белые мыши и кролики. Заражают внутривенно или внутривенно в дозе 0,30,5 мл суточной бульонной культуры.

В зависимости от места внедрения возбудитель распространяется в организме различными путями: гематогенным, лимфогенным и нейрогенным. Различают септическую и нервную формы болезни. При септической форме, которую чаще наблюдают у молодняка, листерии заселяют все органы и ткани организма, вызывая дегенеративные изменения в паренхиматозных органах. Нервная форма проявляется менингоэнцефалитом, при этом листерии обнаруживают только в головном и спинном мозге. У беременных животных листерии вызывают гибель плодов и аборт. Патогенное действие листерии обуславливается за счет выделения экзо- и эндотоксинов.

Лабораторная диагностика. Лабораторная диагностика листериоза основана на результатах бактериологического исследования, в отдельных случаях применяют серологическую диагностику. Выделенные культуры исследуют на подвижность, изучают их ферментативные свойства на средах Гисса, ставят пробу на каталазу. Проводят дифференциацию от возбудителя рожи свиней. Ставят капельную РА на стекле с

поливалентной листериозной агглютинирующей сывороткой. Затем с помощью серогрупповых сывороток определяют серогруппу выделенной культуры. Специфические свойства листерии проверяют также с помощью конъюнктивной пробы на морских свинках или внутрикожной пробы на морских свинках или кроликах. Для типирования культур используют также листериозные бактериофаги, включающие два монофага. Серологическая диагностика. Сыворотку животных исследуют в РА и РСК, ИФА. Разработана ПЦР.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие животные приобретают иммунитет. С профилактической целью применяют сухую живую вакцину из штамма АУФ. После однократного ее введения у крупного рогатого скота, свиней и овец создается иммунитет.

1.2 Лекция № 2 (2 часа)

Тема: «Возбудитель туберкулеза»

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания, краткая характеристика туберкулеза. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя туберкулеза. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная и аллергическая диагностика туберкулеза. Иммунитет и иммунопрофилактика

2. Определение заболевания, краткая характеристика паратуберкулеза. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя паратуберкулеза. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная и аллергическая диагностика паратуберкулеза. Иммунитет и иммунопрофилактика.

1.2.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

Туберкулез - это инфекционное, хронически протекающее заболевание у человека, животных, птиц, характеризуется образованием множественных туберкулов (бугорков), подвергаемых творожистому перерождению, обызвествлению.

Туберкулез обычно протекает хронически, и нередко без ярко видимых признаков. Большинство больных туберкулезом животных по внешнему виду и общему состоянию, особенно в начале болезни, ничем не отличаются от здоровых. Больных животных выявляют в основном аллергическим и серологическим исследованием, туберкулезные поражения обнаруживают обычно лишь при послеубойном осмотре органов.

По месту локализации патологического процесса различают легочную и кишечную формы туберкулеза; встречаются также поражения вымени и серозных покровов (жемчужница), генитальная форма и генерализованный туберкулез.

Условно принято различать открытый (активный) туберкулез, когда возбудитель болезни выделяется во внешнюю среду с молоком, фекалиями, мокротой при кашле, и закрытый (латентный) при наличии инкапсулированных очагов без выделения возбудителя во внешнюю среду. При поражении кишечника, молочной железы, матки процесс всегда считают открытым.

У крупного рогатого скота при туберкулезе чаще поражаются легкие. При сильном поражении их наблюдают незначительное повышение температуры тела, редкий, но сильный кашель; при затяжном течении болезни кашель становится слабым, беззвучным, но мучительным. Поражение молочной железы характеризуется увеличением надвыменных лимфоузлов, которые становятся плотными, бугристыми, малоподвижными. В пораженных долях вымени прощупываются уплотненные безболезненные фокусы, при значительном поражении изменяется конфигурация пораженной доли.

Туберкулез свиней протекает бессимптомно. Иногда наблюдают увеличение подчелюстных и заглочных лимфоузлов.

Овцы и козы туберкулезом болеют редко и бессимптомно. При сильно выраженном процессе клинические признаки сходны с таковыми крупного рогатого скота.

Туберкулез у птиц протекает хронически, с неясными клиническими признаками. Генерализованная форма сопровождается вялостью, снижением яйценоскости, истощением (атрофия грудных мышц). При поражении кишечника наблюдают поносы; печени — желтушное окрашивание слизистых оболочек и кожного покрова. Иногда отмечается хромота, образование опухолеподобных образований на подошвенной поверхности конечностей.

Возбудителей туберкулеза человека и крупного рогатого скота открыл Р. Кох в 1882 г., птичий вид открыли Штраус и Гамалея (1891). Возбудителей туберкулеза человека и крупного рогатого скота открыл Р. Кох в 1882 г., птичий вид открыли Штраус и Гамалея (1891). В настоящее время все возбудители туберкулеза и атипичные микобактерии (всего известно 74 вида) относятся к роду *Mycobacterium*. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*Myc. tuberculosis*), животных (*Myc. bovis*), птиц (*Myc. avium*).

Морфологически все виды микобактерий туберкулеза сходны между собой и культивируются на одних и тех же питательных средах. В мазках из мокроты или органов микобактерии — небольшие тонкие палочки размером 1,5-4х0,4 мкм, грамположительны. На искусственных питательных средах могут образовывать ветвящиеся формы. Микобактерии туберкулеза обладают большой полиморфностью: встречаются палочковидные, зернистые, нитевидные, кокковые, фильтрующиеся и L-формы. Микобактерии туберкулеза неподвижны, спор не образуют, жгутиков не имеют. Они кислото-, спирто- и щелочеустойчивы из-за высокого содержания липидов (до 60 %) и вследствие этого трудно окрашиваются анилиновыми красителями, с трудом окрашиваются положительно по Граму и приобретают сине-фиолетовый цвет, но хорошо окрашиваются по Цилю-Нильсену в красный цвет. Для быстрого обнаружения микобактерии в различных объектах существует люминесцентный метод, в основе которого лежит их способность окрашиваться люминесцентными красителями (родамин-аурамином) и давать золотисто-желтый цвет под воздействием ультрафиолетового излучения. Метод обладает высокой чувствительностью, дает цветное изображение возбудителя.

Культивирование. Необходимым условием для осуществления биохимических процессов у микобактерий является создание оптимальной температуры: 37-38°C для человеческого, 38-39°C для бычьего и 39-41°C для птичьего вида. Микобактерии туберкулеза размножаются в строго аэробных условиях на специальных элективных питательных средах, содержащие соединения углерода, азота, водорода и кислорода, а также магний, калий, серу и фосфор. Микобактериям туберкулеза присущ медленный обмен веществ: рост культур проявляется через 15-30 суток и более, в начале в виде почти незаметных микроколоний, из которых затем формируются визуально наблюдаемые макроколонии. В 1887 г. Нокар и Ру обнаружили у микобактерий туберкулеза глицеринофильность. Глицерин оказался лучшим источником углерода, который добавляется теперь в различные среды. Для первичного выделения культур оправдали себя только плотные яичные среды Петраньяни, Гельберга и др.

Для изучения биохимических свойств микобактерий и других целей целесообразно применять безбелковые синтетические среды Сотона, Моделя, для пересева и сохранения культур лучше использовать простые глицеринсодержащие среды (МПГБ, глицериновый картофель). На плотных средах микобактерий образуют сливающиеся бугристые колонии, которые могут иметь гладкую блестящую или шероховатую поверхность, а также сплошной морщинистый налет белого, или белого с желтоватым оттенком, или же другого цвета, при росте в жидких питательных средах образуют как поверхностный, так

и придонный рост с наличием бугристой, морщинистой пленки крошкообразной консистенции, имеющей желтовато-коричневый, кремовый или бурый цвет.

Существуют методы ускоренного выращивания (микрокультивирование) микобактерий (Прайс, 1941; Е. А. Школьников, 1948; Н. М. Колычев, 1970 и др.).

Метод Прайса: мазок на стекле высушивают, затем выдерживают 5 мин в 5%-м стерильном водном растворе серной кислоты; кислоту смывают стерильной дистиллированной водой; мазок помещают в жидкую питательную среду, в которой рост микобактерий проявляется на стеклах через 2-6 суток в виде микрокультур, после их окраски по Циль-Нильсену при микроскопии. Микобактерии человеческого и бычьего видов образуют косы, жгуты, завитки, скопления

Биохимические свойства. Микобактерии туберкулеза содержат различные ферменты. Ферменты эстераза и липаза расщепляют жиры; дегидраза - органические кислоты, в том числе аминокислоты; уреазы - мочевины, перигалактаза - углеводы, каталаза - перексид водорода; протеолитические ферменты (протеазы) - белок. Микобактерии ферментируют алкоголь, глицерин и многочисленные углеводы, лецитин, фосфатиды. У молодых культур микобактерий туберкулеза сильно выражены редуцирующие свойства, что, в частности, проявляется в их способности восстанавливать теллурит.

Токсинообразование. Микобактерии туберкулеза содержат эндотоксины - туберкулины (Р. Кох, 1890), которые проявляют токсическое действие только в больном организме. Жирные кислоты (масляная, пальмитиновая, туберкулостеариновая, олеиновая) способствуют распаду клеточных элементов, творожистому перерождению тканей, блокируют липазу и протеазы, вырабатываемые микобактериями. Вирулентные микобактерии содержат полисахаридные компоненты, корд-фактор, повышающий их вирулентность, кроме того, корд-фактор разрушает митохондрии клеток зараженного макроорганизма, нарушая процессы дыхания и фосфорилирования.

Антигенная структура. У микобактерий установлены как специфические видовые, так и межвидовые и даже межродовые антигенные связи. У отдельных штаммов микобактерий выявлены различные антигены. Все без исключения микобактерии содержат полисахариδο-белково-липоидный комплекс, названный полным антигеном. При парентеральном введении у животных наблюдают образование антител, которые выявляют в серологических реакциях - РА, РП, РСК и др. Туберкулины также относятся к антигенам. В отдельности ни одна из фракций микобактерий туберкулеза (туберкулопротеиды, туберкулолипиды, туберкулополисахариды) не вызывает иммунологических сдвигов в организме. Образование антител вызывает лишь полисахариδο-липоидный комплекс, т. е. полный антиген.

Устойчивость во внешней среде, патогенность, патогенез. Микобактерии туберкулеза отличаются устойчивостью к химическим и физическим воздействиям, особенно к высушиванию. В высушенной мокроте, кусочках пораженной ткани, пыли Микобактерии сохраняют жизнеспособность от 2 до 7 месяцев и более; в проточной воде - более года, в почве - до 3 лет. Низкие температуры не влияют на жизнеспособность микобактерий. Микобактерии чувствительны к воздействию прямых солнечных лучей, в жаркие дни в мокроте они погибают через 1,5-2 ч. Особенно губительно для них ультрафиолетовое излучение. Важное значение в санитарно-профилактическом отношении имеет высокая чувствительность микобактерий к нагреванию. Во влажной среде они погибают при 60°C в течение 1 ч, при 65°C - через 15 мин, при 70-80°C - через 5-10 мин. В свежем молоке возбудитель туберкулеза сохраняется 9-10 суток, а в скисшем молоке гибнет под воздействием молочной кислоты; в масле - недели, а в некоторых сырах - даже месяцы. Микобактерии туберкулеза по сравнению с другими неспорообразующими бактериями значительно более устойчивы к химическим дезинфицирующим веществам; 5% раствор фенола и 10%-раствор лизола разрушают возбудителя через 24 ч, 4% формалин - после 3 ч. В качестве дезинфицирующих растворов при туберкулезе наиболее эффективны: 3% щелочной раствор формальдегида при 3-часовой экспозиции; 2% (по формальдегиду)

раствор метеофора, растворы хлорной извести, нейтрального гипохлорита кальция и взвеси, содержащие не менее 5 % активного хлора при экспозиции 3 ч; 1% раствор глутарового альдегида, 8% эмульсия феносмолина из расчета 1 л/м² и при экспозиции 3 ч и др.

Патогенность. Бычий вид микобактерии вызывает болезнь у коров, овец, коз, свиней, лошадей, кошек, собак, оленей, маралов и др. Из лабораторных животных наиболее чувствительны кролики и морские свинки, у которых развивается генерализованный туберкулез. Птичий вид микобактерии вызывает туберкулез у кур, индеек, цесарок, фазанов, павлинов, голубей, уток и др. В естественных условиях возможно заражение домашних животных (лошади, свиньи, козы, овцы, иногда крупный рогатый скот) и даже человека. Из лабораторных животных наиболее подвержены кролики, морские свинки менее восприимчивы.

Патогенез. Возбудитель туберкулеза, попав в организм аэрогенным, алиментарным и другими путями, проникает в межклеточные щели слизистой оболочки, где их поглощают подвижные полиморфноядерные лейкоциты (фагоциты) и с током лимфы или крови разносят по всему организму. Размножение микобактерии туберкулеза и взаимодействие с ними макрофагов происходит преимущественно в тканях с избирательной локализацией туберкулезного процесса (лимфатические узлы, легкие, печень и др.). В дальнейшем в местах жизнедеятельности возбудителя формируется защитный очаг - туберкул. Туберкулезные изменения в тканях представляют собой воспалительную реакцию, включающую в себя процессы альтерации (некроз части тканевых элементов), экссудации (выход из сосудов плазмы с форменными элементами) и пролиферации (формирование соединительной капсулы). Основу туберкула составляют фагоциты. Туберкул вначале имеет сероватый цвет и округлую форму; величина его от булавочной головки до чечевицевого зерна. Затем узелок окружается соединительнотканной капсулой. Ткань внутри инкапсулированного узелка из-за отсутствия притока питательных веществ и под воздействием токсинов возбудителя отмирает и превращается в сухую крошковатую массу, напоминающую творог (казеоз). При высокой естественной резистентности организма и минимальных дозах возбудителя может произойти заживление первичного туберкулезного комплекса с одновременным разрушением содержащихся в нем микобактерий. Но чаще всего инкапсулированные первичные очаги обызвествляются и вместе с находящимися внутри них туберкулезными микобактериями сохраняются в организме длительное время, даже в течение всей жизни. В организме с пониженной резистентностью процесс инкапсуляции возбудителя в первичном очаге выражен слабо. Вследствие недостаточной регенерации соединительной ткани происходит расплавление стенок туберкулезного узелка, при этом микобактерии попадают в здоровую ткань, что приводит к образованию множества мелких узелков, которые могут сливаться между собой, образуя крупные туберкулезные фокусы. Микобактерии из туберкулезных фокусов могут попасть в кровь, что приводит к генерализации процесса и развитию в разных органах туберкулезных очагов различной величины. При такой стадии болезни отмечается неблагоприятный исход туберкулезной инфекции - истощение и смерть.

Лабораторная диагностика туберкулеза. Включает микроскопический, микробиологический, биологический и серологический методы.

В качестве патматериала используют: пораженные органы и ткани, кровь, экссудат, транссудат, гной, молоко, масло, творог, мочу, фекалии, навоз, почву, воду, соскобы с различных объектов животноводческих помещений и др. В каждом случае перед посевом применяют соответствующий метод обработки материала: обрабатывают 6-10% раствором серной кислоты не более 25-30 мин; флотации.

Микроскопический метод - наиболее распространенный метод. Он прост, доступен, позволяет быстро получить ответ, используя световую и люминесцентную микроскопию. Бычий вид - микобактерии достигают длины 1,5-3,5 и толщины 0,3-0,5 мкм; также встречаются в виде овоидных и кокковидных форм. Палочковидные формы чаще прямые

и изогнутые, с округленными концами и зернистостью. Человеческий вид микобактерии - более длинные, тонкие и стройные. Микобактерии птичьего вида наблюдаются в виде коротких и длинных полиморфных палочковидных форм.

Бактериологический метод. Вирулентные культуры микобактерии бычьего вида на питательных средах растут очень медленно в виде сферических, гладких и шероховатых колоний, чаще в виде сухих крошек. Свежевыделенные культуры микобактерии птичьего вида растут быстрее, чем человеческого и бычьего. Рост характеризуется образованием гладких, мелких, круглых, белых, блестящих, с ровными краями колоний, располагающихся как единично, так и в виде скоплений или сплошного слизистого налета.

Биологический метод. Сущность биологического метода дифференциации заключается в определении патогенности культуры для морских свинок, кроликов, птиц и других лабораторных животных, которые отличаются восприимчивостью к различным микобактериям туберкулеза.

Биохимический метод. Основан на проявлении различной ферментативной активности микобактерии разных видов. Наиболее демонстративны следующие тесты биохимической дифференциации микобактерии: ниаиновый тест, реакция восстановления нитратов, амидазная проба, каталазная и арилсульфатазная активность, рост на среде с салицилатом натрия, деградация (разрушение) салицилата натрия, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота, устойчивость к 5% хлориду натрия и пикриновой кислоте, сахаролитическая активность, гидролиз твина-80 и др.

Серодиагностика. Для ранней диагностики туберкулеза, а также для определения антигенного родства между истинными и атипичными микобактериями используют реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА); реакцию кольцепреципитации; реакцию диффузной преципитации в геле (РПГ).

Часто используется ПЦР.

Аллергическая диагностика туберкулеза. Занимает ведущее место в прижизненной диагностике туберкулеза у животных и птиц. Предполагает использование туберкулина (Р. Кох, 1890). Однако еще до Коха в России Гельман (1888-1889) изготовил экстракт из туберкулезных бактерий и испытал его с диагностической целью на больных туберкулезом коровах, получив положительный результат. Диагностика с помощью туберкулина наиболее распространена в медицине и ветеринарии. В настоящее время основным прижизненным методом исследования животных на туберкулез служит внутрикожная туберкулиновая проба. Туберкулин для млекопитающих изготавливают из штаммов только бычьего вида. Для внутрикожной пробы применяют сухой очищенный туберкулин (протеин пурифицированный дериват - ППД). ППД был предложен М. А. Линниковой для медицинской практики. В ветеринарии используют стандартизированный сухой очищенный туберкулин для млекопитающих, который содержит в диагностической дозе $10\,000 \pm 2000$ туберкулиновых единиц (ТЕ), т. е. 0,2 мг препарата, растворенного в 0,2 мл растворителя. Сухой очищенный туберкулин (ППД) для птиц готовят по той же технологии, что и ППД для млекопитающих - из культурального фильтрата микобактерий туберкулеза птичьего вида и применяют для диагностики у птиц и свиней.

Иммунитет и средства специфической профилактики. При туберкулезе иммунитет нестерильный, продолжается до тех пор, пока в организме присутствуют живые микобактерии туберкулеза. Роль живых бактерий туберкулеза в образовании иммунитета выявил Р. Кох в опыте повторного заражения больных туберкулезом морских свинок. Механизм формирования иммунитета при туберкулезе до конца не выяснен. Присутствующие в крови больных антитела (агглютинины, комплементсвязывающие и др.) играют ничтожную роль в защите макроорганизма. Значительную защитную функцию организма осуществляют Т-лимфоциты, тканевые элементы, образующие специфические бугорки (эпителиоидные, гигантские и лимфоидные клетки). Бугорок

может инкапсулироваться и обызвестляться, что приводит к разрушению содержащихся в бугорке микобактерий. И. И. Мечников первый указал на роль макрофагов в разрушении возбудителя туберкулеза. Однако фагоцитоз имеет незавершенный характер и фагоцитированные микобактерии не погибают, а даже сохраняются в макрофагах.

Вакцину против туберкулеза предложили в 1924 г. французские ученые Кальметт и Герен. В течение 13 лет они культивировали штамм бычьих туберкулезных палочек на картофеле, пропитанном бычьей желчью с 5 % глицерина. В результате 230 пересевов культуры, непрерывно подвергавшейся воздействию желчи, авторы получили стойкий вариант с определенными биологическими свойствами. Штамм этот назван культурой BCG, по-русски БЦЖ. Кальметт и Герен предложили использовать культуру БЦЖ как безопасную вакцину для иммунизации людей. В ветеринарной практике вакцина БЦЖ не нашла применения

1.3 Лекция № 3 (2 часа)

Тема: «Возбудитель сибирской язвы»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания, краткая характеристика болезни.
2. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств.
3. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.
4. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика

1.3.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

Сибирская язва - острое инфекционное заболевание многих видов сельскохозяйственных и диких животных, а также человека, характеризуется признаками септицемии или образованием карбункулов, у свиней часто протекает с поражением заглоточных лимфатических узлов. Сибирская язва известна 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, штабной лекарь, участвуя в экспедиции на Урале в 1786—1789 гг. установил, что сибирская язва у животных тождественна заболеванию у человека, доказал заразность болезни, заразив себя материалом, взятым от больного животного, и дал ей название «сибирская язва». 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. Через два года в России Л.С. Ценковский изготовил 1-ю и 2-ю вакцины против сибирской язвы, которые применяли в нашей стране в течение 80 лет. В дореволюционной России сибирская язва была одной из распространенных и опасных инфекционных болезней.

Клинические признаки болезни зависят от вирулентности возбудителя, степени устойчивости животного, пути его заражения. Инкубационный период длится 1...3 дня. Различают две основные формы болезни: септическую и карбункулезную. По локализации патологических изменений выделяют кожную, кишечную, легочную и ангинозную формы сибирской язвы. Кроме того, различают молниеносное, острое, подострое, хроническое и abortивное течение болезни.

Исход заболевания, если не подвергать животных лечению, как правило, летальный.

При молниеносном течении (чаще регистрируется у овец и коз, реже — у крупного рогатого скота и лошадей) отмечают возбуждение, повышение температуры тела, чего

2. Наименование вопроса №2.

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* — крупная неподвижная грамположительная спорообразующая аэробная палочка, относящаяся к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. 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 условиях - вне организма. В нескрытых трупах, в живом организме, при t ниже 120 °С и выше 450 °С - споры не образуются. В мазках из патологического материала бациллы антракса расположены одиночно или попарно, реже - короткими цепочками; в мазках из культур обнаруживают длинные цепочки. В мазках концы палочек в цепочках выглядят обрубленными, а вид цепочек напоминает бамбуковую трость.

Культивирование. По способу дыхания возбудитель сибирской язвы относится к факультативным анаэробам. Оптимальная температура роста 35—37 °С и pH 7,4—8,0. Микроб нетребователен к питательным средам: растет в настоях соломы, на поверхности сырого и вареного картофеля, моркови, свеклы и др. На МПА через 24 ч роста появляются колонии: серебристо-серые, зернистые, диаметром 3-5 мм, с бахромчатыми краями и отходящими от них пучками нитей, напоминающими голову медузы или львиную гриву. Такой рост (R-форма) характерен для вирулентных штаммов. В старых культурах появляются гладкие S-формы колоний, авирулентные. В бульоне через 18-24 ч образуется осадок в виде комочка ваты, а сам бульон остается прозрачным.

Биохимическая активность. Разлагает глюкозу, мальтозу, сахарозу с образованием кислоты, молоко медленно свертывает и пептонизирует. Характерен рост в столбике желатина: в виде «опрокинутой елочки», позже желатин разжижается в виде воронки; на кровяном агаре не дает гемолиза, чем отличается от сходных с ним почвенных и ложносибиреязвенных бацилл.

Токсинообразование. Продуцирует сильнейший экзотоксин, который вместе с капсулой обуславливает вирулентность. С экзотоксином связывают воспалительное и летальное действие возбудителя. Обнаружено, что токсин также подавляет фагоцитарную активность лейкоцитов. Токсин вызывает в организме повышение проницаемости сосудов, расстройство дыхания вследствие поражения центральной нервной системы, изменяет клеточный и химический состав крови. Он состоит из 3 факторов: протективного антигена (РА); летального (LF) и эдематогенного фактора (EF).

Антигенная структура. Бациллы антракса обладают сложной антигенной структурой. Выделены: оболочечный АГ, соматический АГ, капсульный АГ; протективный АГ экзотоксина. Только на последний синтезируются защитные антитела.

3. Наименование вопроса №3.

Вегетативные формы микроба малоустойчивы. В мягких тканях нескрытого трупа они разрушаются под действием протеолитических ферментов через 7 дней. 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 низкой температуре (-10 °С) вегетативные клетки выживают 24 дня, в замороженном мясе (при t -150 °С) выживают до 15 дней. Споры возбудителя сибирской язвы высокорезистентны. Не погибают в разлагающемся трупном материале, десятками лет сохраняются в почве. Сухой жар при 120...140 °С убивает их через 2...4 часа, автоклавирование при 120 °С убивает за 5...10 мин, кипячение - за 30 мин. По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам споры возбудителя сибирской язвы относятся к особо устойчивым (4-я группа). Дезинфицирующие растворы (сулема 1 : 1000, 5% раствор карболовой кислоты, 5—10% раствор хлорамина) убивают их только за несколько часов, а этиловый спирт в концентрациях от 25% до абсолютного - за 50 дней). Для дезинфекции применяют: растворы хлорной извести; 10%-ный горячий гидроксид натрия; 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 и др.

Патогенность. Более восприимчивы: крупный и мелкий рогатый скот, буйволы, лошади, ослы, олени, верблюды. Менее восприимчивы - свиньи. 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. Источники и резервуары возбудителя инфекции: больные сельскохозяйственные животные; дикие хищные животные (лисицы, шакалы, койоты); домашние плотоядные (собаки, кошки); хищные птицы (грифы, ястребы, кобчики). Основной способ заражения — алиментарный через корм и воду; трансмиссивный при наличии кровососущих насекомых (слепни, мухи-жигалки, клещи и др.); аэрогенный (чаще овцы при вдыхании пыли, содержащей споры возбудителя). 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.

Патогенез. Возбудитель сибирской язвы, проникнув в организм, в первую очередь попадает и размножается в лимфоидно-макрофагальной системе, образуя при этом защитные капсулы и вырабатывая агрессивные, парализующие фагоцитарную деятельность лейкоцитов и клеток ретикулоэндотелиальной системы, что способствует размножению возбудителя. Важнейшее патогенетическое значение имеют экзотоксин и капсульное вещество бацилл. Наличие капсул предотвращает фагоцитоз, а токсин разрушает клетки, фиксировавшие бациллы. Действие агрессивных веществ нарушает проницаемость эндотелия сосудов, ухудшает кровообращение, приводит к застою, общей интоксикации организма. В пораженном организме происходит экссудация жидкости в полости и ткани, появляются кровоизлияния. Агрессивные вещества, поступая в кровь, нейтрализуют факторы защитных сил организма, способствуют активному размножению возбудителя. Токсичные продукты распада попадают в головной мозг, вызывая его поражение. Беспрепятственное размножение возбудителя за короткое время приводит к общей септицемии и гибели животного. Прогрессирует гипоксия, нарушается кислотно-основное состояние, кровь теряет способность свертываться. При заражении ослабленного животного высоковирулентным штаммом возбудителя септицемия может развиваться сразу и смерть наступает уже через несколько часов. Карбункулы, возникающие при заражении животного через поврежденную кожу или вторично, представляют собой очаги серозно-геморрагического воспаления в местах локализации бацилл. Они размножаются в этих очагах и продуцируют экзотоксин, вызывая явления интоксикации. Затем бациллы проникают в регионарные лимфатические узлы, вызывая геморрагический лимфаденит, а из лимфатических узлов — в кровь. Таким образом, и в этих случаях может развиваться септицемия.

4. Наименование вопроса №4

Лабораторная диагностика сибирской язвы в первую очередь предусматривает выделение возбудителя. Основная схема лабораторного исследования патологического материала включает: микроскопию окрашенного мазка, посев на питательные среды, заражение лабораторных животных, постановку серологических реакций (РП, РИФ, ИФА).

Для дифференциации возбудителя сибирской язвы от микробов-сапрофитов, близкородственных *B. anthracis* (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* и др.), широко распространенных в природе, применяют методы, выявляющие фенотипические различия штаммов, в том числе определение характера роста на различных питательных средах, чувствительность к пенициллину и бактериофагу, образование капсул, тест на образование сибиреязвенного токсина, РП в геле, РИГА в комплексе с другими бактериологическими методами (микроскопия, культивирование, биопроба на

лабораторных животных) и др. В настоящее время при диагностики широко используется ПЦР.

Иммунитет, специфическая профилактика. У переболевших сибирской язвой животных развивается стойкий и продолжительный иммунитет. Основу профилактики и борьбы с сибирской язвой в настоящее время составляют средства специфической профилактики — вакцины. Длительно в нашей стране применялась вакцина СТИ, в настоящее время для создания активного искусственного иммунитета широко используют живую споровую лиофилизированную вакцину из штамма 55-ВНИИВВиМ и аналогичную жидкую вакцину. Иммунитет формируется через 10 дней после прививки и сохраняется более 1 года. Разработаны две формы сибиреязвенной вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ: концентрированная и суперконцентрированная, и способ их внутрикожного применения при помощи безыгольного инъектора (крупный рогатый скот, свиньи).

Создана также универсальная вакцина против сибирской язвы человека и животных «УНИВАК», которую вводят безыгольным способом или подкожно шприцем. Иммунитет развивается через 7 дней, продолжительность 1,5 года. Возможно использование ассоциированных вакцин: против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула; против сибирской язвы и ящура; против сибирской язвы и клостридиозов овец; против сибирской язвы и оспы овец.

Разрабатываются также современные сибиреязвенные вакцины нового поколения с получением рекомбинантных штаммов, обеспечивающих формирование более длительного иммунитета.

1.4 Лекция № 4 (2 часа)

Тема: « Возбудители клостридиозов».

1.4.1 Вопросы лекции

1. Характеристика возбудителя эмфизематозного карбункула, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика эмкара.

2. Характеристика возбудителя столбняка, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика столбняка.

3. Характеристика возбудителя ботулизма, лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика ботулизма.

1.4.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

К числу микроорганизмов, обладающих способностью вызывать тяжело протекающие инфекционные или интоксикационные процессы у животных и человека, относится группа патогенных клостридий. Клостридии - многочисленная группа почвенных анаэробных бактерий, включающая 61 вид. Однако только 12 из них патогенные микроорганизмы.

Экологической особенностью различных представителей рода клостридий является их способность к сапрофитическому существованию, высокая устойчивость к неблагоприятным воздействиям среды, обеспечиваемая спорообразованием, и широкое их распространение практически на всех континентах. Типичными местами их обитания и размножения являются почва и желудочно-кишечный тракт животных.

Патогенные клостридии относятся к семейству бацилл (Bacillaceae), роду клостридий (Clostridium). Важнейшими возбудителями анаэробных клостридиозов являются: *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. chauvoei*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. histolyticum*, *C. sordellii*.

Эмфизематозный карбункул – это острое инфекционное заболевание крупного рогатого скота (реже мелкого рогатого скота), характеризующееся развитием крепитирующих отеков в мышечной ткани, хромотой и быстрой гибелью. Распространен

почти во всех странах мира с развитым скотоводством, встречается также и в нашей стране. Вызывается *S. chauvoei*.

Морфология. Возбудитель эмфизематозного карбункула - это прямые или слегка изогнутые с закругленными концами палочки шириной 0,6-1,0 мкм и длиной 2-8 мкм. В препаратах из тканей располагаются одиночно, парами, очень редко по 3-4, нитей не образуют. Микроб обладает значительным полиморфизмом, особенно в мазках из животных тканей, где нередко приобретает форму веретена, лимона, груши, шара и т. д. Капсулы не имеет, подвижный (перитрих). В организме и внешней среде образует центрально и субтерминально расположенную спору. По Граму в молодых культурах и препаратах из тканей красятся положительно, в старых культурах - отрицательно.

Культивирование. *S. chauvoei* - строгий анаэроб, требует создания вакуума не менее 8-15 мм ртутного столба. Для культивирования применяют специальные среды: среду Китта-Тароцци, бульон Мартена, мозговую среду, полужидкий агар, глюкозо-кровяной агар, глюкозный агар с 10-12% бычьей сыворотки. Оптимальные значения pH 7,2-7,6, температуры 36-38°C, рост возможен и при 14°C. В среде Китта-Тароцци уже через 12-24 ч дает пышный рост с газообразованием и легким помутнением, на 2-3-и сут среда светлеет и на дно выпадает рыхлый беловатый осадок, аналогично растет и в бульоне Мартена. Молодые культуры запаха не издают, в старых обнаруживается запах прогорклого масла. При росте в мозговой среде почернения не наступает. В глубине сывороточного агара растет в форме чечевицеобразных или круглых колоний с нежными отростками. На пластинке глюкозо-кровяного агара Цейслера через 24-48 ч инкубирования вырастают круглые, в виде перламутровой пуговицы или в форме виноградного листа, плоские, с ровным краем и приподнятым центром колонии, окруженные зоной прозрачного гемолиза.

Биохимические свойства. Синтезирует протеазу, медленно разжижающую желатин; свернутую сыворотку и яичный белок не разжижает; коагулирует молоко на 3-6-е сут роста, сгусток его имеет вид мягкой губчатой массы, пептолизация сгустка не наступает. Индол не образует, большинство штаммов продуцируют незначительное количество сероводорода, нитраты в нитриты не редуцируют. Каталазу и лецитиназу не вырабатывает. Расщепляет с образованием кислоты и газа глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, галактозу, левулезу и не разлагает маннит, салицин, глицерин, дульцит и инулин. Отношение разных штаммов к сахарам непостоянно, однако реакции на сахарозу и салицин являются индикаторными: *S. chauvoei* в отличие от *S. septicum* ферментирует сахарозу и не сбраживает салицин.

Токсинообразование. *S. chauvoei* синтезирует и выделяет экзотоксин. Образование его происходит как в организме, так и при выращивании микроба в жидких питательных средах. В составе токсина обнаружены гемотоксический и некротизирующий компоненты. Токсин обладает антигенной функцией и при обработке формалином переводится в анатоксин.

Антигенная структура. Выделены термостабильный соматический О-антиген и термолабильный жгутиковый Н-антиген. Они обладают видовой специфичностью и являются общими у всех штаммов.

Устойчивость. Вегетативная форма *S. chauvoei* малоустойчива к воздействию различных факторов внешней среды, споры же весьма резистентны. В гниющих трупах споры сохраняются до 3 мес, в навозе с примесью крови и остатками тканей до 6 мес, а на дне водоемов неблагоприятных территорий - свыше 10 лет. В кислых почвах, бедных органическими веществами, споры погибают значительно раньше. Имеются предположения, что в почве споры сохраняют жизнеспособность до 20-25 лет. При соответствующих условиях в почве могут вегетировать и размножаться. Споры *S. chauvoei* в гниющих мышцах погибают через 6 мес, в высушенных мышцах выдерживают кипячение до 6 ч, а в свежем мясе - до 2 ч, в солонине сохраняются более 2 лет. В высушенном состоянии споры теряют жизнеспособность при нагревании до температуры

100-105°C за 2-12 мин, при 80°C - через 2 ч, но не разрушаются текучим паром на протяжении 40-50 мин. Прямые солнечные лучи убивают их через 24 ч. На споры возбудителя губительно действует 3%-ный раствор формалина в течение 10-15 мин, 3%-ный фенол действует слабо. В 6%-ном растворе гидроокиси натрия они погибают через 6-7 дней, в 12%-ном растворе - через 24 ч, а в 25%-ном - через 14 ч, но в подогретом до 40°C - через 50 мин.

Патогенность. В естественных условиях - преимущественно более крупный рогатый скот и овцы. Редкие случаи заболевания наблюдают у коз, буйволов, оленей и лосей. Наиболее восприимчив молодняк крупного рогатого скота в возрасте от 3 мес до 4 лет. Животные старше 4 лет резистентны за счет иммунизирующей субинфекции, телята до 3-месячного возраста - благодаря колостральному иммунитету. Племенные животные, особенно мясных пород, более восприимчивы, чем степной и рабочий скот. Независимо от породы повышенной чувствительностью обладают упитанные животные: их мышечная ткань содержит больше гликогена, необходимого для развития микроба. Из лабораторных животных наиболее восприимчивы морские свинки, они гибнут через 16-48 ч с момента заражения.

Возбудитель эмкара обладает ферментами патогенности. К ним относятся дезоксирибонуклеаза (фактор бета), гиалуронидаза (фактор гамма), токсическим компонентом является и фактор дельта - кислородолабильный гемолизин; лецитиназу не содержит.

Патогенез. Заражение происходит при попадании спор в пищеварительный тракт с кормом и питьевой водой. Проникновению спор способствуют травмы слизистой оболочки, в том числе и микротравмы. Личинки оводов, мигрируя из пищеварительного канала в мышцы, способствуют внедрению возбудителя эмфизематозного карбункула и создают условия для его размножения. Возбудитель может проникать также через ранки на поверхности тела, среди которых важная роль отводится укусам кровососущих насекомых. С током крови возбудитель попадает в мышцы и места, наиболее благоприятные для его развития гематомы, разможенные и разорванные ткани, участки некроза. Первичный очаг инфекционного процесса возникает после короткого инкубационного периода и имеет тенденцию к бурному развитию. В местах оседания микробы интенсивно размножаются, выделяют токсин и образуют газ. Компоненты токсина подавляют фагоцитоз, вызывают нарушение целостности кровеносных сосудов и другие повреждения, ведущие к отеку и некрозу тканей, газы же обуславливают крепитацию образовавшихся отечных припухлостей. Продукты распада тканей и токсины возбудителя являются причинами развития лихорадки, нарушения сердечной деятельности и расстройства дыхания. Перед гибелью животных резко повышается концентрация микробов в тканях и отмечается бактериемия. Инфекционный процесс может протекать и без образования карбункула в виде сепсиса.

Лабораторная диагностика. Материалом для лабораторного диагноза служат кусочки пораженных мышц, отечный экссудат, кровь, взятые тотчас после гибели животного. Вскрытие трупов животных, погибших от эмфизематозного карбункула, запрещено (почвенная инфекция). Поэтому кусочки мышц отбирают без полного вскрытия трупа. Если же труп случайно вскрыт, берут кусочки паренхиматозных органов. Исследование проводят по схеме: микроскопия мазков, посевы на питательные среды в анаэробных и аэробных условиях и заражение лабораторных животных.

Иммунитет и средства профилактики. В результате переболевания животные приобретают длительный активный иммунитет. Иммунитет при эмфизематозном карбункуле антитоксический и антимикробный. Для иммунизации используют: концентрированную гидроокисьалюминиевую формолвакцину против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец, живую вакцину из штамма № 2/14; ассоциированную живую вакцину против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула.

2. Наименование вопроса №2.

Столбняк – это остро протекающая инфекция, характеризующаяся повышенной возбудимостью и судорожным сокращением всей мускулатуры тела или отдельных групп мышц под воздействием столбнячного токсина, образующегося в месте проникновения возбудителя в организм.

Инкубационный период при столбняке от 3 дней до 3 нед. Заболевание протекает чаще остро. У лошадей отмечают напряженную походку, ригидность жевательных мышц, неподвижность ушных раковин, затрудненный прием и проглатывание корма и выпадение третьего века. Дыхание становится частым и поверхностным, мышцы твердыми, хвост приподнят, живот подтянут, вдоль реберной дуги образуется запальный желоб, кал и моча выделяются с трудом. У крупного рогатого скота отмечают тимпанию, тонические судороги, ходульную походку, усиленное потоотделение. У овец и коз наблюдаются судорожные сокращения мышц шеи, запрокидывание головы на спину. У свиней поражаются обычно только мышцы головы: глазные яблоки повернуты наружу, третье веко выпадает, углы рта оттянуты назад. Продолжительность болезни 3-6 дней. Температура нормальная, но перед смертью повышается до 42-43 °С. Летальность от 45 до 100 %.

Возбудитель столбняка - *Clostridium tetani*. Открыт в 1883 г. русским хирургом Нестором Монастырским и в 1884 г. немецким медиком Артуром Николайером, выделен в чистую культуру в 1889 г. японским бактериологом Китасато Сибасабуро.

Морфология. *Clostridium tetani* – грамположительные прямые палочки длиной 4-8 мкм и толщиной 0,3-0,8 мкм, располагаются одиночно или цепочками. Образуют споры круглой формы, расположенные терминально, палочка со спорой имеет вид барабанной палочки. Перитрихи, капсулу не образуют.

Культивирование. Облигатные анаэробы, культивируются в бескислородных условиях на агаре Цейсслера, образуют прозрачные или несколько сероватые колонии с зоной гемолиза. В высоком столбике агара *C. tetani* дают колонии двух видов: похожие на пушинку с плотным центром (S-форма) и чечевицепоподобные (R-форма). В среде Китта–Тароцци эти анаэробы образуют равномерную муть.

Биохимические свойства. *C. tetani* не обладают сахаролитическими ферментами, не образуют каталазу и оксидазу, протеолитические свойства слабо выражены.

Антигенные свойства. Возбудитель имеет О- и Н-АГ. По Н-Аг делятся на 10 сероваров, но все они *продуцируют идентичный по АГ свойствам экзотоксин*.

Токсигенные свойства. Столбнячный токсин относится к экзотоксинам и состоит из 2 фракций: 1) тетаноспазмина (со свойствами нейротоксина, который поражает двигательные клетки центральной нервной системы и вызывает сокращение поперечно-полосатых мышц); 2) тетаногемолизина (лизирующего эритроциты). Экзотоксин является одним из сильнейших бактериальных ядов, уступая по силе лишь ботулиническому токсину. Он быстро разрушается под влиянием нагревания, солнечного света, щелочной среды. Ферменты и энзимы желудочно-кишечного тракта не разрушают токсин, но он не всасывается через слизистую оболочку кишечника.

Устойчивость во внешней среде. Споры устойчивы к высушиванию: на кусочке дерева сохраняются до 11 лет, при кипячении погибают через 1—3 ч, раствор сулемы (1:100) убивает их тоже через 3 ч. Споры столбняка обезвреживаются 1%-ным раствором азотнокислого серебра за 1 мин., 0,5%-ной соляной кислотой — через 30 мин, 5%-ным раствором карболовой кислоты - через 15 мин, 3%-ным раствором формалина - через 24 ч.

Патогенность и патогенез. Наиболее чувствительны к столбняку овцы, козы, лошади и свиньи. Смертность у овец и коз может достигать 90-100 %, у лошадей – 75-90, у крупного рогатого скота – 50-60 %. Возбудитель проникает в организм при различных ранениях. При наличии анаэробных условий в месте внедрения возбудителя он размножается с выделением нейротоксина, который с кровотоком или по нервным стволам проникает в спинной и продолговатый мозг. Под влиянием токсина повышается

рефлекторная возбудимость и появляются длительные (тетанические) судороги, которые затрудняют передвижение, прием корма, работу сердца, легких и т.д. Гибель животного наступает в результате паралича дыхательного центра и сердца, асфиксии и нарушения кровообращения.

Лабораторная диагностика. Лабораторная диагностика столбняка основана на результатах бактериологического исследования, которое включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, биохимическим и токсигенным свойствам.

Иммунитет и иммунопрофилактика. Иммунитет антитоксический. Для активной иммунизации животных используют концентрированный столбнячный анатоксин. Пассивную специфическую профилактику осуществляют использованием антитоксической противостолбнячной сыворотки.

3. Наименование вопроса №3.

Ботулизм - это остро текущий кормовой токсикоз, возникающий вследствие поедания кормов, содержащих токсин возбудителя. Заболевание проявляется параличом мышц глотки, языка, нижней челюсти и скелетных мышц. К ботулизму восприимчивы многие виды животных, в том числе птицы. Инкубационный период при ботулизме от нескольких часов до двух недель. Болезнь может протекать молниеносно, остро, подостро и реже – хронически. У лошадей и крупного рогатого скота молниеносное течение характеризуется внезапной гибелью животных без каких-либо признаков болезни. Острое течение (длится от 1 до 4-х дней) проявляется беспокойством, снижением рефлекторной чувствительности, нарушением координации движений, гиперемией или желтушностью видимых слизистых оболочек. Наблюдается слюнотечение, паралич нижней челюсти и языка, который выпадает изо рта. Летальность 90-95%. При подостром (до 7 дней) и хроническом (до 3-4 нед.) течениях болезни клинические признаки выражены слабее. У овец отмечают нарушения координации движений, изгибание шеи, паралич языка и слюнотечение (при остром течении). Свиньи болеют редко. У них отмечают обильное слюнотечение, нарушения координации движений, слепоту, паралич жевательных мышц и глотки.

Возбудитель ботулизма — *Clostridium botulinum*, открыт в 1896 г. Ван Эрменгемом, который выделил его из зараженной ветчины, а также селезенки человека, погибшего от ботулизма.

Морфология. *C. botulinum* в окрашенных препаратах имеет вид палочек с закругленными концами длиной 4-9 и ширине 0,6-0,8 мкм. Бактерии располагаются изолированно или парам иногда в виде коротких цепочек. Микроб подвижен (перитрих) большинство клеток из старых культур без жгутиков. Образует споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально. Молодые культуры окрашиваются грамположительно, 4-5-суточные — грамотрицательно.

Культивирование. Строгие анаэробы. Оптимум pH для роста 7,3-7,6, для прорастания спор 6,0-7,2. На глюкозо-кровяном агаре образуют очень мелкие сероватые или мутные желтоватые колонии линзообразной формы (на различных средах у одного и того же штамма могут варьировать). Вокруг колонии образуются зоны гемолиза различной ширины. Хорошо растут на жидких средах (обычно на бульоне Тароцци, бульонах из гидролизатов казеина, мяса или рыбы) при условии предварительного удаления O₂ из среды кипячением в течение 15-20 мин с быстрым охлаждением. Вызывают помутнение среды и газообразование, иногда имеется запах прогорклого масла, но этот признак непостоянен.

Биохимические свойства. Все типы *Clostridium botulinum* образуют желатиназу, лецитиназу и H₂S, проявляют широкий спектр сахаролитической активности (бактерии типов А, В, Е и F ферментируют глюкозу, левулезу, фруктозу, мальтозу и сахарозу типов С и D - глюкозу и мальтозу, тип G инертен к углеводам). *Clostridium botulinum* типов А и

В обладают выраженными протеолитическими свойствами, разлагают свернувшийся яичный белок и гидролизуют желатин

Антигенный состав. Серологическая идентификация *Clostridium botulinum* основана на выявлении токсинов, по их структуре бактерии разделяют на 7 сероваров - А, В, С, D, Е, F и G. Антигенная структура бактерий остается малоизученной, показано наличие жгутиковых, группоспецифических (H) и соматических, типоспецифических (O) АГ, не проявляющих токсических свойств.

Токсинообразование. Оптимальная температура для токсинообразования переменна для бактерий типов А, В, С и D 35°C, для бактерий типов Е и F 28-30°C. Ботулотоксин - один из сильнейших известных в природе ядов, его смертельная доза для человека составляет около 0,3 мкг. Это белок, оказывающий нейротоксическое действие. Механизм биологической активности реализуется через связывание Н-цепи с мембраной, проникновение токсина в клетку, формирование пор в пузырьках (каждую пору формируют 4 молекулы токсина), что приводит к блокированию слияния синаптических пузырьков с мембраной. Токсин разрушается при кипячении, легко кристаллизуется в белый хлопьевидный порошок. Токсины всех типов также оказывают гемолизирующее действие.

Патогенность. Патогенность *Clostridium botulinum* различна для различных видов млекопитающих; заболевания человека вызывают бактерии типов А, В, Е и F; *Clostridium botulinum* типов С и D вызывают заболевания животных и птиц (в редких случаях от больных животных выделяют бактерии типов А и В). Патогенность типа G для человека и животных не доказана.

Патогенез. Попавший с кормом токсин всасывается через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта и в больших количествах накапливается в тканях легких, печени и сердца, в желчи, моче и мозге. Ботулинический токсин является нейротоксином. В результате расстройства под его влиянием деятельности коры головного мозга развиваются параличи мышц глотки, языка, нижней челюсти, нарушения движения, параличи дыхательных мышц, асфиксия и смерть животного.

Лабораторная диагностика. Основана на результатах бактериологического исследования, которое включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии и его токсина методом биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и токсигенным свойствам. Материал для исследования: пробы корма, вызвавшего отравление; от павших животных - содержимое желудка, кишечника, кусочки печени, селезенки; от больных животных - кровь.

Иммунитет и иммунопрофилактика. Иммунитет антитоксический. Внутривенно вводят противоботулиновые антитоксические моно- или поливалентные сыворотки. Специфическую профилактику ботулизма у животных, кроме норки, не проводят.

1.5 Лекция № 5 (2 часа)

Тема: «Возбудители эшерихиоза и сальмонеллеза»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Определение заболевания. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя колибактериоза. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде.

Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика колибактериоза.

2 Характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств сальмонелл. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика. Иммунитет и иммунопрофилактика сальмонеллеза.

1.16.2. Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

Эшерихиоз - (колибактериоз, колисептицемия, колиэнтерит, колиинфекция) – это остропротекающее инфекционное заболевание новорожденных животных в возрасте от 1 до 10 дней, болезнь характеризуется диареей, нарастающими симптомами интоксикации, сильным обезвоживанием организма и гибелью животных. У поросят отъемного возраста кишечная палочка вызывает отечную болезнь поросят, которая характеризуется летальностью в 100 случаев.

Классификация возбудителя. Возбудитель относится к семейству Enterobacteriaceae, роду *Escherichia*, виду - *Escherichia coli*. Впервые возбудителя инфекции выделил в 1885 году Теодор Эшерих из фекалий ребенка.

Морфология возбудителя. По морфологии *Escherichia coli* представляет собой полиморфную палочку с закругленными краями. Её размеры составляют в длину 1-3 мкм в ширину 0,5-0,6 мкм, окрашивается грамотрицательно (Гр-). Форма бактерий может изменяться и принимать вид коккобактерий. Спор не образует. Капсулу образуют только особо вирулентные штаммы бактерий 08, 09, 0101. На поверхности клеток имеются жгутики, а также реснички-пили. В организме зараженного животного возбудитель образует микрокапсулу, которую не всегда отчетливо видно при микроскопии.

Культуральные и биохимические признаки. Кишечная палочка является факультативным аэробом. Оптимальная температура для культивирования 30-37°C, pH 7,2-7,5. Она хорошо растет при комнатной температуре на обычных питательных средах (МПА, МПБ, МПЖ, агар Эндо и др.). Температурный диапазон составляет 1-45°C. На МПА через 24 часа образует характерные плоско-выпуклые колонии мелкого и среднего размера (2-3 мм) с ровным краем (S-форма), с блестящей поверхностью, полупрозрачные, сероватого цвета. При длительном выращивании на искусственных питательных средах возникает диссоциированная форма (R-форма с шероховатым краем), сопровождающаяся утратой типичных свойств морфологических, культуральных и даже антигенных свойств. На МПБ образует обильный рост и пристеночное кольцо. На среде Эндо образуются малиновые колонии с металлическим блеском. Биохимическая у эшерихий достаточно высокая. Они ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, манит, дульцит, арабинозу, сорбит и ксилозу, свертывает молоко. Не разжижает желатину, на белковых средах образует индол, не разлагает мочевины. Среди патогенных штаммов кишечной палочки встречаются гемолитические штаммы, которые разрушают эритроциты млекопитающих различных видов.

Антигенная структура. Общепризнанная серологическая классификация эшерихий, разработанная Ф. Кауфманом (1954), основана на анализе О-, К- и Н-антигенов.

В 1963 году было известно 146 вариантов О-антигена, 88 вариантов К-антигена, к концу 80-х годов у эшерихий насчитывалась 171 серологическая разновидность О-антигена, более 100 разновидностей К-антигена и 60 разновидностей Н-антигена.

По последним данным установлено 173 О-серогруппы и 56 типов К-антигена *E.coli*, а также около 80 типов Н-антигена, однако лишь незначительная часть сероваров этих бактерий способна вызывать кишечные инфекции у животных и человека. О-антиген - термостабильный соматический, не разрушается при температуре 100°C в течение 2,5 ч и от действия алкоголя, сохраняя антигенную и агглютинирующую способность. По химической природе он представляет липополисахаридно-белковый комплекс, который определяет серогрупповую специфичность штаммов и содержится в клеточной стенке. Разные серологические группы эшерихий отличаются друг от друга по составу концевой углевода полисахарида. К-антигены - поверхностные оболочечные или капсульные, обозначаемые латинскими буквами L, В и А. Большая часть их - кислые полисахариды, но имеются штаммы белковой природы (L-антигены) или различного химического состава. L-антигены термолабильны, разрушаются при 100°C в течение одного часа. В-антиген термолабилен, при 100°C утрачивает антигенные свойства, но сохраняет агглютинабельность в отличие от L-антигена. А-антиген (капсульный) представляет собой

полисахаридное соединение, термостабильный, при 100°C не разрушается в течение 2,5 ч, автоклавирование культуры эшерихий, содержащей А-антиген, при 1 атм (120°C) в течение 2 ч приводит к потере его антигенных свойств, но его агглютинирующая способность сохраняется. Помимо указанных К-антигенов некоторые штаммы эшерихий образуют адгезивные антигены, за счет которых они прикрепляются к клеткам энтероцитов ворсинок слизистой оболочки кишечника и колонизируются (размножаются) в них. Наличие антигена адгезии характеризует патогенность штамма. Адгезивные антигены имеют белковую природу, являются термолабильными и разрушаются при прогревании культуры бактерий в течение 1 ч при 100°C, теряя антигенные и агглютинабельные свойства. Обозначаются эти антигены латинскими буквами и арабскими цифрами. Н-антиген (жгутиковый) содержится у подвижных штаммов эшерихий, термолабильный, белковой природы. Один и тот же Н-антиген может встречаться у бактерий разных серогрупп. Поверхностные (L,В,А) антигены препятствуют агглютинации бактерий соответствующей О-сывороткой, поэтому при серогрупповой типизации культур эшерихий их подвергают термической обработке: прогреванию в водяной бане или автоклавированию. Сочетание О-, К- и Н-антигенов характеризует серологический вариант бактерий (серовар).

Согласно международным правилам о порядке размещения символов в антигенной формуле эшерихий, на первом месте указывается тип О, на втором - К и на третьем - тип Н-антигена. В антигенной формуле эти типы антигенов разделяются между собой двоеточием и каждый из них имеет порядковый номер, обозначаемый арабскими цифрами.

Ведущая роль в развитии диареи новорожденных поросят, телят и ягнят принадлежит энтеротоксигенным штаммам эшерихий с адгезивными антигенами K88, K99, 987P, F41, F18, A20, AI25.

Устойчивость. Во внешней среде *Escherichia coli* переживает в течение 3-4 месяцев. Низкие температуры консервируют возбудителя в течение 1 года (-20°C). При нагревании до +55°C - выживает в течение часа, +60°C - выживает в течение 15 минут. Дезосредства инактивируют *Escherichia coli* в течение 1 часа: 5-10% раствор хлорной извести, 4% раствор едкой щелочи, 5% раствор карболовой кислоты.

Патогенность. В естественных условиях к колибактериозу восприимчивы телята, поросята, ягнята, жеребята, цыплята, а также грудные дети.

Наиболее существенными факторами патогенности кишечных бактерий следует считать энтеротоксигенность, адгезивность, инвазивность. Энтеротоксигенность - способность бактерий продуцировать энтеротоксины, которые повреждают кишечный эпителий, проникают в кровь и через неё в различные органы и ткани, обуславливая токсикоз.

Инвазивность - проникновение бактерий в кишечный эпителий с последующим их внутриэпителиальным размножением или прохождением через него без колонизации с последующим развитием генерализованного процесса (септицемии).

Адгезивность - образование антигенов адгезии, располагающихся на поверхности оболочки клетки в форме ресничек (получивших название фимбрий, пили), свойства которых изложены ниже. В зависимости от факторов патогенности и механизма их патогенетического воздействия на макроорганизм, патогенные для животных и человека эшерихии могут быть разделены на две группы. Первую группу составляют инвазивные штаммы, вызывающие синдром диареи (энтероколиты). Во вторую группу входят неинвазивные формы, характеризующиеся двумя особенностями: 1) они размножаются и колонизируются в области тонкого кишечника и 2) продуцируют один или более энтеротоксинов. У штаммов второй группы токсин, вызывающий развитие патологического процесса, не имеет прямого отношения к первой стадии взаимодействия микроба с клетками эпителия кишечника. Эта стадия осуществляется адгезинами, расположенными на поверхности клетки. При колонизации слизистой оболочки эшерихий обнаруживаются по всей поверхности ворсинок эпителия от вершины до основания и

даже на краевых щетинках, в то время как неэнтеротоксигенные штаммы, как правило, остаются в просвете кишечника. Наиболее изученными адгезинами, образуемыми эшерихиями и вызывающими заболевания у молодняка животных, являются K88, 987P, K99, F41. Адгезины K88 и 987P обнаружены у штаммов, вызывающих чаще диарею у поросят, адгезии K99 - у штаммов, выделенных от телят, ягнят и поросят. Адгезии F41 свойственен штаммам, патогенным для телят. Адгезии K88 представляет собой фибриллы длиной 0,1-1 мкм и диаметром 2,1 нм.).

Кроме адгезинов, в адгезии энтеропатогенных *E. coli* с клетками тканей животных и человека участвуют электростатические связи и фактор гидрофобного взаимодействия. Все энтеропатогенные штаммы, продуцирующие какой-либо вид адгезинов, вырабатывают один или два вида энтеротоксина - термолабильного (ЛТ) и термостабильного (СТ). Наиболее чувствительной к действию энтеротоксина является передняя часть тонкого отдела кишечника, в которой энтеропатогенные эшерихии колонизируются на слизистой оболочке. Все энтеротоксины энтеробактерий по характеру их специфического действия на клеточные элементы кишечника организма хозяина разделили на цитотонины и цитотоксины. Первые не изменяют клеточные структуры, вторые их разрушают. Наиболее часто диарея вызывается в результате воздействия термолабильного (ТЛ) энтеротоксина.

Патогенез. У каждого вида животного имеются определенные серологические группы возбудителей колибактериоза. Развитию колибактериоза способствует неполноценное молоко, бедное витаминами и специфическими антителами. Возбудитель проникает в организм новорожденных животных аэрогенно, перорально, алиментарно. Инкубационный период короткий от нескольких часов, но никогда не превышает 3 дней.

Лабораторная диагностика. Для прижизненной диагностики направляют кровь или фекальные пробы. Для посмертной диагностики в лабораторию направляют кусочки внутренних паренхиматозных органов: печени, селезенки, легкого, сердца, а также лигированного участка тонкого отдела кишечника, трубчатую кость. Схема лабораторной диагностики предусматривает 4 метода исследования: микроскопического, бактериологического, биологического и серологического.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевшего молодняка вырабатывается гуморальный (типоспецифический иммунитет), а также клеточный-фагоцитарный и местный иммунитет в органах и тканях. Переболевший молодняк в течение 3-5 лет является бактериовыделителем. Молодняк родившийся от вакцинированных маток с первыми порциями молока получает колостральный иммунитет. Для иммунизации используют: вакцину поливалентную гидроокисьюалюминиевую формолтиомерсальную против колибактериоза (эшерихиоза) поросят, телят и ягнят; вакцину поливалентную против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей. Для лечения: коли-протектан ВИЭВ; сыворотку поливалентную против колибактериоза сельскохозяйственных животных.

2. Наименование вопроса №2.

Сальмонеллезы - группа инфекционных болезней преимущественно молодняка с.х. животных и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой и профузным поносом, при хроническом - воспалением легких. У взрослых животных болезнь может протекать бессимптомно (сальмонеллоносительство), а у беременных самок возможны аборт. У человека могут возникать пищевые токсикоинфекции при употреблении продуктов, содержащих токсины сальмонелл.

Американские ветеринарные врачи Сальмон и Смит в 1885 г. выделили из органов свиней, павших от чумы, микроб, названный позже *Bad. suipestifer*. В 1888 г. Гертнер при выяснении этиологии отравлений людей обнаружил один и тот же микроб в мясе коровы и селезенке умершего человека. Он был назван *Bact. enteritidis*. В 1892 г. Леффлер выделил от павших мышей микроб, получивший название *Bact. typhimurium*. В честь

Сальмона микроорганизм, выделенный им, был назван сальмонеллой, а пищевое отравление, вызываемое микробом, - сальмонеллезом.

В настоящее время известно более двух тысяч серовариантов сальмонелл, объединенных в один род - *Salmonella*. Род включен в семейство *Enterobacteriaceae*.

Классификация возбудителей: сем. *Enterobacteriaceae*, род: *Salmonella*, вид сальмонелл, к которому относятся сероварианты, имеющие наибольшее значение в патологии животных и птиц – *S. enterica*:

S. enteritidis (dublin) - у телят,

S. choleraesuis (suipestifer) - у поросят,

S. typhimurium - у свиней,

S. typhimurium - у телят поросят, водоплавающей птицы,

S. abortus equi - аборт кобылы,

S. abortus ovis - у овец,

S. pullorum (*S. gallinarum*) - у птиц.

Морфология. Сальмонеллы - мелкие палочки с закругленными концами длиной 1-4 и шириной 0,3-0,8 мкм. В мазках располагаются одиночно, беспорядочно, подвижны (за исключением *S. pullorum-gallinarum*), спор и капсул не образуют, по Граму окрашиваются отрицательно

Культуральные свойства. Сальмонеллы - аэробы и факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста 37 °C, pH среды 7,0-7,2, однако могут расти и при pH ниже 7,0, до 8,0 и выше. Хорошо растут на обычных питательных средах МПА, МПБ, средах Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агаре и др. На МПА образуют небольшие, диаметром 1-2 мм, круглые колонии с ровными краями, серо-белого цвета с голубоватым оттенком. У некоторых видов сальмонелл по краю колонии заметен выпуклый слизистый вал. На среде Эндо колонии прозрачные, бледно-розового цвета, на среде Левина - прозрачные с голубоватым оттенком, на среде Плоскирева - бесцветные, слегка мутноватые, на висмут-сульфитном агаре - черного цвета с металлическим блеском. В МПБ - слабое помутнение, на дне пробирки осадок серо-белого цвета, на поверхности среды в старых культурах иногда тонкая пленка или пристеночное кольцо.

Биохимические свойства. Сальмонеллы не ферментируют сахарозу, не разлагают лактозу, адонит, не расщепляют салицин и мочевины, не образуют индола, образуют сероводород; реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, реакция с метиловым красным - положительная. Глюкозу ферментируют все виды (серовары) сальмонелл с образованием газа и кислоты или только кислоты без газа. Большинство сальмонелл ферментируют маннит. Биохимическая активность у сальмонелл различных сероваров варьирует.

Антигенная структура. Представлена соматическим, или О-антигеном и жгутиковым, или Н-антигеном. О-антиген расположен на поверхности микробной клетки и представляет собой термостабильный фосфолипидно-полисахаридный комплекс, не разрушающийся при кипячении в течение двух часов.

Н-антигены обладают как специфическими свойствами, характерными для определенного вида (антигены первой фазы), так и неспецифическими (антигены второй фазы). Если сальмонеллы содержат оба жгутиковых антигена, их называют двухфазными, если один - однофазными. На основании общности соматических О-антигенов сальмонеллы объединены в серологические группы, которые обозначены прописными буквами латинского алфавита: А, В, С, D и др. Всего установлено свыше 60 серологических групп. В лабораториях используют диагностическую схему Кауфмана-Уайта, построенную на анализе О- и Н-антигенов. В соответствии с особенностями антигенной структуры каждая группа объединяет большое количество сероваров, расположенных в алфавитном порядке по обозначению первой фазы их Н-антигена. При этом первая фаза обозначается строчными буквами латинского алфавита (a, b, c, d, e и т. д.), вторая фаза - арабскими цифрами или латинскими буквами (1, 2, 5, 6; e, d и т. д.).

Для определения серовара сальмонелл биофабрики выпускают поливалентные О-сыворотки (8), О-моносыворотки, а также монорецепторные Н-сыворотки (32), которые используют в реакции агглютинации на стекле, с живыми суточными культурами на плотной питательной среде.

Устойчивость. Сальмонеллы устойчивы к воздействию факторов внешней среды. При 60оС погибают в течение 1 ч, при 100оС - моментально. В сухой почве сохраняются от 145 до 270 суток, в высушенном навозе от 1 до 1,5 лет, в трупах - до 100 суток, в открытых водоемах и питьевой воде - от 11 до 120 суток, в замороженном мясе - от 6 месяцев до 3 лет, в колбасных изделиях - от 60 до 130 суток, в скорлупе яиц - до 3 месяцев, в яичном порошке - до 9 месяцев, на замороженных овощах и фруктах - от 2 недель до 2,5 мес. Обычное копчение (в домашних условиях) не убивает сальмонелл. В соленом мясе сохраняются 4-8 мес. При воздействии прямых солнечных лучей погибают через 5-9 ч. Дезинфицирующие вещества (2%-й раствор фенола, 3%-й раствор гидроксида натрия, хлорсодержащие растворы с 5 % активного хлора, 3%-й раствор формальдегида) убивают сальмонелл в течение 15-20 мин. Сальмонеллы чувствительны к гентамицину, неомицину, тетрациклам, левомицетину, стрептомицину, менее чувствительны к сульфаниламидным и нитрофурановым препаратам.

Патогенность. Патогенные свойства сальмонелл обуславливают два вида токсинов: экзотоксин и эндотоксин. Экзотоксины - продукты жизнедеятельности, активно (при жизни) продуцируемые в окружающую среду. Эндотоксин образуется в результате лизиса клеток. Основной компонент эндотоксина - полисахарид. Молекула его состоит из двух компонентов: полисахарида и липида А, который определяет токсичность всей молекулы. Эндотоксины вызывают геморрагическое воспаление кишечника, кормовое отравление у свиней и плотоядных. Экзотоксины - яды исключительно высокой активности; избирательно поражают отдельные органы и ткани.

Патогенез. Основные пути заражения - алиментарный и аэрогенный, возможно внутриутробное и трансвариальное заражение у птиц. Сальмонеллы вначале размножаются в тонких кишках, затем через кишечные ворсинки проникают в лимфатическую систему, кровь, током крови разносятся в паренхиматозные органы, где размножаются. При гибели бактерий высвобождаются эндотоксины, вызывающие воспалительные, дистрофические, некробиотические и другие изменения в тканях органов и кровоизлияния в них, последние отмечаются и на серозных покровах и в слизистых оболочках кишечника и мочевого пузыря. Больные животные выделяют сальмонеллы в основном с фекалиями и мочой, птицы - с пометом, яйцами.

Лабораторная диагностика. Бактериологическая прижизненная диагностика основана на исследовании крови в первые дни заболевания, истечений из родовых путей и фекалий. У птиц при жизни исследуют кровь со специфическим антигеном в пластинчатой РА. Посмертно в лабораторию направляют свежий трупы мелких животных и птиц, от трупов крупных животных - паренхиматозные органы или части их (печень с желчным пузырем), селезенку, почку, мезентериальные лимфатические узлы, трубчатую кость, от телят - измененные участки легких; в случае аборта - свежий плод. Полученный материал высевают в МПБ, на МПА и дифференциальные среды - Эндо, Плоскирева или висмут-сульфит агар, а при подозрении на хроническое течение болезни дополнительно на одну из сред накопления (селенитовую, Мюллера и др.). Полученные на средах культуры дифференцируют и идентифицируют на основании морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств согласно существующим наставлениям.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет после переболевания гуморального и клеточного типа. Для лечения и профилактики используют: концентрированную формолквасцовую вакцину против паратифа (сальмонеллеза) телят готовят из селекционированного штамма *S. dublin*; вакцину против паратифа (сальмонеллеза) поросят готовят из трех штаммов в соотношении: *S. choleraesuis* - 50 %, *S. typhimurium* - 25 %, *S. dublin* - 25 %.; формолтиомерсальную вакцину против

колибактериоза и паратифа пушных зверей, птиц, телят и поросят; сухую живую вакцину против паратифа свиней из штамма ТС-177; вакцину против сальмонеллеза телят из аттенуированного штамма *S. dublin* № 6; вакцину живую сухую против сальмонеллеза водоплавающей птицы; вакцину формолтиомерсальную поливалентную против сальмонеллеза овец; поливалентную антитоксическую сыворотку против паратифа и колибактериоза телят, ягнят, овец и птиц.

1.6 Лекция № 6 (2 часа)

Тема: «Возбудитель бруцеллеза»

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Бруцеллез - определение заболевания, краткая характеристика болезни. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических антигенных, токсигенных свойств бруцелл.
2. Патогенность, патогенез, устойчивость их во внешней среде. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Иммуитет и иммунопрофилактика.

1.6.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1

Бруцеллез – это хроническая инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных и диких животных, человека, проявляющаяся абортами, эндометритами, расстройствами воспроизводительной функции, бурситами, артритами, рождением нежизнеспособного молодняка и рядом других признаков.

Инкубационный период при данной болезни длится от 2 до 4 недель. При отсутствии среди восприимчивого поголовья беременных животных, заболевание протекает бессимптомно (латентная форма). Диагностировать болезнь у таких животных можно лишь с помощью серологического или аллергического методов исследования. У беременных животных всех видов бруцеллез характеризуется абортами во второй половине беременности. Коровы abortируют чаще на 5 - 8 месяце, овцы и козы - на 3 - 5 месяце беременности. Свиноматки могут abortировать как в первой, так и во второй половине супоросности, собаки - на 40-50-й день. У крупного рогатого скота и овец повторные abortы наблюдают редко. Abortы, как правило, сопровождаются задержанием последа и развитием слизисто-гнойного, а позже гнойно-фибринозного эндометрита. Поражение половых путей влечет за собой нарушение воспроизводительной функции, что приводит к яловости, а порой и бесплодию. У отдельных особей бруцеллез может сопровождаться серозными бурситами, гигромами, артритами, тендовагинитами, и у мужских особей - орхитами и эпидидимитами со значительным увеличением семенников и опуханием мошонки. У свиней бруцеллез, кроме того, характеризуется появлением абсцессов в подкожной клетчатке в паренхиматозных органах, параличами мышц таза и конечностей, у лошадей - бурситами в области затылка и холки. У собак и кошек заболевание протекает бессимптомно и выявляется только серологическим методом. Птицы устойчивы к бруцеллезу даже при экспериментальном заражении.

Симптомы бруцеллеза у людей описал Гиппократ. Болезнь детально изучена в XVIII—XIX веках. Ф. Марстон (1861) описал бруцеллез как самостоятельное заболевание людей на острове Мальта.

Бруцеллы – возбудители бруцеллёзов человека и животных включены в род *Brucella*. Впервые возбудителя этого заболевания обнаружил Д. Брюс в 1886 г. в селезёнке умершего человека, а в 1887 г. выделил в чистой культуре. Данный вид бруцелл получил наименование *Brucella melitensis* (возбудитель мальтийской лихорадки). Другой вид возбудителя *Brucella abortus* выделил Б. Банг и Б. Стриболт из околоплодной жидкости при abortе коровы. Третий вид - бруцелл *Brucella suis* в 1914 г. Ж. Траум выделил от свиней. В 1953 г. Бадл, изучая заболевание инфекционного эпидидимита баранов,

выделил *B. ovis*. В 1957 г. Стоеннерг и Лакман из трупов древесных крыс выделили микроорганизмы, идентичные бруцеллам, назвали их *B. neotomae*. В 1966 г. К. Майкл выделил возбудитель бруцеллёза собак – *B. canis*.

В настоящее время род *Brucella* включает в себя восемь видов, но только шесть имеют значение для сельскохозяйственных животных: *B. abortus* - возбудитель бруцеллёза крупного рогатого скота; *B. melitensis* – возбудитель бруцеллёза овец и коз; *B. suis* - свиней; *B. canis* - собак; *B. neotomae* - кустарниковых крыс; *B. ovis* - инфекционного эпидимита баранов. По антигенным и биохимическим свойствам подразделяют *B. abortus* на девять биоваров, *B. melitensis* на три и *B. suis* на пять биоваров. Наибольшее значение в патологии бруцеллёза имеют бруцеллы первых трёх видов и первых биоваров.

Морфология. Бруцеллы - мелкие грамотрицательные кокковидные или палочковидные бактерии. размером 0.6-1.5 x 0.5-0.7 мкм. Жгутиков не имеют. Спор не образуют. Свежевыделенные штаммы могут образовывать нежную капсулу.

Культуральные свойства. Бруцеллы строгие аэробы. *B. abortus* и *B. ovis* в первых генерациях нуждается в повышенной концентрации (5-10%) CO₂. Бруцеллы могут расти на обычных питательных средах при 36-38°C и pH 6,8-7,2, однако для их культивирования используют специальные среды: мясопептонный печеночный бульон (МППБ), мясопептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГА), печеночно-глюкозно-глицериновый бульон и агар (ПГГБ, ПГГА) с 1 % глюкозы и 23 % глицерина, картофельный агар, сывороточно-декстрозный агар и др. Выделяемые из первичного материала бруцеллы растут очень медленно, в среднем 15-30 суток, старые лабораторные культуры вырастают уже через 24-48 ч. Вирулентные типичные штаммы (S-форма) на поверхности агара образуют мелкие, 2-3 мм в диаметре, круглые, выпуклые, с гладкой поверхностью и ровными краями, прозрачные с голубоватым оттенком колонии; в бульоне - слабое равномерное помутнение и пристеночное кольцо, в дальнейшем - небольшой осадок. Авирулентные варианты (R-форма) на агаре образуют шероховатые колонии, в бульоне - неравномерное помутнение с просветлением и крошковатым осадком. На агаре с кровью бруцеллы гемолиза не дают, пигмент не синтезируют. В жидких средах возникает равномерное помутнение. Под влиянием антибиотиков образуют L-формы.

Биохимическая активность. Биохимическая активность у бруцелл выражена слабо. Не изменяют сахара короткого пёстрога ряда. Они утилизируют углеводы, но не образуют кислоту и газ в количествах, достаточных для их идентификации. Нитраты редуцируют в нитриты. Молоко не свёртывают, желатин и свёрнутую сыворотку не разжижают. Индол не образует. Некоторые виды гидролизуют аминокислоты с образованием аммиака. Ферментируют глюкозу, арабинозу, декстрозу, леулезу и др. с образованием кислоты. *B. abortus* и особенно *B. suis* при росте выделяют сероводород; *B. melitensis* образует его в незначительном количестве на средах серосодержащими аминокислотами. Могут продуцировать каталазу, пероксидазу, липазу, фосфатазу.

Антигенный состав. Бруцеллы содержат поверхностно расположенный Vi-антиген и соматические видоспецифические антигены А и М, количественное соотношение которых различно у разных видов. У *B. melitensis* преобладают М-антигены, у *B. abortus* и *B. suis* – А-антиген. Для идентификации бруцелл по антигенным свойствам используют реакцию агглютинации с монорецепторными сыворотками.

Токсинообразование. В организме бруцеллы выделяют эндотоксины.

3. Наименование вопроса №3.

Устойчивость во внешней среде. Бруцеллы характеризуются большой устойчивостью к действию факторов окружающей среды. Они длительно сохраняют жизнеспособность при низкой температуре. В почве, моче, испражнениях животных, больных бруцеллёзом, в навозе, сенной трухе возбудители выживают 4-5 мес., в шерсти овец – 3-4 мес., в пыли – 1 мес. Длительно сохраняются в молоке и молочных продуктах, приготовленных без дополнительной термической обработки (в брынзе, масле остаются

жизнеспособными в течение 4 мес.), в замороженном мясе – до 5 мес. К высокой температуре и дезинфицирующим веществам бруцеллы высокочувствительны: при 60°C погибают за 30 мин., при кипячении – мгновенно. Все дезинфектанты губят бруцелл в течение нескольких минут.

Патогенность. К бруцеллезу восприимчивы крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, олени, маралы, яки, буйволы, лошади, верблюды, собаки, кошки, зайцы, сайгаки, лисицы, грызуны, дикие кабаны. У крупного рогатого скота, яков, буйволов, верблюдов, лошадей бруцеллез вызывают *Br.abortus*; у свиней, северных оленей - *Br.suis*; у коз, овец, буйволов - *Br. melitensis*; у собак - *Br. canis* (возможно и *Br. melitensis*, *Br. suis*, *Br. abortus*). Определенное эпизоотологическое значение имеет возможность миграции различных видов бруцелл от одних животных к другим. Доказана миграция *Br. melitensis* от коз и овец на коров и свиней. *Br. suis* - от свиней на коз и овец. Входными воротами инфекции чаще всего являются – слизистые оболочки и кожа. Животные заражаются от животных при общем водопое (водный путь), на пастбище (алиментарный путь), может передаваться и половым путём. Выраженные инвазивные и агрессивные свойства бруцелл обуславливают способность возбудителя проникать в организм через неповреждённые слизистые оболочки. Факторы вирулентности: 1) внутриклеточная локализация, что обуславливает длительное существование в организме; 2) способность возбудителя размножаться в клетках лимфоидно-макрофагальной системы; 3) наличие капсулы (блокирование фагоцитоза); 4) продуцирование эндотоксина, выделяющийся при разрушении микроорганизмов; 5) ферменты патогенности (гиалуронидаза и др.), способствующие распространению микробов в тканях.

Патогенез. Возбудитель проникает в лимфоузлы и там размножается, локализуясь внутриклеточно. В лимфатических узлах создаётся резервуар возбудителя, устойчивый к действию защитных факторов (фагоцитозу), в результате - длительное сохранение. Генерализация: распространение лимфогенным и гематогенным путём по организму, поражение других лимфоузлов и других органов и тканей (селезёнка, костный мозг). Позже болезнь переходит в хронический сепсис – периодическое поступление микроорганизмов в кровь из лимфоузлов, содержащих их резервуар, далее - разрушение микроорганизмов, выделение эндотоксина. С первых дней болезни возникает реакция ГЗТ, которая сохраняется в течение всей болезни и длительное время после выздоровления. В поражённых тканях формируются гранулёмы (первые – к 20 дням от начала болезни). Больные животные выделяют возбудителя с мочой, фекалиями, молоком, абортированным плодом, околоплодной жидкостью, влагалищной слизью. У животных выражено нарушение вынашивания плода, возбудитель содержится в плаценте, в околоплодных водах, т.к. в плаценте имеется белок эритролит, который является хорошим субстратом для роста бруцелл.

Лабораторная диагностика. Используется бактериологический, серологический, биологический методы. Материалом для бактериологического исследования служат: абортированный плод; плодные оболочки; околоплодная жидкость; кровь; молоко; выделения из влагалища; сперма; половые органы; селезенка; костный мозг и др. Диагностика заключается в микроскопии мазков, получении чистых культур возбудителя и, при необходимости, проведения биологической пробы на морских свинках. Мазки-отпечатки из патологического материала окрашивают по Граму и специальными методами (по Козловскому, Стемпу, модифицированному методу Циль-Нильсена), позволяющими дифференцировать бруцелл). Выделение чистой культуры при посеве патматериала на специальной питательной среде является убедительным подтверждением диагноза. Неотъемлемой частью диагностики является биопроба на морских свинках.

Серологические исследования. Для проведения массовых профилактических обследований широко используют РА, РСК, ДСК, пластинчатую РА с роз-бенгал-антигеном, кольцевую реакцию (КР) с молоком коров. Наличие среди обследуемого скота животных, реагирующих по РА в разведениях 1: 50 (для мелких), 1 :100 (для крупных) и

1 :10 для пушных зверей и морских свинок более чем в два креста, указывает на заболевание животных бруцеллезом, обнаружение антител в более низких титрах оценивается как сомнительный результат.

Аллергические исследования имеют наибольшую диагностическую ценность при поздних стадиях развития болезни. Для аллергических исследований применяют бруцеллин ВИЭВ. Препарат вводят под кожу нижнего века овцам и оленям в дозе 0,5 мл, крупному рогатому скоту и буйволам — в дозе 1 мл. Воспаление на месте введения аллергена расценивается как положительная реакция, животные признаются больными и подлежат убою.

Иммунитет и средства специфической профилактики. В основе иммунитета при бруцеллезе лежит клеточный иммунитет. Важную роль играет фагоцитоз и состояние аллергии. Обезвреживание бруцелл происходит при участии антител — опсоинов, агглютининов (хотя этот механизм не очень значим). Иммунитет носит нестерильный характер, т.е. его защитная функция слабо выражена и возбудитель сохраняется в организме.

Предупреждение возникновения бруцеллеза обеспечивается проведением комплекса общих и специфических мероприятий ветеринарной службой. Вакцинацию проводят: живой ослабленной бруцеллезной вакциной (для крупного рогатого скота — из штамма 82 Br.abortus, для мелкого рогатого скота — из штамма Рев-1 Br. melitensis), которую вводят животным планово; инактивированной адъювант-вакциной из штамма Brucella abortus KB 17/100; вакциной против бруцеллеза крупного рогатого скота из штамма B.abortus 75/79-AB сухой живой (ФГУ "ВГНКИ" и Алтайская НИВС).

1.7 Лекция № 7 (2 часа)

Тема: «Возбудители чумы верблюдов и туляремии»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Чума верблюдов - определение заболевания, краткая характеристика болезни. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических антигенных, токсигенных свойств пастерелл. Патогенность, патогенез, устойчивость их во внешней среде. Лабораторная диагностика пастереллеза. Иммунитет и иммунопрофилактика
2. Туляремия - определение заболеваний, краткая характеристика болезней. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических антигенных, токсигенных свойств. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика пастереллеза. Иммунитет и иммунопрофилактика.

1.7.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

Чума верблюдов и человека — это природно-очаговая болезнь. В естественных условиях резервуаром возбудителя служат грызуны. Здоровых животных заражают переносчики, в первую очередь блохи. Из сельскохозяйственных животных наиболее чувствительны верблюды. Болезнь характеризуется тяжелой интоксикацией, поражением лимфатической системы, легких, тенденцией к септицемии. Чума — это очень древняя азиатская болезнь, которая поражала население разных стран и континентов. Она унесла миллионы человеческих жизней в Европе и ее называли «черной смертью». Смерть от чумы достигала 95%, хотя некоторые заболевшие чудом выздоравливали самостоятельно. До конца XIX века эта тяжелая болезнь не поддавалась лечению. Лишь после изобретения вакцин против чумы и началом применения в практике некоторых антибиотиков (стрептомицина и др.) начали выздоравливать многие пациенты, лечение у

которых начиналось вовремя. Сейчас эта болезнь изредка наблюдается в некоторых регионах Ирана, Бразилии, Непала, и др. В России бубонная чума не появлялась с семидесятых годов XX века, но опасность вспышки такой эпидемии существует. Её последний самый близкий очаг был ликвидирован в Киргизии в 2013 году: из-за этой болезни погиб 15-летний подросток. Также был зафиксирован случай бубонной чумы в 2009 году в Китае. Поэтому это заболевание является актуальным.

Возбудителем чумы является *Yersenia pestis*, относится к семейству Enterobacteriaceae, роду Yersinia.

Морфология. Возбудитель чумы в своей типичной форме относительно мелкая, прямая, с закругленными концами палочка, длиной 1-3 мкм, шириной 0,3-0,7 мкм. Отличается большим полиморфизмом. В старых культурах и при выделении из органов разложившихся трупов можно наблюдать бактерии чумы шаровидной формы в виде длинных утолщенных палочек. Спор не образует. Чумной микроб лишен жгутиков, но образует капсулу, кислотоустойчивостью не обладает, хорошо воспринимает основные анилиновые красители.

Культуральные свойства. Возбудитель — факультативный анаэроб, температурный оптимум 28...29 °С (диапазон 14...42 °С), pH 7,2...7,4, хорошо растет на обычных питательных средах. Через 24 ч инкубирования при 37 °С на плотных средах образует шероховатые, с фестончатым краем и желтовато-коричневым выпуклым центром колонии, напоминающие из-за прозрачного фестончатого края «кружевной платок». В МПБ возбудитель образует пленку на поверхности среды, от которой спускаются нити, напоминающие stalactites, на дне пробирки хлопьевидный осадок.

Биохимические свойства. Чумной микроб обладает слабо выраженной биохимической активностью, ферментирует маннит, глюкозу, мальтозу с образованием кислоты без газа. По признакам биохимической активности все штаммы чумного микроба делят на следующие экологогеографические разновидности: восточная (крысиная), античная (сурчиная), средневековая (сусликовая), в последние годы выделяют также полевочную и песчаночную разновидности. Чумной микроб обладает термолабильным капсульным (фракция 1) и термостабильным соматическим антигенами. Образует эндотоксин белковой природы.

Устойчивость во внешней среде. Чумной микроб неустойчив вне организма теплокровных животных и эктопаразитов и чувствителен к воздействию физических, химических и биологических факторов. Нагревание в течение часа убивает его при 60⁰, при 80⁰ — в течение 5 минут, при 100⁰ — за минуту. Низкую температуру возбудитель чумы переносит значительно лучше, выдерживая трехкратное замораживание и оттаивание. Чумной микроб чувствителен к высушиванию, воздействию солнечных лучей (прямой солнечный свет убивает микроба в течение 2-3 часов) и не гибнет при наличии гнилостной микрофлоры. Длительность сохранения микробов в трупном материале находится в прямой зависимости от степени разложения трупа (в трупах чумные микробы остаются жизнеспособными при 35⁰ до 5 дней, в замороженных трупах до 7 месяцев и более). При благоприятных температурных условиях, влажности и отсутствия микробов-конкурентов чумной микроб остается жизнеспособным в воде в течение месяца, молоке до 3 месяцев, в земле до 2 месяцев. В высохшей мокроте чумного больного микробы выживают в течение недели, во влажной — больше месяца (при низких температурах). В зараженных и голодающих блохах — до 396 дней. На зерне, хлебе, овощах при благоприятных условиях микробы сохраняются неделями. Возбудитель чумы чувствителен ко всем широко применяемым дезинфицирующим средствам.

В природных очагах чума проявляется в виде эпизоотий среди более чем 200 видов грызунов и зайцеобразных мировой фауны. Чума передается между ними трансмиссивным и, вероятно, алиментарным путем. Трансмиссивная передача инфекции, которую обеспечивают в различных природных очагах около 70 видов блох и некоторые виды клещей, наиболее опасна для людей. У грызунов чума чаще всего протекает как

острое септическое заболевание с высокой летальностью, принимающее хроническое течение при переходе животных в спячку. Восприимчивость к чуме человека абсолютная. Заражение человека в эпизоотичных по чуме очагах происходит при контакте с больными животными во время охоты за ними и снятия шкур (укусы эктопаразитов грызунов), реже заражение возможно через повреждение кожи и слизистых оболочек. При развитии эпизоотий в населенных пунктах заражение людей происходит при укусах крысиных блох (особенно *Xenopsylla cheopis*). При наличии бубонов и септической формы чумы инфекция может передаваться от человека к человеку при помощи человеческой блохи (*Pullex irritans*). Легочная чума (первичная) передается от человека к человеку воздушно-капельным путем, вторичная же возникает метастатически. Легочная чума является особенно опасной формой болезни. Иной характер имеют эпидемии, связанные с зараженными крысами, они наблюдаются преимущественно в портовых городах и могут принимать значительные размеры (городская, крысиная чума). Наконец, при возникновении случаев легочной чумы инфекция приобретает агрессивный характер, заразность больного резко увеличивается и могут возникать обширные эпидемии.

Патогенез чумы тесно связан со способностью чумного микроба быстро размножаться после проникновения в организм, накапливаться в барьерных системах и вызывать сепсис, ведущий к летальному исходу. Характер инфекционного процесса зависит от места проникновения микроба в организм человека. К патогенетическим факторам чумного микроба относится токсин, гемолизин, фибринолизин, инвазивность, способность свертывать плазму. Основным из них следует считать токсин. Явления интоксикации в различной степени выражены при всех формах клинического проявления чумы.

При исследовании любого подозрительного материала применяют микроскопию, посевы на питательные среды, постановку биопроб, а для поисков больных чумой грызунов в природе и для ретроспективной диагностики чумы (в том числе и у людей) – серологические методы. Для идентификации применяют разнообразные методы, позволяющие как можно полнее охарактеризовать выделенную культуру. Комитет экспертов Всемирной Организации Здравоохранения (далее – ВОЗ) предложил для идентификации *Yersenia pestis* следующие критерии: наличие в мазках грамтрицательной, лишенной жгутиков (неподвижной) палочки с выраженной биполярной окраской; отсутствие спор; хороший рост на обычных питательных средах даже при ограничении доступа кислорода; морфология колоний на агаре и характер роста в жидких питательных средах; отсутствие подвижности; ферментация глюкозы, но не сахарозы, лактозы и рамиозы; положительная реакция на эскулин, но не мочевины; чувствительность к чумному бактериофагу при температуре 22⁰С; патогенность для лабораторных животных (белых крыс, мышей и морских свинок) при введении любым способом в умеренных дозах.

В настоящее время для лечения бубонной формы чумы рекомендуют сульфаниламидные препараты (сульфидин, триметоприм-сульфаметоксазол, сульфатон и другие) и целый ряд антибиотиков.

После перенесенного заболевания у большинства переболевших вырабатывается довольно стойкий иммунитет, хотя отмечены случаи вторичных заболеваний чумой.

С 1942 г. в СССР были организованы массовые прививки чумной живой вакциной ЕВ. В настоящее время коммерческую (лицензированную) противочумную живую сухую вакцину из штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ для чрескожного и аэрозольного применения производят в РФ в Ставропольском противочумном институте, а в 48-м ЦНИИ МО РФ (г. Киров) выпускается препарат и для применения внутрь. Для лечения используется иммунная сыворотка. Для животных биопрепараты не разработаны.

2. Наименование вопроса №2.

Туляремия – это острая инфекционная болезнь, у сельскохозяйственных животных обычно протекает в септической форме. Характеризуется увеличением лимфатических

узлов, симптомами поражения нервной системы, у крупного рогатого скота может проявляться маститами, у лошадей — абортами. Из сельскохозяйственных животных к возбудителю туляремии наиболее чувствительны поросята, ягнята, из диких животных — грызуны. Восприимчив человек.

Возбудитель туляремии — бактерия Francisella tularensis (принадлежит к роду Francisella). Бактерию туляремии выделили в 1912 г. Г. Мак-Кой и Ш. Чепин при изучении чумоподобного заболевания у сусликов в округе Туляре (Калифорния). Род Francisella назван в честь Э. Френсиса, впервые изучившего биологию этого микроба. Внутри вида *F. tularensis* различают три географические расы: голарктическую, среднеазиатскую и неарктическую, отличающиеся некоторыми биологическими особенностями.

Морфология. В окрашенных мазках возбудитель туляремии имеет кокковидную или палочковидную форму 0,3–0,7 мкм в длину и 0,2–0,4 мкм в ширину; встречаются более мелкие клетки (0,15 мкм и меньше), способные проходить через бактериальные фильтры. Кокковидные формы чаще находят в культурах, палочковидные — в организме животных. Для бактерии характерен полиморфизм, выявляемый при росте на питательных средах: в препаратах из культур наряду с типичными бактериями могут встречаться шаровидные и нитевидные формы. Микроб неподвижен, спор не образует, имеет небольшую капсулу; в культурах продуцирует слизь, легко обнаруживаемую при изготовлении мазков. Возбудитель окрашивается всеми анилиновыми красками, но заметно бледнее других бактерий, грамтрицательный. В мазках отпечатках из органов павших животных хорошо красится по Романовскому — Гимзе, приобретая сиреневый цвет. В тканях бактерии биполярно не окрашиваются, чем и отличаются от пастерелл.

Культивирование. Бактерия не растет на универсальных питательных средах. Для ее культивирования применяют свернутую желточную среду Мак-Коя (60% желтка куриных яиц и 40% физиологического раствора). Используют также среду Френсиса (2,5% мясопептонного агара, 0,1% цистина, 1% глюкозы и 5–10% дефибринированной кроличьей крови), полужидкую желточную среду Дрожжевкиной (10% куриного желтка и 90% стерильного физиологического раствора), кровяной рыбно-дрожжевой агар с глюкозой и цистином и др. Туляремийная бактерия — строгий аэроб, оптимум температур 36–37° С, рН среды 7,2–7,0. На свернутой желточной среде при обильном росте микробы растут в виде блестящего тонкого налета с извилистой («шагреновой») поверхностью; при скудном росте вырастают небольшие блестящие выпуклые колонии или группы колоний. На среде Френсиса культура имеет вид небольших (1–2 мм) круглых, выпуклых, гладких, блестящих, с ровными краями колоний беловатого цвета с голубоватым оттенком; рост отмечается через 2–3 сут. Колонии патогенных штаммов имеют S-форму. В жидких питательных средах туляремийный микроб растет значительно хуже (только на поверхности среды). Бактерии хорошо размножаются также в желточном мешке развивающегося куриного эмбриона.

Биохимические свойства. Бактерия туляремии не обладает выраженной биохимической активностью. Способность сбраживать углеводы и спирты ограничена и может быть достоверно выявлена лишь на специальных плотных средах с пониженным содержанием белка и с определенным рН. Среда Гисса для этой цели непригодна. Микроб ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, в ряде случаев — левулезу и маннозу; не сбраживает лактозу, сахарозу, рамнозу, маннит; образует сероводород и редуцирует тионин, метиленовый голубой, малахитовый зеленый.

Антигенная структура. Патогенные варианты возбудителя туляремии (S-форма) имеют два антигенных комплекса, локализованных на поверхности клетки. Первый из них — Vi-антиген — содержит липиды и белки, определяет вирулентности и иммуногенность микроба; второй — O-антиген — расположен в клеточной стенке и капсулоподобном слое бактерии, термостабильный гликопротеид. Оба эти комплекса обладают аллергенными и антигенными свойствами, индуцируют образование агглютинирующих,

преципитирующих и комплементсвязывающих антител, а также гиперчувствительность замедленного типа. Функцию аллергена у этой бактерии выполняет полисахариднополипептидный комплекс. Vi-антиген патогенных вариантов возбудителя туляремии обладает сходством с аналогичным антигеном бруцелл.

Устойчивость. В воде или влажной почве при 4°C сохраняется без снижения вирулентности свыше 4 мес., в воде при 20–25°C – 10–15 сут, в зерне и соломе при температуре ниже 0°C — до 6 мес., при 8–12°C — 56 сут, при 20–30°C — не более 20 сут. В замороженном мясе возбудитель жизнеспособен до 93 сут, в молоке и сливках при 8–10°C — не менее 3 нед., в замороженном молоке — до 104 сут. В замороженных т животных, павших от туляремии, — свыше 3 мес., в их шкурах при 8–12°C — более месяца, при 32–33°C — 1 нед. Микроб устойчив к высушиванию. Особенно чувствителен к этиловому спирту (погибает через 0,5–1 мин). Чувствителен к дезинфектантам — лизолу, фенолу, креолину, но наиболее — к хлорной извести. Неустойчив ко многим антибиотикам — стрептомицину, левомицетину, тетрациклину, неомицину, канамицину; устойчив к пенициллину.

Патогенность. Бактерия патогенна для зайцев, полевок, домашних мышей, сусликов, крыс. Сельскохозяйственные животные относительно устойчивы к туляремии, заболевают спорадически, болезнь часто протекает в скрытой форме. Наиболее восприимчивы ягнята и поросята, болеют лошади, ослы. У крупного рогатого скота болезнь сопровождается увеличением лимфатических узлов и маститом. Чувствительны буйволы, верблюды, северные олени. Взрослые овцы устойчивы к заболеванию, еще более резистентны козы. Восприимчивы кролики, болезнь у которых протекает без характерных признаков и может иметь сходство с псевдотуберкулезом и хронической формой пастереллеза. Из птиц восприимчивы куры, особенно цыплята. К заражению чувствительны морские свинки и белые мыши. Туляремией болеет и человек, однако заболевание протекает относительно доброкачественно и больной не представляет опасности для окружающих. Истинный экзотоксин у этого микроба не выделен, но он синтезирует патогенные ферменты: аспарагиназу, гиалуронидазу, глутаминазу, дезаминазу, трансамидазу, уронидазу, фибринолизины. Уронидазу обнаруживают только у вирулентных штаммов. Считают, что патогенное действие туляремийного микроба в основном обусловлено эндотоксином.

Патогенез. Заражение происходит алиментарным, воздушно-пылевым и трансмиссивным путями. Бактерии могут проникать в организм через неповрежденные кожные покровы, конъюнктиву, дыхательные пути. Возбудитель, размножаясь на месте внедрения, сначала попадает в лимфатические узлы, затем проникает в кровь и вызывает септицемию. Симптомокомплекс определяется видовой и возрастной устойчивостью животных, а также способностью возбудителя размножаться в органах, богатых ретикулоэндотелиальными элементами.

Лабораторная диагностика. При взятии, доставке в лабораторию и исследовании материала на туляремию соблюдают меры предосторожности, предусмотренные правилами работы с особо опасными инфекциями. Материалом для исследования служат печень, почки, селезенка, увеличенные лимфатические узлы, взятые от трупов крупных животных; трупы грызунов направляют целиком. Схема исследования материала включает бактериоскопию, выделение чистых культур, биологическую пробу. Мазки-отпечатки из органов животных окрашивают по Романовскому — Гимзе; учитывают большие скопления коккобактерий сиреневого цвета. Бактериоскопию следует рассматривать как ориентировочный метод. Для индикации бактерий используют реакцию прямой иммунофлюоресценции, однако этот метод является сигнальным, и положительные результаты должны подтверждаться выделением культуры возбудителя. Для этой цели проводят посев патологического материала на специальных питательных средах (свернутая желточная среда Мак-Коя, среды Дрожевкиной и Емельяновой). Одновременно делают контрольные посевы на МПА и в МПБ, которые инкубируют в аэробных и анаэробных условиях. Свежевыделенную культуру идентифицируют по

морфологическим (неподвижные коккобактерии), тинкториальным (грамотрицательные бактерии) свойствам, характеру роста на свернутой желточной среде, отсутствию роста на универсальных питательных средах, а также по результатам пробирочной РА со специфической агглютинирующей сывороткой.

Биологическая проба. Самый чувствительный и надежный метод для обнаружения туляремиальных бактерий в любом материале. Заражают белых мышей, реже морских свинок. Суспензию из кусочков органов и лимфатических узлов вводят в дозе 0,5 мл подкожно или интраперитонеально или втирают в свежевыстриженный участок кожи. Белые мыши погибают через 3–4 сут, иногда через 8–12 сут, морские свинки - на 4–6-е сутки, при слабой инфицированности материала — в течение 8–20 сут.

Серологический диагноз. Осуществляют с помощью реакций агглютинации, преципитации, непрямой гемагглютинации и нейтрализации антител, ИФА.

Используется ПЦР.

Аллергический метод. Гиперчувствительность замедленного типа у животных при туляремии развивается рано (до пятого дня болезни) и сохраняется длительное время, поэтому аллергический метод может быть использован для ранней и ретроспективной диагностики. Аллергеном служит тулярин; препарат вводят внутрикожно, реакцию учитывают дважды - через 24 и 48 ч.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевших животных создается стойкий и длительный иммунитет, имеющий в своей основе тканевые и гуморальные механизмы.

Для профилактической иммунизации человека применяют сухую живую вакцину против туляремии, предложенную в 1946 г. Н. А. Гайским и Б. Я. Эльбертом. Для сельскохозяйственных животных вакцина не разработана.

1.8 Лекция № 8 (2 часа)

Тема: «Возбудители пастереллеза и гемофилёзов»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Пастереллез - определение заболевания, краткая характеристика болезни. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических антигенных, токсигенных свойств пастерелл. Патогенность, патогенез, устойчивость их во внешней среде. Лабораторная диагностика пастереллеза. Иммунитет и иммунопрофилактика
2. Гемофилёзы, определение заболеваний, краткая характеристика болезней. Характеристика морфологических, культуральных, биохимических антигенных, токсигенных свойств. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика пастереллеза. Иммунитет и иммунопрофилактика.

1.7.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

Пастереллез (геморрагическая септицемия) - инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных и диких животных, в том числе птиц, характеризующаяся явлениями септицемии и воспалительно-геморрагическими процессами во внутренних органах, на серозных и слизистых оболочках.

Инкубационный период при пастереллезе продолжается от нескольких часов до 2-3 дней. Болезнь протекает сверхостро, остро, подостро и хронически. У крупного рогатого скота различают грудную, отечную и кишечную формы. У больных животных отмечают повышение температуры тела до 41-42 °С, учащение пульса, общую слабость, отсутствие

аппетита, отеки в области межжелюстного пространства, подгрудка, конечностей (отечная форма), частое и затрудненное дыхание, сухой кашель, пенистое истечение из носа (грудная форма), прогрессирующую анемию, запор, затем понос, в фекалиях имеются примеси крови (кишечная форма, встречающаяся у молодняка). Болезнь длится 1-2 суток, при подостром и хроническом течении – 2-3 месяца. Часто у телят *P. multocida* серогруппы А и Д вызывает хроническую бронхопневмонию – легочной пастереллез.

У свиней температура тела повышается до 41,0 °С и выше, учащается пульс и дыхание, наблюдаются отеки в межжелюстной области, цианоз кожи ушей, живота. При подостром течении отмечаются симптомы фибринозной плевропневмонии, при хроническом течении – исхудание, кашель, опухание суставов. Продолжительность болезни от нескольких часов (при сверхостром течении) до 3-6 недель (при хроническом течении).

У птиц сверхострое течение пастереллеза обычно отмечают в начале эпизоотии. Птицы неожиданно падают и, взмахнув крыльями, без всяких симптомов погибают. Чаще всего наблюдают острое течение: апатия, птицы сидят с опущенными крыльями, оперение взъерошено, отказ от корма, посинение гребня, сережек, дыхание прерывистое с хрипами, голова повернута под крыло или закинута назад, температура тела нередко повышается до 44°С, анорексия, жажда, пенистая слизь из носовых отверстий и клюва, профузный (иногда кровавый) понос, гибель при судорогах через 18-72 ч. При подостром и хроническом течении – истощение, анемия, воспаление суставов (артриты) с последующим абсцедированием, воспаление сережек, затем абсцессы и некротизированные участки на них.

Возбудителем болезни является *Pasteurella multocida*. Впервые возбудителя холеры кур в чистой культуре выделил Л. Пастер в 1880 г. Название *Pasteurella* возбудителю присвоено в честь ученого в 1910 г. По современной классификации пастереллы относятся к семейству Pasteurellaceae, в котором один род *Pasteurella*. Род представлен шестью видами. Основной вид - *Pasteurella multocida*.

Морфология. *P. multocida* в мазках-отпечатках из крови и органов представляют собой грамтрицательные короткие овоидные палочки (длиной 0,4-1,2 мкм и шириной 0,3-0,4 мкм). При окраске по Романовскому-Гимзе имеют вид биполяров (интенсивно окрашиваются по полюсам). В мазках из культур пастереллы имеют вид коккоовоидных палочек, располагающихся одиночно, попарно, реже в виде коротких цепочек. Неподвижные, образуют слизистые капсулы, спор не образуют.

Культуральные свойства. *P. multocida* - факультативный анаэроб. Оптимум температуры 37-38°С, рН среды 7,2-7,4. Растут в МПБ и на МПА, но лучше, при внесении к ним сыворотки крови, на средах Хоттингера или Мартена. На МПА (S-формы) образуют мелкие, выпуклые, прозрачные, круглой формы колонии серого цвета, М-формы - более крупные слизистые колонии с непрозрачным центром; R-формы - шероховатые непрозрачные колонии. В косопроходящем свете колонии S-формы флюоресцируют, что связано с капсулообразованием; в МПБ - слабое равномерное помутнение среды и образование на дне пробирки слизистого осадка, поднимающегося при встряхивании в виде характерной косички. М-формы растут более интенсивно и дают более выраженный слизистый осадок. R-формы образуют хлопьевидный или зернистый осадок.

Биохимические свойства. Пастереллы ферментируют с образованием кислоты: глюкозу, сахарозу, маннит, сорбит; не ферментируют: лактозу, дульцит, аденин. Образует индол на мартеновском бульоне, реакция на каталазу положительна, не разжижают желатин, восстанавливает нитраты в нитриты, сероводород культура пастерелл либо не образует, либо образует в небольшом количестве. Молоко не свертывает, гемолиза на кровяном агаре не вызывают, не растут в бычьей желчи и лизируются в ней.

Антигенная структура. *P. multocida* имеет К-(капсульный) и О-(соматический) антигены. К-антигены разделены на четыре серологических типа: А, В, D и Е. *P. multocida* серовара А преимущественно поражает птиц, реже крупный рогатый скот и свиней,

серовара В и Е вызывают острое заболевание домашних и диких животных, протекающее в виде геморрагической септицемии, серовар D встречается у всех видов животных.

Устойчивость. В окружающей среде невысокая. При 58°C погибают за 20 мин, при 90°C - за 10 мин, при кипячении - моментально. Выдерживают замораживание до - 70°C. При высушивании на открытом воздухе гибнут за 2-3 суток. В почве выживают до 12 суток, в навозе - 14, птичьей помете - до 72 суток, в гниющих трупах - до 3 месяцев, в зерне - до 44 суток. Дезинфицирующие растворы в принятых концентрациях (раствор, содержащий 5 % активного хлора, 3 %-е растворы формальдегида и гидроксида натрия) убивают пастерелл в течение 10 мин.

Патогенность. Патогенные и вирулентные свойства пастерелл варьируют и наиболее сильно выражены у животных того вида, от которого они выделены. Эпизоотические штаммы высоковирулентны для белых мышей и кроликов. Установлена корреляция между вирулентностью, капсуло- и токсинообразованием. Наибольшей вирулентностью обладают свежевыделенные культуры. В лабораторных условиях при хранении культур вирулентность пастерелл резко снижается.

Патогенез. При остром течении болезни пастереллы быстро размножаются, проникают в кровеносную и лимфатическую системы, вызывая септицемию. За счет образования эндотоксинов и других агрессивных субстанций повреждаются стенки сосудов, они становятся проницаемы для плазмы, клеточных элементов, развивается геморрагический диатез, появляются отеки подкожной и межмышечной клетчатки. В результате нарушения кровообращения наступает некроз тканей.

Лабораторная диагностика. Основана на результатах бактериологического исследования. Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на культуральные среды и методом биопробы, идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам. Для выделения пастерелл используют только свежий патологический материал от нескольких трупов больных животных.

Иммунитет и средства специфической профилактики. У переболевших животных образуется нестерильный иммунитет. После вакцинации животные (особенно птицы) могут оставаться пастереллоносителями. Для активной иммунизации применяют: видоспецифичные эмульгированные вакцины отдельно для крупного рогатого скота, буйволов и свиней; преципитированную вакцину для овец и свиней; полужидкую для крупного рогатого скота и буйволов; ассоциированную вакцину против пастереллеза, сальмонеллеза и диплококковой септицемии для свиней. Для активной иммунизации птиц применяют: инактивированные (эмульгированная для кур и уток, а также эмульсивакцина отдельно для кур, индеек, уток и гусей); живые ослабленные вакцины из пастеровского штамма для домашней птицы всех видов; две вакцины из штамма АВ и штамма К Краснодарской НИВС для водоплавающих птиц. Для профилактики и лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку. Пастереллы высокочувствительны к гентамицину, левомицетину, стрептомицину, тетрациклам и некоторым сульфаниламидным препаратам.

2. Наименование вопроса №2

Возбудители гемофилезов включены в семейство *Pasteurellaceae*, род *Haemophilus*. Род насчитывает 16 видов, среди которых имеются патогенные для человека и животных. Это очень мелкие коккобактерии и палочки, облигатные паразиты слизистых оболочек, нуждающиеся в специфическом ростовом факторе, содержащемся в специфическом ростовом факторе, содержащемся в крови и в продуктах жизнедеятельности некоторых бактерий.

Гемофилезный полисерозит - инфекционное, септическое заболевание поросят послеотъемного периода, характеризующееся серозно-фибринозным воспалением плевры, перикарда, брюшины и суставов.

Возбудитель болезни — *Haemophilus parasuis*. крови и в продуктах жизнедеятельности некоторых бактерий.

Морфология. Мелкая, от 0,2 до 0,5 мкм длины, полиморфная палочка, неподвижная, грамотрицательная, образующая капсулу. В мазках из патологического материала возбудитель имеет вид коротких цепочек, диплобактерий и нитей. Спор не образует.

Культивирование. Для роста и развития возбудителя на искусственных питательных средах необходимо присутствие ростового фактора, содержащегося в крови и продуктах обмена некоторых бактерий. С этой целью готовят кровяной МПА (рН 7,2), содержащий 5% крови овцы; шоколадный агар (к расплавленному 2% му МПА при температуре 45–50°C добавляют 10% по объему стерильной дефибринированной крови барана), а также специальные среды — плотные и жидкие Левенталья и Файдля. Посев и пересев производят на подсушенную среду. После посева патологического материала или пересева культуры чашки выдерживают в термостате в течение 30 мин, затем с помощью бактериологической петли делают крестообразный посев культур негемолитического штамма кишечной палочки или белого стафилококка и методом штриха по диаметру чашки («баккормилка»). Гемофильные бактерии образуют рост в зоне 1–2 см от штриха, так как при росте кишечная палочка или стафилококк продуцирует в агаровую среду ростовые факторы, стимулирующие развитие гемофильной бактерии. Чашки инкубируют в термостате при 37–38°C в течение 24 ч, после чего просматривают культуры. На кровяном МПА с «баккормилкой» вырастают мелкие (0,2–0,4 мм), выпуклые, с блестящей поверхностью колонии слизистой консистенции, без наличия зоны гемолиза. При росте в жидких средах с ростовыми добавками стафилококка гемофильные бактерии образуют умеренную опалесценцию и продуцируют эндотоксин. Гемолизин и уреазу не образуют. В мазках, приготовленных из колонии и окрашенных по методу Гинса, на темном фоне видны мелкие палочковидные (нитевидные) бактерии красного цвета, окруженные узкой светлой зоной (капсула).

Антигенная структура. Различают четыре серологических варианта *H. parasuis* — А, В, С и D. Болезнь чаще вызывают серовары А и D.

Патогенез. Изучен недостаточно.

Лабораторная диагностика включает микроскопический, бактериологический, биологический, серологический методы.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Изучены слабо. Применяют инактивированную вакцину (М. А. Сидоров с соавт., 1979) для иммунизации супоросных свиноматок и молодняка; для лечения — антибиотики.

1.9 Лекция № 9 (2 часа)

Тема: «Возбудители лептоспироза и кампилобактериоза»

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Определение и краткая клиническая картина лептоспироза, характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя лептоспироза. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде патогенных лептоспир. Лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика лептоспироза.

2. Определение и краткая клиническая картина кампилобактериоза, характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя кампилобактериоза. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде патогенных кампилобактеров. Лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика кампилобактериоза.

1.9.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

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

Протекает остро, подостро, хронически и бессимптомно. У свиней, взрослого крупного рогатого скота, лошадей, овец и коз протекает преимущественно бессимптомно. Независимо от течения болезни в крови животного выявляются специфические антитела на 5-7 день после заражения, а через 10-20 дней развивается лептоспираносительство. Острое течение среди сельскохозяйственных животных чаще наблюдается у молодняка, сопровождается кратковременной лихорадкой, гематурией, иногда желтушным окрашиванием и некрозами слизистых и отдельных участков кожи, нарушением функции желудочно-кишечного тракта (понос, запор). При подостром течении отмечаются те же симптомы, но менее выраженные. При хроническом признаки выражены слабо, прогрессируют исхудание и снижение продуктивности.

Возбудитель инфекции относится к роду *Leptospira* (от греч. *leptos* — мелкий, *spira* — завиток), семейству - *Leptospiraceae*. Открыт японскими исследователями Инада и Идо в 1914 г. Выделено более 200 серологических типов патогенных лептоспир, объединенных по общности антигенов в 25 серологических групп. Все паразитические лептоспиры в соответствии с предложением Всемирной организации здравоохранения относят к одному виду — *L. interrogans*. Наиболее часто возбудителями лептоспироза являются следующие серотипы лептоспир: *Pomona*, *Tarassovi*; *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hebdomadis* и др.

Морфология. Лептоспиры различных серологических групп имеют одинаковые морфологические свойства. Длина лептоспир колеблется от 3 до 30 мкм и более, в среднем 7...15 мкм, ширина 0,06...0,15 мкм. Лептоспиры — грамотрицательные бактерии. Поскольку они плохо воспринимают окраску, их обычно исследуют в неокрашенном состоянии. Готовят препарат «раздавленная капля» и изучают методом темнопольной микроскопии. Лептоспиры имеют вид тонких серебристо-белых нитей с нежной спиральной структурой. Длина их 5— 18 мкм, диаметр 0,05—0,14 мкм. Лептоспира имеет тонкую ригидную центральную осевую нить, вокруг которой равномерными завитками обвита цитоплазматическая спираль. Тело лептоспиры, состоящее из правильных, почти соприкасающихся завитков спирали, постепенно утончается к концам, которые в большинстве случаев загнуты под углом и имеют пуговчатые утолщения. Помимо первичных завитков у лептоспир обнаруживают более крупные вторичные завитки, обуславливающие изгибы ее тела, вследствие чего микроорганизмы приобретают форму букв S, C, X.. Осевая нить служит органом движения. Лептоспиры плохо окрашиваются анилиновыми красками, но хорошо импрегнируются серебром по методу Лёвадити.

Культуральные свойства. Лептоспиры являются аэробами, их культивируют на средах слабощелочной реакции (рН 7,2—7,4) при 24— 28°C. Культивирование лептоспир связано с трудностями, обусловленными их низкой способностью к размножению в жидких, полужидких и особенно на плотных искусственных питательных средах. На простых питательных средах лептоспиры не растут. Для их культивирования наиболее часто используют жидкие среды Любашенко, Терских, Ферворт — Вольфа, содержащие 5—10% сыворотки крови кроликов, а также среду ГНКИ с альбумином. Максимальное накопление биомассы лептоспир отмечается по истечении 5—7 сут культивирования, при этом вид питательных сред не изменяется.

Биохимические свойства. Биохимическая активность лептоспир незначительна. Они сбраживают глюкозу и сахарозу с образованием кислоты при условии концентрации углеводов в среде не более 0,25—0,5%. Лептоспиры не обладают протеолитическими свойствами.

Антигенные свойства. Обладают белковым соматическим антигеном, определяющим их видовую принадлежность. Поверхностные полисахаридные антигены служат критериями для групповой и серовариантной принадлежности.

Токсинообразование. Образуют эндотоксин.

Устойчивость. Лептоспиры неустойчивы к воздействиям внешних факторов. Прямые солнечные лучи убивают их в течение 0,5—2 ч. Высушивание на лептоспир действует также губительно. В воде открытых водоемов лептоспиры выживают от нескольких часов до 30 сут. При кипячении культуры они гибнут моментально, а при нагревании до 56°C — через 30 мин. Очень устойчивы лептоспиры к низким температурам. Выживаемость микроорганизмов в пищевых продуктах зависит от pH среды. Кислая реакция губительно действует на лептоспиры. Так, в кислом молоке они гибнут в течение 10 мин. Мясо от больных животных обеззараживается при содержании в нем соли 4,8% в течение 10 сут. 20%-ный этиловый спирт, 2%-ная хлористоводородная кислота, 0,5%-ный раствор фенола, 0,5%-ный раствор едкого натра, 0,25%-ный формалин убивают лептоспир в течение 5 мин.

Патогенность. К лептоспирозу восприимчивы крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, лошади, собаки, буйволы, верблюды, олени, кошки, ослы, лисицы, песцы, куры, утки, мышевидные грызуны. Более восприимчивы к лептоспирозу молодые животные. Из лабораторных животных к лептоспирам наиболее чувствительны золотистые хомяки. Основным источником инфекции являются грызуны, а также больные и переболевшие сельскохозяйственные животные, которые длительное время могут оставаться лептоспиноносителями.

Патогенез. Ворота инфекции для лептоспир являются слизистые оболочки пищеварительного тракта, носоглотки, иногда — половых органов и мочевыводящих путей, а также повреждения кожных покровов. В области внедрения возбудителя никаких патологических изменений не отмечается. Лептоспиры распространяются с током лимфы, оседая в лимфоузлах, размножаясь там, и по кровеносной системе рассеиваясь по органам и системам. Лептоспиры тропны к макроцитарным фагоцитам, склонны накапливаться в тканях печени, селезенки и почек (иногда — в легких) вызывая местное воспаление. Лизис лептоспир сопровождается накоплением токсинов, под действием которых повышается проницаемость кровеносных сосудов, лизируются эритроциты, происходят кровоизлияния, развивается гематурия, желтуха, поражается центральная нервная система. Токсикоз может привести к гибели животного.

Лабораторная диагностика. После убоя животного для исследования берут мочу, почки, кусочки печени и других, паренхиматозных органов. Лептоспироз устанавливают на основании микроскопии, выделения чистых культур лептоспир и постановки биопробы и исследование сыворотки крови по реакции микроагглютинации (РМА), РА. Разработана ПЦР-диагностика.

Иммунитет и средства специфической профилактики. После переболевания формируется длительный и напряженный иммунитет. Ведущую роль играет гуморальный иммунитет. Для профилактики используют вакцину поливалентную "ВГНКИ" против лептоспироза животных, для пассивной иммунизации и лечения — гипериммунную сыворотку против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных.

2. Наименование вопроса №2.

Кампилобактериоз (Campylobacteriosis) - острая кишечная зоонозная инфекция, которая характеризуется преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, протекает чаще всего в виде гастроинтестинальных, реже генерализованных форм и нередко сопровождается токсико-аллергической симптоматикой.

Кампилобактериоз у крупного рогатого скота характеризуется комплексным поражением органов размножения, в процесс вовлекаются слизистые оболочки влагалища, матки, яйцеводов и яичники. Беременность нередко на 4-7 мес. стельности прерывается абортom. Течение инфекционного процесса после аборта сопровождается удлинением фазы полового покоя. Нарушается ритм полового цикла. На зачатие требуется

от 3 до 6 и более осеменений. У инфицированных коров и телок развивается катаральный, катарально-узелковый вагинит. У быков, больных кампилобактериозом, отмечают гиперемии слизистой оболочки препуция и полового члена, обильное выделение слизи в течение 2-3 дней после заражения. В дальнейшем перечисленные признаки исчезают, процесс протекает бессимптомно в виде бактерионосительства.

У овец показателем на кампилобактериоз является аборт, мертворождаемость, у свиней он мало изученное заболевание. Проявление инфекции также сопровождается абортами, мертворождаемостью.

У птицы кампилобактериоз сопровождается гибелью цыплят, снижением привеса живой массы у бройлеров и яйценоскости кур. У больных птиц, кроме общих симптомов, диагностируются признаки гепатоэнтерита.

Кампилобактериоз: у крупного рогатого скота вызывают - *Campylobacter fetus* (*Campylobacter fetus* subspecies *fetus*); *C.f.s.venerealis*; *Campylobacter jejuni*; у овец - *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* и *Campylobacter jejuni*; у птиц - *Campylobacter jejuni*.

Морфология. Возбудитель кампилобактериоза относится к семейству *Spirillaceae*, роду *Campylobacter*. Кампилобактеры представляют собой мелкие неспорообразующие грамотрицательные бактерии с одним или двумя полярно расположенными жгутиками. Имеют форму запятой, серпа, летящей чайки, короткой или длинной спирали или S-образные, спор и капсул не образуют.

Культивирование. Возбудитель — микроаэрофил, температурный оптимум 37...38 °С. Для получения культуры кампилобактерий используют полужидкие и плотные питательные среды: плотный 2...3%-й МППА и полужидкий 0,2%-й мясо-печеночный пептонный агар (ПЖА), среду Китта—Тароцци без масла, агар Мартена, сафранино-железо-новобиоциновую (СЖН) среду. Для обогащения в питательные среды добавляют 5... 10 % дефибринированной крови крупного рогатого скота, овец, кроликов или сыворотку крови лошади. Культивируют в течение 6...10 сут в микроаэрофильных условиях при замене 10...15% воздуха оксидом углерода (IV). Контаминированный материал высевает на среду СЖН.

Биохимические свойства. Не ферментируют углеводы и мочевину, оксидазоположительны, индол не образуют, образуют сероводород, желатин не разжижают, молоко не свертывают.

Антигенная структура. Имеют О-, Н- и К-антиген. Дифференцируются в РА и РНГА.

Токсинообразование. Кампилобактеры продуцируют 2 типа экзотоксина; термолабильный энтеротоксин и цитотоксин. При разрушении микробных клеток выделяется эндотоксин. Бактерии обладают способностью к адгезии, инвазии и внутриклеточному размножению.

Устойчивость. Кампилобактеры устойчивы к низким температурам, способны длительно сохраняться и размножаться на пищевых продуктах при низких концентрациях содержащегося в них кислорода (продукты в герметичной оболочке). При кипячении погибают через несколько секунд. Чувствительны к действию обычных дезинфектантов.

Патогенез. Поступление кампилобактеров в организм происходит чаще с пищей и водой. Бактерии, преодолевшие кислотный барьер желудка, внедряются в слизистую оболочку тонкой кишки и ее лимфоидные образования. В месте входных ворот инфекции развивается различной выраженности воспалительный процесс. Жизнедеятельность кампилобактеров в слизистой оболочке кишки сопровождается продукцией энтеро- и цитотоксинов, а их разрушение - выделением эндотоксинов, которые и обуславливают развитие диарейной, болевой и интоксикационной симптоматики. По лимфатическим сосудам кампилобактеры проникают в мезентериальные лимфатические узлы и вызывают мезаденит. В патологический процесс кроме тонкой кишки могут быть вовлечены червеобразный отросток и различные отделы толстой кишки. В случае прорыва лимфатического барьера кишечника, что происходит на фоне иммунодефицита различного генеза, возникает бактериемия и генерализованная форма болезни.

При длительном нахождении кампилобактеров и их токсинов в организме происходит его сенсибилизация. Заключительное звено патогенеза - освобождение организма от возбудителя, ведущее к выздоровлению. Прогноз в большинстве случаев за исключением септикопиемической формы благоприятный

Лабораторная диагностика. Основана на результатах бактериологического и серологического исследований. Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным. Серологическая диагностика кампилобактериоза у коров основана на результатах реакции агглютинации с вагинальной слизью (РАВС), а у овец — РА с сывороткой крови.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Переболевшие животные приобретают стойкий иммунитет, повторных аборт не наблюдается. Иммунитет гуморальный. Для профилактики используют эмульсинвакцины перотив кампилобактериоза крупного рогатого скота и овец, а также ассоциированные вакцины против кампилобактериоза, лептоспироза, сальмонеллеза и других инфекций.

1.10 Лекция № 10 (2 часа)

Тема: «Возбудители некробактериоза и копытной гнили»

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Определение и краткая клиническая картина некробактериоза, характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя лептоспироза Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде. Лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика некробактериоза.

2. Определение и краткая клиническая картина копытной гнили, характеристика морфологических, культуральных, биохимических, антигенных, токсигенных свойств возбудителя. Патогенность, патогенез, устойчивость во внешней среде патогенных кампилобактеров. Лабораторная диагностика, иммунитет и иммунопрофилактика копытной гнили.

1.9.2 Краткое содержание вопросов

1. Наименование вопроса №1.

Некробактериоз (Necrobacteriosis) — инфекционная болезнь многих видов домашних и диких млекопитающих животных, характеризующаяся гнойно-некротическими

Возбудитель некробактериоза — *Fusobacterium necrophorum*, род *Fusobacterium*, семейство Bacteroidaceae.

Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методами световой микроскопии и биопробы, выделение чистой культуры и идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным и патогенным свойствам.

Материал для исследования. В лабораторию направляют трупы мелких животных целиком, от крупных животных — пораженные ткани и кусочки паренхиматозных органов с очагами некроза. Для прижизненной диагностики берут соскобы с участков поражения на границе здоровой и некротизированной ткани.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель — грамотрицательная, полиморфная бактерия, образующая длинные нити, неподвижная, без спор и капсул. Хорошо окрашивается фуксином Циля, синью Леффлера, а также по методу Муромцева и Романовского—Гимзы. В мазках-отпечатках из пораженного органа возбудитель обнаруживают в виде грамотрицательных, длинных, иногда, переплетающихся, неравномерно окрашенных нитей.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. *F. necrophorum* — облигатный анаэроб и может расти на обычных для анаэробов средах (среда Китта-Тароцци, бульон

Мартена, печеночный бульон Хоттингера, мозговая среда, сывороточный и глюкозо-кислотный агар), при 37...38 °С, pH 7,4...7,6. Исследуемый материал высевает на среду Китта-Тароцци, МПА в МПБ. На среде Китта-Тароцци возбудитель через 24...48 ч вызывает интенсивное помутнение сначала нижнего слоя, а позднее и всей среды. Газообразование очень слабое, отмечают в первые часы роста. Через 5...8 сут наблюдают просветление бульона с выпадением порошковидного осадка. На плотных средах рост появляется через 48...72 ч в виде мелких росинок диаметром около 1 мм, через 4...5 сут колонии увеличиваются в размере, становятся хорошо заметными невооруженным глазом, окрашены в серовато-белый или зеленоватый цвет, края колоний ровные или немного зазубренные. На глюкозном агаре с эритроцитами кролика некоторые штаммы образуют зону альфа- или бета-гемолиза.

Биохимическая активность. Возбудитель образует индол, сероводород, разлагает с образованием кислоты и незначительного количества газа глюкозу, сахарозу, мальтозу, слабо ферментирует лактозу, не разжижает желатину и свернутую сыворотку, не редуцирует нитраты.

Устойчивость. Возбудитель некробактериоза — относительно нестойкий микроб, но длительное время сохраняет жизнеспособность в объектах окружающей среды. При воздействии прямых солнечных лучей погибает через 12 ч, в замороженном состоянии бактерии выживают 30—40 сут. При нагревании до 65°C они гибнут в течение 15 мин, при 70°C — через 10 мин. Фузобактерии способны длительное время сохраняться и размножаться в слежавшемся навозе, на это указывает частота заболеваний при нахождении животных в обильно навозоженных местах.

Патогенность. В естественных условиях некробактериозом болеют лошади, крупный рогатый скот, буйволы, олени, овцы, козы, свиньи, собаки, кошки, куры, гуси, а также дикие животные — косули, лоси, архары, антилопы, ламы, зебры, бегемоты, бобры, сурки, суслики. К некробактериозу восприимчив и человек. Из лабораторных животных особо чувствительны кролики и белые мыши. В форме тяжелых эпизоотий и энзоотий с высокой смертностью некробактериоз наблюдают у оленей, крупного рогатого скота, овец, свиней. Естественным резервуаром возбудителя в природе служит желудочно-кишечный тракт здоровых животных. В окружающую среду бактерии выделяются со слюной, жвачкой, мочой, фекалиями больных. Заражение происходит по типу раневой инфекции через поврежденную кожу или слизистые оболочки. Возбудитель передается через почву, подстилку, корма, предметы ухода за животными. Возможен и аутогенный путь заражения. Заражению и распространению болезни способствуют травмы конечностей, а также содержание животных в грязных и сырых помещениях.

Патогенез. На месте проникновения возбудителя может возникнуть патологический процесс при наличии благоприятных условий для размножения возбудителя, а именно: глубокое повреждение тканей, при котором не происходит их аэрация. Первоначально в очаге проникновения бактерий образуется небольшая язвочка, затем в воспалительный процесс вовлекаются окружающие ткани, повреждаются стенки сосудов, откладываются обильные массы фибрина, выходит большое количество белка, появляются тромбы; в результате этого наступает омертвление мышц, связок, хрящей фаланг конечностей. Из первичного некротического очага возбудитель путем метастаза может мигрировать в легкие, кишечник, печень, селезенку, мозг и другие органы.

Лабораторная диагностика. Осуществляется на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований, которое включает микроскопический метод, бактериологический и биологический.

Биопроба. Заражают кролика суспензией из исследуемого материала с физиологическим раствором, которую вводят в объеме 0,5... 1 мл под кожу средней трети наружной поверхности уха. При наличии в исследуемом материале *F. necrophorum* у кролика через 3...4 дня на месте инъекции развивается некроз. Из очага некроза делают

мазки и окрашивают одним из методов. Пробу считают положительной при обнаружении в мазках зернистоокрашенных грамотрицательных нитей возбудителя некробактериоза.

Биопрепараты. «Нековак» - ассоциированная вакцина против некробактериоза конечностей крупного рогатого скота, двухкомпонентная вакцина «Нековак» с иммуностимулятором ГМДП (глюкозаминилмурамилпептид).

2. Наименование вопроса №2.

Это хроническое инфекционное заболевание овец и коз. Характеризуется воспалением кожи межкопытной щели, отслоением и гнилостным распадом роговой ткани копытца вплоть до полного отхождения рогового башмака.

Возбудитель копытной гнили - *Dichelobacter* (ст. *Bacteroides*) *nodosus*, род *Dichelobacter*, семейство *Bacteroidaceae*.

Лабораторная диагностика копытной гнили основана на результатах бактериологического исследования. Бактериологическое исследование включает в себя световую, люминесцентную микроскопию и биологическую пробу.

Материал для исследования. В лабораторию направляют мазки-отпечатки из свежеприготовленных тканей, мазки из слизи и слизь с кожи межкопытной щели, кусочки тканей с границы здоровых и пораженных участков, пораженные копыта от вынужденно убитых животных. Материал исследуют от нелеченых и не подвергавшихся обработке дезинфицирующими препаратами животных.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Возбудитель копытной гнили представляет собой грамотрицательную палочку размером (1...1,7) x 3,6 мкм, неподвижную, без спор и капсул. Мазки-отпечатки из нативного материала и доставленные мазки для исследования окрашивают по Граму и микроскопируют. *B. nodosus* обнаруживают в виде грамотрицательных, прямых или слегка изогнутых крупных палочек, иногда с утолщениями на одном или обоих концах. Располагаются поодиночке или парами. В мазках из нативного материала могут быть окружены радиально отходящими от них мелкими грамотрицательными палочками (феномен Бевеиджа). Для обнаружения возбудителя в материале используют непрямой метод РИФ.

Культивирование. *D. nodosus* - строгий анаэроб, растет при вакууме не менее 4—8 мм рт. ст., в атмосфере углекислоты или азота и только на специальных сложных. Один из рецептов таких сред: в печеночный бульон или раствор печеночного экстракта добавляют 0,24% дрожжевого экстракта, 0,24% растворимого крахмала, 1,5% ферментативного гидролизата казеина, 2% трипсинолизированного экстракта копытного рога, 3% агара Дифко, pH среды — 7,4—7,6. Перед разливом в чашки Петри среду стерилизуют, охлаждают до 60°C, добавляют 0,5%-ный стерильный раствор солянокислого цистеина до 0,03%-ной концентрации его в среде, а также 40% стерильной дефибринированной крови лошади. На плотных средах *B. nodosus* образует два вида колоний: плоские, с вдавленным центром, неровными краями (бахромчатые), врастающие в среду, бесцветные колонии, диаметром до 3 мм и более мелкие, диаметром около 1 мм, не врастающие в среду колонии, с гладкими краями и конусовидным приподнятым центром. На жидких питательных средах бактерии через 24 ч инкубации вызывают помутнение, начиная с нижней части пробирки. При комнатной температуре и в термостате при 37°C жидкая культура быстро лизируется.

Биохимические свойства. Микроб биохимически неактивен - не разлагает углеводы и многоатомные спирты, не лизирует эритроциты барана, лошади, крупного рогатого скота, не образует индола и ацетона. Однако обладает протеолитической способностью - разжижает желатину, свертывает молоко, образует сероводород.

Устойчивость. К факторам окружающей среды устойчивость возбудителя незначительная. На пастбищах микроб сохраняется не более двух недель. Нагревание до 90°C убивает его за 1 мин. Дезинфицирующие растворы креолина (3%), формалина (0,5%), фенола (2%) убивают в течение 15—20 мин. При доступе воздуха он погибает через 24 ч, однако в пораженном роге сохраняется до трех лет.

Патогенез. Возбудитель, попав на мацерированную поверхность кожи свода межкопытной щели, начинает размножаться и вырабатывать фермент протеазу, разрушающий белок эпидермиса кожи — кератин. Бактерии также выделяют токсин, вызывающий воспаление и гнойно-гнилостный распад тканей. Развивается глубокий гнойный пододерматит, флегмоны венчика, гнойный артрит копытного сустава и сепсис. Инкубационный период составляет 3–6 сут. Болезнь протекает, как правило хронически.

Диагноз. Ставят на основании анализа эпизоотологических и клинических данных, результатов бактериологической диагностики и биологической пробы. Для исследования необходимо брать свежепораженные участки основы кожи копытца и слизь, покрывающую кожу межпальцевых щелей. Бактериологическая диагностика осуществляется по общепринятой методике. Для биопробы используют ягнят. Для серологической диагностики болезни предложена РСК.

Биопрепараты. Вакцина против копытной гнили овец инактивированная, эмульгированная.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Устройство ветеринарной микробиологической лаборатории и методы лабораторной диагностики бактериальных инфекций животных»

2.1.1 Цель работы: ознакомить студентов с назначением и устройством ветеринарной бактериологической лаборатории и основными методами лабораторной диагностики бактериальных инфекций животных.

2.1.2 Задачи работы:

1. Ознакомить студентов с учебной литературой по микробиологии.
2. Ознакомить студентов с устройством бактериологической лаборатории и техникой безопасности при работе в ней.
3. Ознакомить студентов с методами лабораторной диагностики бактериальных инфекций животных.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

- 1 Литература учебная;
2. Устройство и оборудование кафедры микробиологии и заразных болезней
3. Световые микроскопы: микроскоп «Ломо»; микроскоп бинкулярный XSP-103P; микроскоп «Биалам», микроскоп МБР-3, микроскоп МБС-1, МБС-9.
3. Табличный материал.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Ветеринарно-бактериологическая лаборатория – это учреждение Государственной ветеринарной службы РФ. Различают лаборатории: районные, межрайонные, областные, краевые, республиканские. Их основные задачи: проведение бактериологических, серологических, вирусологических, микологических, биохимических и других исследований. Основная цель их исследований – установление лабораторного диагноза болезней животных и птиц, экспертиза молока, мяса, яиц, кормов.

Лаборатория размещается в специальном здании с дифференциацией на отделы. В бактериологическом отделе имеются следующие помещения: боксы, моечная, бактериологическая кухня, автоклавная, лаборатория, приемная патологического материала, вскрывочная.

Правила техники безопасности в ветеринарно-бактериологической лаборатории:

1. входить в помещение только в специальной одежде – халате и шапочке;
2. не разрешается вносить посторонние вещи, принимать пищу и курить;
3. проверять перед началом работы исправность приборов;
4. не разрешается зажигать одну спиртовку от другой;
5. исследуемый материал должен рассматриваться как особо опасный и при работе с ним необходимо соблюдать принятые в микробиологической практике технические правила, исключающие возможность заражения;
6. в случае попадания материала или культур на пол, стол и т.д. необходимо обработать эти поверхности дезинфицирующим раствором;
7. после окончания работы отдать лаборанту культуры для обеззараживания, убрать и продезинфицировать рабочее место, помыть руки, халаты и шапочки сложить в полиэтиленовые пакеты.

После ознакомления с правилами студенты расписываются в журнале.

Для выявления возбудителя инфекционного заболевания и его идентификации (определения вида возбудителя) используют три метода: микроскопический, микробиологический (бактериологический), серологический, генетический и биологический.

Микроскопический метод позволяет обнаружить возбудителя непосредственно в материале, взятом у больного. Этот метод имеет решающее значение при диагностике, например, туберкулеза. Особенности морфологии возбудителей играют основную роль в постановке диагноза. Однако микроскопический метод не позволяет поставить диагноз при таких инфекциях, как, например, колибактериоз, сальмонеллез, потому что различить их возбудителей по морфологическим признакам невозможно (все они грамотрицательные палочки). Для того чтобы различить сходные между собой по морфологии микроорганизмы, их надо получить в чистой культуре и идентифицировать, что можно сделать с помощью микробиологического (бактериологического) метода исследования.

Микробиологический метод заключается в посеве исследуемого материала на питательные среды, выделении чистой культуры возбудителя и его идентификации. Определение вида и типа возбудителя производят по ряду признаков: морфологии, способности окрашиваться различными красителями (тинкториальные свойства), характеру роста на искусственных питательных средах (культуральные свойства), ферментации углеводов и белков (биохимические свойства), генетический метод (ПЦР). Окончательную принадлежность выделенной культуры к определенному виду (типу) микроорганизмов устанавливают после изучения антигенной структуры, используя различные иммунологические реакции (агглютинации, преципитации, нейтрализации и др.).

Если возбудители инфекционных заболеваний (риккетсии, вирусы, некоторые простейшие) не растут на искусственных питательных средах или необходимо выделить возбудителя из микробных ассоциаций, или выявить его патогенность и вирулентность, то используют метод заражения восприимчивых животных - биологический.

Биологический метод осуществляют путем выделения возбудителя заболевания или его токсина при заражении лабораторных животных, восприимчивых к данному заболеванию. Диагноз устанавливают по воспроизведению у животного типичной картины заболевания и по выделению чистой культуры возбудителя из различных органов путем посева на питательные среды в случае заражения животного микробными ассоциациями. Идентификацию выделенного возбудителя проводят до вида (типа), используя бактериологический метод

Серологические методы диагностики инфекционных заболеваний основаны на выявлении специфических иммунных антител в сыворотке крови больного. Для этого используют различные серологические реакции: РА, РП, РСК, РИФ, ИФА, РН.

Генетический метод позволяет выявлять специфические для каждого патогенного участка ДНК. Самым востребованным методом является ПЦР.

Для того чтобы правильно поставить диагноз инфекционного заболевания, чаще всего используют комплекс всех лабораторных методов: выделение возбудителя, определение антител в крови больного и выявление повышенной чувствительности замедленного типа.

Ознакомительная экскурсия студентов по кафедре, демонстрация помещений и оборудования.

Демонстрация световых микроскопов разных марок, повторение устройства микроскопа и правил работы с ним. Разбор особенностей иммерсионной системы микроскопа. Демонстрация работы с иммерсионной системой:

Задание для самостоятельной работы

1. Совершить ознакомительную экскурсию по кафедре.
2. Познакомится с методами лабораторной диагностики.
2. Ответить на контрольные вопросы.

Контрольные вопросы

1. Каково устройство бактериологического отдела?
2. Каковы основные правила техники безопасности?
3. Каковы основные методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний животных?

2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа)

Тема: «Экспериментальное заражение лабораторных животных»

2.2 Цель работы: познакомить студентов со способами заражения лабораторных животных.

2.2.2 Задачи работы:

1. Познакомить студентов со способами фиксации лабораторных животных..
3. Познакомить студентов со способами заражения лабораторных животных.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культура *E.coli*, выращенная на МПБ.
2. Стерильные шприцы, ножницы, скальпели, дезраствор, спиртовые тампоны.
3. Белые мыши.

2.2.4 Описание работы

Способы заражения лабораторных животных. В зависимости от цели исследования и предполагаемого возбудителя выбирают восприимчивое лабораторное животное и подбирают способ его заражения. Взвесь микробной культуры или суспензию из зараженных органов осторожно набирают в шприц, после чего конец иглы осторожно закрывают комочком ваты, смоченным 5% раствором хлорамина или спиртом. Повернув шприц иглой вверх, осторожно выпускают из него пузырьки воздуха. Загрязненную вату бросают в банку с дезраствором.

Внутрикожный способ применяется редко. Материал вводят тонкой иглой непосредственно в кожу области спины или живота в дозе 0,1-0,2 мл. чаще всего используют для обнаружения некротоксина (у стафилококков, у листерий и др.).

Подкожный способ заражения применяется при многих заболеваниях. Кожу животного захватывают пальцами и образовавшуюся складку прокалывают иглой шприца, материал вводят медленно. Затем опускают складку, на иглу накладывают вату,

смоченную дезраствором и быстро извлекают иглу. Наиболее часто подкожно заражают в область спины, крестца и живота. Доза в зависимости от вида микроба.

Внутримышечный способ – материал вводят в толщу мускулатуры обычно в области бедра, а птицам в грудную мышцу.

Внутрибрюшинный способ применяется часто. Животное фиксируют головой вниз, чтобы внутренние органы опустились к диафрагме. Материал вводят в задней части живота и прокалывают ее под острым углом, затем, повернув шприц под прямым углом, толчком прокалывают брюшную стенку при этом ощущается как бы провал иглы в полость живота.

Внутривенное заражение чаще всего проводят для выявления токсинов у микробов (при ботулизме, при энтеротоксемии). Кроликам материал вводят в краевую вену уха. Рукой сдавливают вену ближе у основания уха, вследствие чего вена лучше наполняется. Тонкой иглой прокалывают кожу и вену, иглу вводят по направлению к корню уха. Затем отнимают пальцы, сдавливающие вену, и медленно инъецируют материал. По окончании иглу прижимают ватой, пропитанной дезраствором, и вынимают. Мышам и крысам материал вводят в боковую вену хвоста, курам и голубям в подкрыльцовую вену.

Очень редко используют заражение через дыхательные пути, в пищеварительный тракт и в переднюю камеру глаза. Место введения в организм материала во всех случаях необходимо обработать, чтобы не внести в организм микробы, имеющиеся на коже животного. Для этого выстригают шерсть на месте введения, кожу протирают дезраствором. После введения материала кожу вновь протирают дезраствором.

Всех зараженных животных отмечают краской, сведения о заражении записывают в журнал. Кроликов помещают в клетки, морских свинок и мышей – в металлические биксы, наклеивают этикетки на которых указывают сведения о заражении.

Задания для самостоятельной работы

1. Ознакомиться с проявлением гемолитической, плазмокоагуляционной, гиалуронидазной активности микроорганизмов.
2. Освоить методы заражения лабораторных животных.

Контрольные вопросы

1. Какими методами заражают лабораторных животных?
2. Какова техника внутривенного и внутрибрюшинного заражения?

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа)

Тема: «Лабораторная диагностика стафилококкозов и стрептококкозов»

2.3.1 Цель работы: познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики стафилококкозов и стрептококкозов.

2.3.2 Задачи работы:

1. Дать представления о заболеваниях, вызываемых стафилококками и стрептококками.
2. Познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики стафилококкозов и стрептококкозов.
3. Освоить микроскопический, бактериологический методы исследования.

2.25.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культуры *S.aureus*, *S.saprophyticus* на МПА, кровяном МПА, в МПБ.
2. Результаты тестов на плазмокоагуляционную, лецитиназную, гемолитическую активность, тест-системы для биохимической идентификации.
3. Набор красок для окраски по Граму, световые микроскопы бинкулярные XSP-103P, спиртовые горелки, предметные стекла, бактериологические петли.
4. Готовые микропрепараты с различными видами стрептококков.

2.25.4 Описание работы

Стафилококкозы Заболевания, встречающиеся у многих видов млекопитающих, в том числе и у человека. Патогенные стафилококки - вызывают гнойно-воспалительные процессы различной локализации: местные – фурункулы, абсцессы и др.; в отдельных органах – маститы, эндометриты и др.; общее поражение – пиемия и септицемия, пищевые токсикозы (токсикоинфекции). Род *Staphylococcus* входит в семейство *Micrococcaceae*. При патологиях чаще всего выделяют: *St.aureus*, *St.epidermisticus*, *St.saprophyticus*. В связи с ухудшением экологической ситуации в большинстве стран и связанным с ней снижением естественного иммунитета участились случаи гнойно-септических поражений тканей и органов, вызванных коагулазоотрицательными видами, которые встречаются на коже и слизистых оболочках человека и животных (*S.auricularis*, *S.capitis*, *S.cohnii*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.lentus*, *S.schleiferi*, *S.simulans*, *S.wamari*, *S.xylosus*). Факторы патогенности стафилококков: факторы адгезии; факторы, препятствующие фагоцитозу (микрокапсула, протеин А); ферменты агрессии (нейраминидаза, фибринолизин, гиалуронидаза, лецитовителлаза); экзотоксины (гемолизины, некротоксины, энтеротоксины).

Материал для исследования: раневой экссудат, гной абсцессов, ран, молоко при маститах, выделение из половых органов при эндометритах, кровь при септицемии.

Микроскопия. Методы окраски: простой метод и по Граму; микрокартина: шаровидные клетки располагаются беспорядочно, диаметр 0,5-1,5 мкм; грамположительные; спор не образуют; капсулу не образуют (за исключением патогенных штаммов *S.aureus*), спор не образуют.

Культивирование: посев на питательные среды: МПА, МПБ, МПА с 15% хлорида натрия, кровяной МПА, ЖСА, МЖСА.

Особенности выделения чистой культуры: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов. Культуральные свойства: на МПА – колонии округлые, диаметром 2-5 мм, с ровным краем, могут быть окрашены в золотистый цвет (*S.aureus*), белый (*S. epidermidis*), лимонно-желтый (*S.saprophyticus*). На жидких средах: на МПБ – равномерное помутнение с выпадением рыхлого хлопьевидного осадка.

Биохимические свойства (ферментативная активность): ферментация маннита без газа (в анаэробных условиях); гемолиз на кровяных средах; ДНК – азная активность; рост на элективных средах; плазмокоагуляция. На ЖСА вокруг колоний стафилококков, обладающих лецитиназной активностью, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком..

Из культур, выросших на питательных средах, готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении бактерий с типичными для стафилококков культурально-морфологическими признаками приступают к изучению свойств, прямо или косвенно свидетельствующих о патогенности выделенного стафилококка.

Патогенные стафилококки в отличие от непатогенных образуют капсулу (*S. aureus*), выделяет гемолизин, фибринолизин (стафилокиназу), гиалуронидазу, плазмокоагулазу, желатиназу, ДНК-азу, лецитиназу, ферментируют маннит. Важнейшим из перечисленных факторов считают плазмокоагулазу: у 90...95 % плазмокоагулирующих стафилококков выражена способность продуцировать энтеротоксин.

Биопроба. Заражают лабораторных животных для подтверждения токсигенных свойств выделенного стафилококка. Летальный токсин выявляют внутривенным введением кролику фильтра бульонной культуры 0,75 мл на 1 кг массы.

Некротоксин обнаруживают внутрикожной пробой. Готовят суспензию суточной культуры в физиологическом растворе с концентрацией клеток $4,2 \cdot 10^9$ /мл и $1 \cdot 10^9$ /мл. Каждое разведение культуры по 0,1 мл вводят внутрикожно кролику, предварительно удалив шерстный покров на месте инъекции. Результаты учитывают ежедневно на протяжении 4...5 сут. В положительных случаях развивается некроз кожи.

Энтеротоксин продуцируют токсигенные штаммы. Пробу на энтеротоксин ставят при отравлениях. Культуру стафилококка выращивают на специальной питательной среде (пептон, хлорид кальция, хлорид магния, дигидрофосфат калия, 0,8 % агар-агара, pH 7,2), в атмосфере, содержащей 20 % оксида углерода (IV), в течение трех суток. Затем культуру стерилизуют фильтрованием, 10...15 мл фильтрата смешивают с равным объемом молока и скармливают 4...8-недельным котяткам. При наличии энтеротоксина через 1..2ч у животных возникают симптомы гастроэнтерита и рвота.

Биопроба для определения свойств: летальных – на кроликах; дерматонекротических – на кроликах; токсических – на котятках

Серологическая диагностика в ветеринарии не используется

Стрептококкозы. Инфекционные болезни, вызываемые бактериями рода *Streptococcus*, к которому относят 29 видов. Наибольшее значение в патологии сельскохозяйственных животных имеют следующие виды: *S. pneumoniae* — возбудитель стрептококковой (диплококковой) септицемии молодняка сельскохозяйственных животных; *S. equi*, включающий в себя три подвида: *S. equi subsp. equi* — возбудитель мыта лошадей; *S. equi subsp. equisimilis* и *S. equi subsp. zooepidemicus*, который вызывает септические инфекции у других видов животных; *S. agalactiae* и *S. dysagalactiae* — этиологические агенты маститов крупного рогатого скота; *S. pyogenes* — возбудитель ряда заболеваний, преимущественно человека. Многие стрептококки, патогенные для животных, пока идентифицированы на уровне серологической группы и не получили видовых наименований.

Лабораторная диагностика стрептококкозов основана на результатах бактериологического исследования. Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры посевом на питательные среды или методом биопробы, идентификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным признакам (методом биопробы).

Материал для исследования. При подозрении на мыт прижизненно берут носовые истечения, содержимое абсцессов лимфатических узлов (путем пункции), для посмертной диагностики — кровь из сердца, части печени, селезенки, легких. При стрептококковых маститах исследуют молоко, при подозрении на септические стрептококкозы (диплококковая инфекция и др.) — кровь из сердца, селезенку, печень, костный мозг, носовые истечения.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Мазки окрашивают по Граму и на капсулу, микроскопируют. Все стрептококки представляют собой сферические или овальные грамположительные клетки диаметром 0,5...1,25 мкм, без спор и жгутиков, с тенденцией к образованию цепочек различной длины. Морфология стрептококков некоторых видов в препаратах из патологического материала несколько отличается. У *S. pneumoniae* клетки обычно парные, окруженные капсулой, концевые части клеток слегка удлинены, поэтому данный стрептококк ранее называли ланцетовидным диплококком. Клетки *S. pneumoniae* также могут располагаться единично и короткими цепочками. *S. equi* в мазках из гноя обнаруживают в виде длинных цепочек, причем клетки в цепочке как бы сплюснены в горизонтальной плоскости, образуют капсулу; в мазках из культуры клетки *S. equi* чаще располагаются короткими цепочками, единично, парами. *S. agalactiae* и *S. pyogenes* в препаратах из материала чаще обнаруживают в виде цепочек.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Стрептококки — факультативные анаэробы, температурный оптимум 37 °С (диапазон 25... 45 °С). На общепринятых питательных средах растут плохо, обычно используют обогащенные среды: МПБ с 1 % глюкозы и 10 % инактивированной сыворотки крови лошади, МПА с 1 % глюкозы и 5 % крови барана или кролика. Для выделения культуры возбудителя исследуемый материал высевает на указанные питательные среды и культивируют

18...24 ч. На глюкозо-кровяном МПА все виды патогенных стрептококков образуют мелкие колонии, чаще с зоной гемолиза. У *S. pneumoniae* колонии круглые, полупрозрачные, плоские, с приподнятым центром и краями, с зоной гемолиза типа «альфа»; в МПБ растет с равномерным помутнением среды. *S. equi* формирует мелкие, розинчатые, слизистые, правильной круглой формы колонии с узкой зоной бета-гемолиза, позднее они становятся серо-белыми, непрозрачными; в МПБ растет с помутнением среды, образованием пушистых хлопьев, через 3...5 сут культивирования бульон просветляется, на дне пробирки образуется осадок. У *S. agalactiae* (*S. dysagalactiae*) мелкие, сероватые, просвечивающие колонии с бета- или двойной зоной альфа-гемолиза, при росте в МПБ среда остается прозрачной, формирующиеся крупинки оседают на дно пробирки. *S. pyogenes* на кровяном МПА образует мелкие, прозрачные, правильной круглой формы колонии с зоной бета-гемолиза, в бульоне растет с просветлением среды и выпадением зернистого осадка.

На следующем этапе из выделенных культур готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении типичных по морфологии и тинкториальным свойствам клеток бактерий переходят к следующему этапу. Чтобы исключить стафилококковую, энтерококковую (род *Enterococcus*) инфекции, чистую культуру исследуют в нескольких пробах. Ставят тест на каталазу — стафилококки образуют каталазу, стрептококки нет. С целью дифференциации пиогенных гемолитических стрептококков от энтерококков культуры высевают в МПБ, содержащий 40 % желчи крупного рогатого скота, МПБ с 6,5 % хлорида натрия. Энтерококки в отличие от гноеродных стрептококков растут на этих средах. Также проверяют чувствительность клеток культуры к желчи: в пробирку с МПБ, содержащим 10 % желчи крупного рогатого скота, вносят 0,5 мл исследуемой суточной бульонной культуры и выдерживают при 37 °C 1 ч. При лизисе содержимое пробирки просветляется, энтерококки не лизируются. Параллельно изучают ферментативные свойства стрептококков.

Серогрупповую принадлежность выделенного микроба определяют в реакции преципитации. В РП используют стрептококковые групповые преципитирующие сыворотки. Исследуемую культуру выращивают в МПБ в течение 18...20 ч, затем 7...9 мл культуры центрифугируют, надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 0,3...0,4 мл 0,2 н. раствора соляной кислоты, осадок суспендируют, взвесь прогревают в кипящей водяной бане 10 мин, охлаждают, добавляют каплю 0,04%-го спиртового раствора фенолфталеина и нейтрализуют 0,2 н. раствором гидроксида натрия. Жидкость приобретает бледно-розовый цвет. Затем смесь вновь центрифугируют и надосадочную жидкость, содержащую термостабильный полисахаридный антиген С, используют как антиген для постановки реакции коагглюляции. По классификации Ленсфильд стрептококки на основании антигенных свойств полисахарида С можно отнести к той или иной серологической группе: А, В, С, D и т.д. *S. pneumoniae* не содержит серогрупповой полисахарид, но является антигенно-гетерогенным видом, который дифференцируют на типы в РА.

Биопроба. У выделенных культур стрептококков определяют патогенные свойства в биопробе на белых мышах. Для заражения используют только свежевыделенные штаммы в виде 18...20-часовых бульонных культур, которые по 0,5 мл вводят внутрибрюшинно трем мышам. Культуру признают патогенной при гибели не менее двух мышей.

В случае инфекции, вызываемой *S. pneumoniae*, практикуют выделение возбудителя из исследуемого материала методом биопробы. С этой целью тканевую суспензию, разведенную стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:2, вводят внутрибрюшинно белым мышам по 0,5 мл. В положительных случаях мыши погибают через 1...2 сут.

Биопрепараты. Вакцина против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят, ассоциированная (поливалентная) вакцина против паратифа, пастереллеза и диплококковой септицемии поросят включает в себя кроме *P. multocida* и *S. choleraesuis*

бактериальную массу *S. Pneumoniae*, сыворотку против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят.

Задания для самостоятельной работы

1. Приготовить мазки из культур стафилококков, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
2. Описать культуральные свойства стафилококков.
3. Изучить ферментативные свойства стафилококков.
4. Промикроскопировать готовые микропрепараты со стрептококками и зарисовать.
5. Заполнить протокол исследования.

Протокол исследования

Описание культуральных свойств стафилококков	Идентификация вида стафилококка по биохимическим свойствам

Контрольные вопросы

1. Каковы основные виды патогенных стафилококков?
2. Каковы морфологические, культуральные, биохимические свойства стафилококков?
3. Как дифференцировать патогенные виды от непатогенных?
4. Каковы основные виды патогенных стрептококков?
5. Каковы культуральные, морфологические и тинкториальные свойства стрептококков?
6. Какие биопрепараты выпускают против диплококковой септицемии молодняка сельскохозяйственных животных?

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа)

Тема: «Лабораторная диагностика рожи свиней и листериоза»

2.4.1 Цель работы: познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики рожи свиней и листериоза.

2.4.2 Задачи работы:

1. Дать представления о заболеваниях.
2. Познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики рожи свиней и листериоза.
3. Освоить микроскопический, бактериологический, серологический методы исследования при этих заболеваниях.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культуры вакцинного штамма возбудителя рожи свиней, выращенного на МПА, МПБ, культуры вакцинного штамма возбудителя листериоза, выращенного на МПА, МПБ.
2. Готовые диффранды для описания биохимических свойств возбудителей, сыворотка противорожистая для постановки РА на стекле.
3. Набор красок для окраски по Граму, световые микроскопы бинкулярные XSP-103P, спиртовые горелки, предметные стекла, бактериологические петли.

2.4.4 Описание работы

Возбудитель рожи свиней - бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Вызывает инфекционную болезнь, характеризующуюся при остром течении септициемией и воспалительной эритемой кожи, при хроническом - эндокардитом и артритом. Болеют

животные преимущественно в возрасте 3-12 мес. Бактерию открыли Л. Пастер и Л. Тюилье в 1882 г. Представитель отдела Firmicutes и рода Erysipelothrix . Рожь свиней - инфекционная болезнь, характеризующаяся при остром течении септициемией и воспалительной эритемой кожи, при подостром – «крапивницей», при хроническом – эндокардитом и артритом.

Материал для исследования: труп целиком, паренхиматозные органы, сердце, трубчатая кость.

Микроскопирование (метод, по Граму). Микрокартина: тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки до 1,5 мкм, грамположительные; спор и капсулу не образуют; неподвижны.

Культивирование. Посев на питательные среды: МПА, МПБ, МПЖ, ПЖА, среда Сент-Иваньи (МПА с 0,1% кристаллвиолета и 1% азида натрия). Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов – до 48 часов. Культуральные свойства: на МПА – мелкие, розинчатые, прозрачные колонии, на МПБ – легкое помутнение, на МПЖ – равномерные отростки, отходящие от центрального стержня.

Биохимические свойства: обладают сахаролитическими свойствами, не расщепляют салицин; образуют сероводород.

Биопроба: заражают белых мышей, голубей, кроликов.

Серологический метод: РА выделенная культура с лечебной сывороткой 1:50, РИФ.

Биопрепараты. Сухая и жидкая живые вакцины против рожи свиней из штамма ВР-2, лечебно профилактическая противорожистая сыворотка.

Листерия характеризуется септическими явлениями, поражением центральной нервной системы и генитального аппарата. Возбудитель листериоза был выделен в 1892 г. Лусетом от больных кроликов. В 1927 г. Пири выделил возбудителя при септическом заболевании крысоподобных грызунов с типичным поражением печени и назвал его «листерелла», но в 1940 г. он переименовал его на «листерия». По современной классификации род *Listeria* насчитывает пять видов. Основной вид - *Listeria monocytogenes* - вызывает болезнь у животных многих видов и человека.

Материал для исследования: при жизни: молоко, абортированный плод, плодные оболочки; посмертно - труп целиком, лимфатические узлы, паренхиматозные органы, головной мозг.

Микроскопия (методы окраски по Граму). Микрокартина: тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки до 1,5 мкм, грамположительные; спор и капсулу не образуют; подвижны (культивирование при 20...22 градусах). Культивирование. Посев на питательные среды: МПА, МПБ, печеночный бульон, на кровяной МПА, МПА с теллуридом калия и полимиксином, среды, содержащие 10% хлорида натрия.

Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов – до 48 часов.

Культуральные свойства: на МПА – мелкие, розинчатые, прозрачные колонии, на МПБ – легкое помутнение с образованием через 5-7 суток слизистого осадка.

Биохимические свойства: обладают сахаролитическими свойствами (расщепляют салицин, мальтозу, лактозу, трегалозу); не образуют сероводород, образует каталазу, обладает редуцирующими свойствами.

Биопроба: заражают белых мышей, морских свинок, кроликов.

Серологический метод: РА, РИФ, РСК, ИФА.

Биопрепараты. Сухая вакцина против листериоза с/х животных из штамма АУФ, листериозная сыворотка.

Задания для самостоятельной работы

1. Приготовить мазки из культур возбудителей рожи свиней и листериоза, окрасить по Граму, промикроскопировать, зарисовать.

2. Изучить культуральные и биохимические свойства возбудителей, заполнить протокол.
3. Поставить капельную РА для идентификации возбудителя рожи свиней.
4. Ознакомится с биопрепаратами.

Протокол исследования

Морфологические свойства <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Культуральные свойства <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Биохимические свойства <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителей рожи свиней?
2. Каковы основные этапы лабораторной диагностики рожи свиней?
3. Какие серологические реакции используются для диагностики рожи свиней?
4. Каковы морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителей листериоза?
5. Каковы основные этапы лабораторной диагностики листериоза?
6. Какие серологические реакции используются для диагностики листериоза?

2.5 Лабораторная работа № 5 (2 часа)

Тема: «Лабораторная диагностика туберкулеза»

2.5.1 Цель работы: познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики туберкулеза.

2.5.2 Задачи работы:

1. Дать представления о заболеваниях – туберкулезе.
2. Познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики заболевания.
3. Освоить микроскопический метод исследования.
4. Познакомить студентов с аллергической диагностикой туберкулеза.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культуры вакцинного штамма БЦЖ, выращенного на среде Левенштейна-Йенсена.
2. Готовые микропрепараты, табличный материал.
3. Набор красок для окраски по Цилю-Нильсену, световые микроскопы бинкулярные XSP-103P, спиртовые горелки, предметные стекла, бактериологические петли.

2.5.4 Описание работы

Туберкулез - инфекционная, хронически протекающая болезнь человека, животных, в том числе птиц. Патологоанатомически характеризуется образованием в различных органах и тканях туберкулов. Возбудители туберкулеза относятся к роду *Mycobacterium* (лат. *mycos* - гриб, *bacterium* - палочка) включает в себя 49 видов как патогенных, так и непатогенных. К патогенным относят микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*M. tuberculosis*), животных (*M. bovis*), птиц (*M. avium*)

Материал для исследования: молоко, моча, слизь, пораженные органы и ткани. Обсемененность патологического материала часто незначительная, поэтому материал предварительно обрабатывают по следующей методике: кусочки органов и тканей измельчают, заливают 3...10%-м раствором серной кислоты в соотношении 1 : 4, пробу центрифугируют при 3000 об/мин 10... 15 мин. Осадок суспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и используют для посевов и приготовления мазков для микроскопии.

Микроскопия. Микобактерий — прямые или слегка изогнутые палочковидные клетки размером (0,2...0,6) x (1...10) мкм, без спор, капсул и жгутиков; грам-положительные, кислото- и спиртоустойчивые. Кислотоустойчивость связана с присутствием в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты (до 60 %), в связи с чем, бактерии туберкулеза (и паратуберкулеза) плохо воспринимают окраску. Для окрашивания микобактерий применяют специальные методы, самый распространенный — метод Циля—Нильсена. По Цилю-Нильсену микобактерий окрашиваются в ярко-красный цвет, все остальные микроорганизмы — в синий. Более результативна люминесцентная микроскопия (окраска аурамин-родамином), благодаря которой выявляют даже незначительное количество микобактерий, которые окрашены в бело-желтый цвет.

Культивирование. Микобактерии — аэробы, температурный оптимум 37...38 °С, pH 6,4...7. Растут медленно. Для культивирования микобактерий туберкулеза используют сложные питательные среды, содержащие глицерин, картофель, яйца, витамины, аспарагиновая кислота, альбумин, глюкоза, биотин, никотиновая кислота, соли аммония и др. Наиболее часто применяют среды: Петраньяни, Левенштейна—Иенсена, Гельберга, Моделя, Сотона, при внутрилабораторных пересевах — глицериновый картофель и глицериновый МПБ. Рост микобактерий бычьего вида на плотных средах чаще обнаруживают на 20...60-е сутки, человеческого вида — на 14...40-е сутки, птичьего — на 10...20-е сутки. *M. bovis* на плотных питательных средах формирует мелкие гладкие шаровидные колонии цвета слоновой кости, иногда с морщинистым сероватым налетом. На жидких средах образует пленку на поверхности сначала в виде единичных островков, позднее — сливающихся в сплошную пленку.

M. tuberculosis на плотных питательных средах дает рост в виде сухого морщинистого налета кремового цвета. У колоний приподнятый центр, они крошковидные, с приятным запахом, по виду напоминают цветную капусту, плохо смачиваются водой. На жидких средах рост наблюдают на 5...7-е сутки в виде сухой морщинистой пленки, поднимающейся на края пробирок, среда остается прозрачной. На жидких средах и при внутриклеточном развитии образуется корд-фактор (трегалоза-6,6-дипиколат), способствующий сближению бактериальных клеток в микроколониях и их расположению в виде серпантинообразных кос, что можно наблюдать при микроскопическом исследовании. *M. avium* на плотных яичных средах растет в виде гладкого маслянистого налета. Колонии округлые, слизистые, мягкие, серовато-белые, с возрастом желтеют, иногда образуют возвышение в виде пуговицы с кратерообразным углублением. При первичной изоляции из патологического материала колонии плоские и полупрозрачные. В жидких питательных средах возбудитель дает диффузный рост с формированием влажной жирной пленки и образованием рыхлого осадка

Биохимические свойства: тесты для биохимической дифференциации микобактерий: ниаминовый тест, реакция восстановления нитратов, амидазная проба, каталазная и арилсульфатазная активность, рост на среде с салицилатом натрия, разрушение салицилата натрия, ПАСК, использование нитрата как единственного источника азота, устойчивость к 5 %-ному хлориду натрия, пикриновой кислоте, сахаролитическая активность, гидролиз твина-80 и др.

Биопроба.. Для этого используют двух кроликов массой не менее 1,5-2 кг которым в краевую вену уха вводят суспензию культуры микобактерий на физиологическом растворе. Первому вводят 0,1; второму - 0,01 мг бактериальной массы. *Mycobacterium bovis* на протяжении 3 мес вызывает генерализованное поражение бугорковой формы. При заражении *Mycobacterium tuberculosis* за этот же период возникают нетипичные туберкулезные очажки регрессивного характера. *Mycobacterium avium* вызывает у кроликов септическую форму болезни без образования специфических патологоанатомических изменений с летальным исходом в течение 2-3 нед. Заражение двух морских свинок такими же дозами культуры позволяет дифференцировать *Mycobacterium avium*, к которым они нечувствительны, от *Mycobacterium tuberculosis* и

Mycobacterium bovis, которые вызывают у них прогрессивные туберкулезные изменения. У кур, зараженных внутривенно дозой в 1 мг бактериальной массы, *Mycobacterium avium* вызывают туберкулезные поражения селезенки, печени и кишечника. Куры к *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* менее чувствительны.

Серологическая диагностика. Используют реакцию связывания комплемента (РСК) с антигенами УНИИЭВ и СибНИВИ; реакцию пассивной, или непрямой, гемагглютинации (РПГА); реакцию кольцепреципитации; реакцию диффузной преципитации в геле (РПГ).

Аллергическая диагностика. Применяют сухой очищенный туберкулин (протеин-пурифицированный-дериват - ППД). В ветеринарии используют стандартизированный сухой очищенный туберкулин для млекопитающих и сухой очищенный туберкулин (ППД) для птиц, который применяют для диагностики у птиц и свиней.

Биопрепараты. В ветеринарной практике от вакцины БЦЖ отказались.

Задания для самостоятельной работы

1. Приготовить мазки из культуры вакцинного штамма БЦЖ, окрасить по Цилю-Нильсену, промикроскопировать, зарисовать, заполнить протокол.
2. Изучить культуральные и биохимические свойства возбудителей.
3. Изучить аллергическую диагностику туберкулеза и паратуберкулеза.
4. Ознакомиться с биопрепаратами.

Протокол исследования

Морфология возбудителя	Вид в мазке

Контрольные вопросы

1. Каковы морфологические, культуральные и биохимические свойства возбудителя туберкулеза?
2. Какие основные этапы лабораторной диагностики туберкулеза?
3. Как называются аллергены, используемые при аллергической диагностике этого заболевания?

2.6 Лабораторная работа № 6 (2 часа)

Тема: «Лабораторная диагностика сибирской язвы»

2.6.1 Цель работы: познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики сибирской язвы.

2.6.2 Задачи работы:

1. Дать представления о сибирской язве.
2. Познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики сибирской язвы.
3. Освоить микроскопический, бактериологический и серологический методы исследования.

2.30.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культура *B. subtilis*, выращенная на МПА, в МПБ, готовые микропрепараты возбудителя сибирской язвы, сибиреязвенная сыворотка, сибиреязвенный преципитиноген.
2. Пробирки Уленгута, пастеровские пипетки, спиртовые горелки,

бактериологические петли, набор красок для окраски по Граму, световые микроскопы бинокулярные XSP-103P, предметные стекла.

3. Табличный материал.

2.30.4 Описание работы

Сибирская язва (Anthrax) - зооантропоноз. К ней восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, и человек. Болезнь протекает преимущественно остро с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов. Регистрируют в виде спорадических случаев, возможны энзоотии и эпизоотии.

Возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis* - относится к семейству *Bacillaceae*.

Морфология. *Bacillus anthracis* - неподвижная, грамположительная (в молодых и старых культурах встречаются и грамотрицательные клетки), образующая капсулу (в организме или при культивировании на искусственных питательных средах с большим содержанием нативного белка и CO₂) и спору палочка, размером 1-1,3 x 3,0-10,0 мкм. При температуре ниже 12 и выше 42°C, а также в живом организме или не вскрытом трупе, в крови и сыворотке животных споры не образуются. В окрашенных препаратах из крови и тканей больных или погибших от сибирской язвы животных бактерии располагаются одиночно, попарно и в виде коротких цепочек по 3-4 клетки; концы палочек, обращенных друг к другу, прямые, резко обрубленные, свободные - слегка, закругленные. Иногда цепочки имеют форму бамбуковой трости. В мазках из культур на плотных и жидких питательных средах палочки располагаются длинными цепочками.

Культивирование. *Bacillus anthracis* по способу дыхания относят к факультативным анаэробам, хорошо растет на универсальных средах (МПБ, МПА, МПЖ, картофеле, молоке). Оптимальная температура роста на МПА 35-37°C, в бульоне 32-33°C. При температуре ниже 12 и выше 45°C не растет. Оптимум pH сред 7,2-7,6. На поверхности МПА в аэробных условиях при температуре 37°C 17-24-часовые культуры состоят из серовато-беловатых тонкозернистых с серебристым оттенком, похожих на снежинки колоний, имеющих шероховатый рельеф и характерных для типичных вирулентных штаммов (R-форма). Диаметр колоний не превышает 3-5 мм. На сывороточном агаре и свернутой лошадиной сыворотке в присутствии 10-50% углекислоты колонии гладкие полупрозрачные (S-форма), а также слизистые (мукоидные), тянущиеся за петлей (M-форма), состоящие из капсульных палочек. В МПБ *Bacillus anthracis* через 16-24 ч на дне пробирки образует рыхлый белый осадок, надосадочная жидкость остается прозрачной, при встряхивании бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья (R-форма).

При посеве в столбик желатина на 2-5-е сут появляются желтовато-белый стержень. Культура напоминает елочку, перевернутую верхушкой вниз. Постепенно верхний слой желатин начинает разжижаться, принимая сначала форму воронки, затем мешочка. *Bacillus anthracis* при росте в молоке вырабатывает кислоту и через 2-4 дня свертывает его и пептонизирует сгусток.

Биохимические свойства. Ферменты *Bacillus anthracis*: липаза, диастаза, протеаза, желатиназа, дегидраза, цитохромоксидаза, пероксидаза, каталаза, лецитиназа и др. Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, фруктозу и декстрин. На средах с глицерином и салицином возможно слабое кислотообразование. Арабинозу, рамнозу, галактозу, маннозу, раффинозу, инулин, маннит, дульцит, сорбит, инозит не сбраживает. Утилизирует цитраты, образует ацетилметилкарбинол (реакция Фогеса - Проскауэра положительная). Выделяет аммиак. Редуцирует метиленовый синий и восстанавливает нитраты в нитриты. Некоторые штаммы образуют сероводород.

Для лабораторного исследования на сибирскую язву направляют ухо павшего животного.

Бактериоскопия. Из патологического материала для микроскопии готовят мазки, часть красят по Граму и обязательно на капсулы по Михину и Ольту. Обнаружение

типичных по морфологии капсульных палочек является важным диагностическим признаком. Посев на питательные среды. Исходный материал засевают в МПБ и на МПА (рН 7,2-7,6), инкубируют посевы при температуре 37°C в течение 18-24 ч, при отсутствии роста их выдерживают в термостате еще 2 суток.

Биологическая проба. Осуществляется на белых мышах, морских свинках, кроликах, одновременно с посевом материала на питательные среды. Белых мышей заражают подкожно в заднюю часть спины (по 0,1-0,2 мл), морских свинок и кроликов - под кожу в область живота (по 0,5-1,0 мл). Мыши погибают через 1-2 сут, морские свинки и кролики - через 2-4 сут. Павших животных вскрывают, делают мазки и посевы из крови сердца, селезенки, печени и инфильтрата на месте инъекции исследуемого материала.

Дифференциальная диагностика. Возбудителя сибирской язвы следует дифференцировать от сапрофитных бацилл: *B.cereus*, *B.megaterium*, *B.mycoides* и *B.subtilis* на основе главных и дополнительных признаков. К главным признакам относятся патогенность, капсулообразование, тест «жемчужного ожерелья», лизабельность фагом, иммунофлюоресцентный тест. Дополнительными являются подвижность, отсутствие гемолиза, лецитиназная активность, образование фосфатазы.

Серологическое исследование. Для обнаружения сибирезывенных антигенов при исследовании кожевенного и мехового сырья, загнившего патологического материала, а также свежего патологического материала и серологической идентификации выделенных культур применяют реакцию преципитации по Асколи. В качестве серологического теста, главным образом для изучения антигенного спектра *Bacillus anthracis*, применяют реакцию диффузионной преципитации (РДП). Используют РИФ, ИФА.

Биопрепараты. Живая вакцина против сибирской язвы из штамма № 55, ассоциированная живая жидкая вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота, лечебно-профилактическая сибирезывенная сыворотка.

Задания для самостоятельной работы

1. Промикроскопировать готовые мазки с *Bacillus anthracis*, зарисовать.
2. Приготовить мазки из культур *B. subtilis*, окрасить их по Граму, промикроскопировать.
3. Описать колонии *B. subtilis*, заполнить протокол.
4. Посмотреть фильм о сибирской язве.

Протокол исследования

№	Форма	Диаметр, мм	Цвет	Поверхность	Профиль	Край	Структура	Консистенция	Запах
---	-------	-------------	------	-------------	---------	------	-----------	--------------	-------

Контрольные вопросы

1. Каковы правила взятия патологического материала?
2. Какие методы применяют для бактериологической диагностики сибирской язвы?
3. Каковы морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *B.anthraxis*?
4. На чем основана дифференциация *B.anthraxis* от сапрофитных спорообразующих аэробов?
5. Как идентифицируют возбудителя сибирской язвы при помощи сибирезывенного бактериофага?
6. Что такое феномен «ожерелья»?
7. Какие серологические методы применяют для обнаружения сибирезывенного антигена в исследуемом материале?

2.7 Лабораторная работа № 7 (2 часа)

Тема: «Лабораторная диагностика клостридиозов»

2.7.1 Цель работы: познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики клостридиозов.

2.7.2 Задачи работы:

1. Дать представления о сибирской язве.
2. Познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики сибирской язвы.
3. Освоить микроскопический, бактериологический и серологический методы исследования.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культура *B. subtilis*, выращенная на МПА, в МПБ, готовые микропрепараты возбудителя сибирской язвы, сибиреязвенная сыворотка, сибиреязвенный преципитиноген.
2. Пробирки Уленгута, пастеровские пипетки, спиртовые горелки, бактериологические петли, набор красок для окраски по Граму, световые микроскопы бинокулярные XSP-103P, предметные стекла.
3. Табличный материал.

2.7.4 Описание работы

Эмфизематозный карбункул - острая неконтагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся развитием крепитирующих отеков в массивных группах мышц, хромотой и быстрой гибелью животных.

Возбудитель эмфизематозного карбункула — *C. chauvoei*, род *Clostridium*.

Лабораторная диагностика эмкара основана на результатах бактериологического исследования.

Материал для исследования. В лабораторию направляют кусочки пораженных мышц, экссудат из крепитирующего очага. Пораженный участок разрезают в глубину и из средней части мышцы отбирают кусочки ткани размером 3 см³. При вскрытии трупа берут также кусочки печени и селезенки, кровь сердца. Материал для лабораторного исследования отбирают не позднее чем через 4 ч после гибели животного. В жаркое время года материал консервируют стерильным 30%-м водным раствором глицерина.

Микроскопия препаратов из исходного материала. Грамположительные, полиморфные, спорообразующие, капсулу не образуют; подвижны.

Выделение и идентификация культуры возбудителя. Культивирование в среде Китта-Тароцци, и глюкозо-кровяной агар в чашках (агар Цейссlera).

Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 24-48 часов.

Культуральные свойства. На глюкозо-кровяного агара Цейссlera вырастают круглые, в виде перламутровой пуговицы или в форме виноградного листа, плоские, с ровным краем и приподнятым центром колонии, окруженные зоной прозрачного гемолиза; на жидких средах – пышный рост с газообразованием и легким помутнением.

Биохимические свойства: синтезирует протеазу, медленно разжижающую желатин; коагулирует молоко ; индол не образует; ферменты каталазу и лецитиназу не вырабатывает; ферментирует сахарозу и не сбраживает салицин.

Биопроба: заражают морских свинок.

Столбняк. Острое инфекционное заболевание животных и человека, вызываемое токсином микроба *C. tetani*. Характеризуется повышенной возбудимостью и судорожными сокращениями мускулатуры тела, приводящими к асфиксии, развивается в результате попадания спор возбудителя в раны. К возбудителю восприимчивы все виды домашних животных, особенно чувствительны лошади. Болезнь может возникнуть после родовых

травм, кастрации, обрезания хвостов или пуповины у новорожденных, если при этих операциях были нарушены правила асептики и антисептики.

Возбудитель столбняка - *C. tetani*, род *Clostridium*.

В лабораторию для исследования направляют кусочки тканей из глубоких слоев раневых поражений, гной, выделения из ран. При генерализации процесса возбудитель можно обнаружить во внутренних органах, поэтому берут от трупа кусочки печени и селезенки массой по 20-30 г и 10 мл крови. При возникновении столбняка вследствие родов или аборта направляют выделения из влагалища и матки, а при подозрении - труп новорожденного животного.

Микроскопия. Микрокартина в мазке, окрашенном по Граму: тонкая палочка с закругленными концами, длиной 4 -8 мкм, шириной 0,4 - 0,6 мкм ; грамположительные, полиморфные; спора на концах бактериальной клетки, придающая ей форму барабанной палочки; капсулу не образуют; подвижны.

Культивирование. Китта-Тароцци, в МПБ, на МПА и глюкозо-кровяной агар в чашках (агар Цейслера). Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 36-38°C; срок культивирования 24-36 часов.

Культуральные свойства. На глюкозо-кровяного агара Цейслера вырастают нежные беловато-серые колонии с отростками и приподнятым центром, иногда в виде мелких круглых, напоминающих капельки росы; на жидких средах – интенсивное равномерное помутнение с незначительным газообразованием в виде единичных пузырьков.

Биохимические свойства: не сбраживает моносахариды и многоатомные спирты; могут ферментировать глюкозу; вызывают медленную ферментацию протеинов и пептонов до аминокислот.

Биопроба: заражают белых мышей и морских свинок. Биопробу проводят для обнаружения токсина в патологическом материале и культуре.

Серологическая диагностика. Применяют реакцию нейтрализации и непрямой гемагглютинации.

Ботулизм - это остро протекающий кормовой токсикоз, возникающий вследствие поедания кормов, содержащих токсин возбудителя. Заболевание проявляется параличом мышц глотки, языка, нижней челюсти и скелетных мышц. К ботулизму восприимчивы многие виды животных, в том числе птицы, а также люди. Из лабораторных животных — белые мыши и морские свинки.

Возбудитель ботулизма — *Clostridium botulinum* - вызывает остропротекающий кормовой токсикоз. Болезнь развивается вследствие воздействия ботулинического токсина на организм, характеризуется поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц.

Материал для исследования: кусочки пораженных мышц, отечный экссудат, кровь, взятые тотчас после гибели животного

Микроскопия. В мазках, окрашенных по Граму наблюдаются палочки с закругленными концами длиной 4-9 и ширине 0,6-0,8 мкм, располагающиеся одиночно или парами;

грамположительные, полиморфные; образуют споры, располагающиеся субтерминально, редко центрально; капсулу не образуют; подвижны.

Культивирование. В среде Китта-Тароцци на глюкозо-кровяном агаре в чашках (агар Цейслера). Особенности выделения возбудителя: строгий анаэроб; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 48-74 часа.

Культуральные свойства. На кровяном МПА – колонии крупные с корневидными отростками и зоной гемолиза; на жидких средах – помутнение среды с газообразованием, характерный запах прогорклого масла.

Биопроба: заражают белых мышей и морских свинок, ставится РН.

Задания для самостоятельной работы

1. Приготовить мазки из культур клостридий, окрасить их по Граму, промикроскопировать, зарисовать.
2. Описать культуральные свойства клостридий, используя дополнительно практикум.

Контрольные вопросы

1. Какой микроб является возбудителем эмфизематозного карбункула?
2. Какая реакция используется для определения типа токсина возбудителя ботулизма?

2.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа)

Тема: «Лабораторная диагностика эшерихиоза и сальмонеллёза»

2.8.1 Цель работы: познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики эшерихиоза (колибактериоза) и сальмонеллёза.

2.8.2 Задачи работы:

1. Дать представления о заболеваниях.
2. Познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики эшерихиоза и сальмонеллёза.
3. Освоить микроскопический, бактериологический и серологический методы исследования этих заболеваний.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культуры *E.coli*, выращенные на МПА, элективных средах (Эндо, Левина, Плоскирева), в МПБ.
2. Готовые микропрепараты из культур сальмонелл.
3. Пастеровские пипетки, спиртовые горелки, бактериологические петли, набор красок для окраски по Граму, световые микроскопы бинокулярные XSP-103P, предметные стекла.
4. Табличный материал.
5. Набор диагностических эшерихиозных сывороток для серотипизации *E.coli*, диагностический набор для серотипизации сальмонелл.

2.8.4 Описание работы

Эшерихиоз (колибактериоз) — это острая инфекционная болезнь. Проявляется профузным поносом, признаками тяжелой интоксикации и обезвоживанием организма. Болеет молодняк сельскохозяйственных животных многих видов, включая птиц. Эшерихиоз может протекать в энтеритной, септической и энтеротоксемической формах.

Возбудители колибактериоза (эшерихиоза) — патогенные варианты бактерии. *E. coli*, род *Escherichia*, семейство *Enterobacteriaceae*.

При энтеритной форме болезни возбудитель локализуется, в кишечнике и регионарных брыжеечных лимфоузлах; при септической форме — в крови, внутренних органах и тканях; при энтеротоксемической — в тонком отделе кишечника и брыжеечных лимфоузлах. Считают, что ведущая роль в развитии эшерихиоза принадлежит кишечным палочкам, адгезивные антигены которых (K 88, K 99, F 41, 987 P, A 20 и др.) обеспечивают прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам тонкого отдела кишечника с последующим их размножением в клетках, продуцированием энтеротоксинов и проникновением сначала в регионарные лимфоузлы, а затем в кровь.

Эшерихии в своем составе содержат 164 варианта О-антигена, 55 вариантов Н-антигена и 90 вариантов К-антигена.

О-Антиген (соматический) термостабильный, состоит из полисахаридно-липидно-протеинового комплекса, который определяет серогрупповую принадлежность бактерий (известно свыше 160 серологических групп эшерихий).

У поросят-отъемышей энтеротоксемическая форма колибактериоза называется отечной болезнью.

Лабораторная диагностика эшерихиоза основана на результатах бактериологического исследования. Бактериологическое исследование включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии, выделение чистой культуры, идентификацию возбудителя на уровне вида и определение его принадлежности к группе патогенных вариантов.

Материал для исследования. Для прижизненной диагностики колибактериоза в лабораторию направляют фекалии больных животных (не менее чем от 5 животных с одной фермы), не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами. Пробы фекалий массой 1 ...2 г от каждого животного берут из прямой кишки в стерильные пробирки с помощью прокипяченного резинового катетера.

Микроскопия. Мазки-отпечатки окрашивают по Граму. *E. coli* — палочковидная, грамотрица-тельная бактерия размером (0,3... 1) x (1...6) мкм, большинство штаммов подвижно, спор не образует, отдельные сероварианты образуют капсулу. Микробные клетки располагаются одиночно, парно или в виде коротких цепочек.

Культивирование. *E. coli* — факультативный анаэроб, температурный оптимум 37...38 °С, рН 7,2...7,4, к питательным средам нетребователен. Посевы из паренхиматозных органов делают на среду Эндо или Левина методом отпечатков или наносят материал на поверхность среды пастеровской пипеткой и равномерно растирают шпателем. Колонии эшерихий круглые, с ровными краями, с гладкой выпуклой поверхностью, размером 2...4 мм, малинового цвета — на среде Эндо и темно-фиолетового — на среде Левина. Часто у колоний отмечают металлический блеск. При подозрении на отечную болезнь поросят дополнительно делают высев на кровяной МПА, поскольку штаммы, вызывающие эту патологию, обычно синтезируют бета-гемолизин.

При обнаружении бактерий, типичных по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам для *E. coli* биохимические свойства не изучают, а сразу исследуют в РА на стекле с агглютинирующими антиадгезивными сыворотками, вначале с комплексной, а затем при получении положительного результата с моновалентными сыворотками. Культуры, выросшие на МПА, проверяют с сыворотками К 88, 987 Р и А 20, культуры со среды Минка -с сыворотками К 99 и F41. При положительной РА культуры относят к возбудителям эшерихиоза и прекращают исследование. При отсутствии эшерихий с адгезивными антигенами культуру идентифицируют на основании изучения ферментативных признаков.

Биохимические свойства. Для *E. coli* характерно расщепление глюкозы и лактозы с образованием кислоты и газа, выделение индола, отсутствие уреазы и неспособность утилизировать цитраты.

Серотипизация. У культур, идентифицированных как *E. coli*, устанавливают О-серогрупповую принадлежность как косвенный показатель патогенности или изучают патогенность в биопrobe на белых мышах, цыплятах. О-Серогруппу эшерихий устанавливают следующим образом. Культуры, выращенные на скошенном МПА при 37 °С в течение 18...20 ч, смывают физиологическим раствором, переносят в сухие стерильные пробирки, прогревают в водяной бане при 100 °С 1 ч для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антигенов или автоклавируют при 120 °С 2 ч для разрушения термостабильного А-антигена. Прогретую взвесь бактерий центрифугируют при 2000...3000 мин-1 10...15 мин и осадок используют в качестве антигена для постановки РА на стекле. РА на стекле ставится вначале с 4-мя с групповыми О-поливалентными сыворотками, а при положительной реакции с одной из них — с моновалентными О-сыворотками, входящими в состав этой поливалентной сыворотки.. Затем с моновалентной сывороткой, давшей положительную реакцию, ставят РА в пробирках в объеме 1 мл.

Биопроба. Готовят суспензию культуры в физиологическом растворе с концентрацией клеток 1×10^9 /мл по бактериальному стандарту мутности и вводят по 0,5 мл внутривенно трем белым мышам массой 14...16 г и трем цыплятам трех-четырехнедельного возраста (при исследовании материала от птиц). В случае гибели двух зараженных мышей и более или цыплят выделенную культуру считают патогенной.

Биопрепараты: вакцины: поливалентная гидроокисьалюминиевая формолтиомер-сальная против колибактериоза (эшерихиоза) поросят, телят и ягнят, вакцина поливалентная против сальмонеллеза и колибактериоза пушных зверей; коли-протектан ВИЭВ; сыворотка поливалентная против колибактериоза (эшерихиоза) сельскохозяйственных животных.

Сальмонеллезы - группа инфекционных болезней преимущественно молодняка с.х. животных и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой и профузным поносом, при хроническом – воспалением легких. У взрослых животных болезнь может протекать бессимптомно (сальмонеллоносительство), а у беременных самок возможны аборт. У человека могут возникать пищевые токсикоинфекции при употреблении продуктов, содержащих токсины сальмонелл.

Возбудитель относится к сем. Enterobacteriaceae, роду Salmonella. Сероварианты сальмонелл, имеющих наибольшее значение в патологии животных: S. enteritidis (dublin) - у телят; S. choleraesuis (suipestifer) - у поросят; S. typhimurium - у свиней; S. typhimurium - у водоплавающей птицы; S. abortusequi - аборт кобылы; S. abortusovis - у овец; S. pullorum (S.gallinarum) - у птиц.

Материал для исследования: при жизни – кал, сыворотка крови; посмертно – трупы мелких животных и птиц, паренхиматозные органы, мезентеральные лимфатические узлы, абортированный плод.

Микроскопия: палочки с закругленными концами до 4 мкм, располагаются одиночно или парно; грамтрицательные; спор не образуют; капсулу не образуют; подвижны (за исключением S.pullorum).

Культивирование: посев на питательные среды: МПА, МПБ, дифференциально-диагностические (Эндо, Левина, висмут-сульфит-агар), накопительные (Кауфмана, Мюллера). Особенности выделения возбудителя: факультативные анаэробы; оптимальная температура 37°C; срок культивирования 18-20 часов.

Культуральные свойства: на МПБ – интенсивное помутнение, образование легко разбивающегося осадка, на МПА – сочные, круглые с ровными краями серо-белого цвета колонии, на среде Эндо – бесцветные или розоватые колонии, на среде Левина – светло-фиолетовые колонии. После выделения чистой культуры лактозотрицательных бактерий устанавливают их родовую принадлежность, затем дифференцируют до вида и сероварианта. С этой целью изучают их биохимические свойства и антигенное строение путем постановки пластинчатой реакции агглютинации (серологическая дифференциация).

Биохимические свойства: обладают высокой сахаролитической активностью; для установления родовой принадлежности проводят посевы на короткий «цветной ряд» (среды Гисса) при этом сальмонеллы ферментируют глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа, не расщепляют лактозу и сахарозу; дальнейшее изучение для установления видовой принадлежности проводят путем посевов на длинный «цветной ряд», в состав которого входят углеводы, и другие тесты; сальмонеллы не разжижают желатин, образуют сероводород, не образуют индол; дают положительную реакцию с метиловым красным: среда окрашивается в розово-красный цвет, отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра – желтое окрашивание среды.

Биопроба: в необходимых случаях заражают подкожно белых мышей.

Серологический метод. Используют РА с сывороткой крови (кровью) при диагностике паратифозного аборта кобыл, пуллороза у кур; используют РА для дифференциации выделенной культуры сальмонелл с целью определения их вида и сероварианта; у

сальмонелл различают соматический термостабильный антиген и жгутиковый термолабильный антиген; культуру сальмонелл предварительно проверяют с групповыми (поливалентными) сальмонеллезными агглютинирующими сыворотками в РА на стекле. На основе общего для нескольких видов сальмонелл антигена они подразделяются на серологические группы, обозначаемые заглавными буквами латинского алфавита. При положительном результате с групповой сывороткой испытания той же культуры, выросшей на скошенном МПА с отдельными монорецепторными сыворотками, входящими в смесь поливалентной сыворотки. Затем эти же культуры испытывают с монорецепторными сыворотками, 1-й и 2-й фазы, обозначенными цифрами и малыми буквами, используют также РИФ, ИФА.

Биопрепараты: вакцина поливалентная ГОА формолтиомерсальная против колибактериоза; сыворотка поливалентная против колибактериоза, концентрированная формолквасцовая вакцина против сальмонеллеза телят, ассоциированная вакцина против паратифа, пастереллеза, диплококковой септицемии, сухая живая вакцина против паратифа свиней из штамма ТС-177, живая сухая вакцина против сальмонеллеза водоплавающей птицы и др.

Задания для самостоятельной работы

1. Изучить морфологические, тинкториальные и культуральные свойства *E. coli*.
2. Изучить ферментативные свойства *E. coli*.
3. Заполнить протокол исследования.

Протокол исследования

Морфологические свойства <i>E. coli</i> (зарисовать)	Культуральные свойства <i>E. coli</i> . (описать колонии и рост на МПБ)	Биохимические свойства <i>E. coli</i> .

Контрольные вопросы

1. Какие дифференциально-диагностические среды применяют для выделения *E. coli*?
2. Каковы основные биохимические свойства *E. coli*?
3. Как определяют патогенность *E. coli*?
4. В каком порядке проводится серотипизация выделенных эшерихий?
5. Элективная среда, созданная специально для сальмонелл?
6. Каков порядок серотипизации выделенных сальмонелл?
7. Какие серологические реакции используются для диагностики сальмонеллеза?

2.9 Лабораторная работа № 9 (2 часа)

Тема: «Лабораторная диагностика бруцеллеза»

2.9.1 Цель работы: познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики бруцеллеза.

2.9.2 Задачи работы:

1. Дать представления о заболевании – бруцеллез.
2. Познакомить студентов с этапами лабораторной диагностики бруцеллеза.
3. Освоить микроскопический, бактериологический и серологический методы исследования.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Культуры вакцинных штаммов возбудителей бруцеллеза на МППБ.
2. Пастеровские пипетки, спиртовые горелки, бактериологические петли, набор красок для окраски по Козловскому, Граму, световые микроскопы бинокулярные XSP-103P, предметные стекла.
3. Табличный материал.
4. Диагностические сыворотки и антигены для постановки серологических реакций (пробирочной РА, РБП, КР с молоком), серологические пробирки, градуированные пипетки, штативы под серологические пробирки.

2.9.4 Описание работы

Бруцеллез (brucellosis) – хроническая инфекционная болезнь животных и человека. У многих животных проявляется абортami и задержанием последа, орхитами, рождением нежизнеспособного молодняка и бесплодием. В связи с социальной опасностью бруцеллез включен в список карантинных болезней.

Бактерии из рода *Brucella* подразделяют на 6 видов: *Br. abortus* (возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота); *Br. melitensis* (овец и коз; особенно восприимчив человек); *Br. suis* (свиней); *Br. neotomae* (крыс); *Br. ovis* (инфекционного эпидидимита баранов); *Br. canis* (бруцеллез собак).

Лабораторная диагностика бруцеллеза основана на результатах бактериологических и серологических исследований.

Бактериологическое исследование в основном применяют при первичной постановке диагноза на бруцеллез в ранее благополучных хозяйствах.

Материал для исследования. В лабораторию направляют пробы крови (сыворотки) для серологических исследований, абортированный плод с плодными оболочками, околоплодную жидкость, истечения из родовых путей или желудок плода, кусочки печени, селезенки, пробы молока (последние порции). При убое животных берут паренхиматозные органы, лимфатические узлы, пораженные суставы, у самцов — семенники. Объектом исследования могут быть молочные продукты (брынза, сыр, масло и др.), объекты внешней среды.

Микроскопия. Мазки из материала окрашивают по Граму и одним из специальных методов (по Козловскому, Стампу и др.). Бруцеллы — грамтрицательные короткие палочковидные или кокковидные бактерии размером 0,5... 1,5 мкм, без жгутиков, спор не образуют, формируют микрокапсулу. В окрашенном препарате располагаются одиночно, реже парами, короткими цепочками. Окраска по методу Козловского: препарат окрашивают 2%-м водным раствором сафранина 2 мин, промывают водой, докрашивают 1%-м водным раствором малахитовой зелени 1 мин, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, остальные бактерии зеленые. Окраска по методу Стампа: фиксированный на пламени мазок окрашивают фуксином Пфейффера 10 мин, промывают водой, обрабатывают 0,5%-м водным раствором уксусной кислоты 30 с, затем препарат промывают водой и докрашивают 1%-м водным раствором метиленового синего 20...30 с. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, другие бактерии синие.

Культивирование. Бруцеллы — аэробы, микроаэрофилы, температурный оптимум 37...38 °С, рН 6,8...7,2. Материал засевают на специальные питательные среды: мясо-пептонный агар и бульон, печеночно-глюкозо-глицериновый агар и бульон, картофельный агар, эритрит-агар, сывороточ-но-декстрозный агар и др. Печеночные среды включают в себя отвар печени. Картофельный агар готовят на отваре картофеля, глюкозу и глицерин добавляют в среды соответственно в количестве 1 % и 2...3 %. Эритрит-агар содержит вещество (эритрит), стимулирующее рост бруцелл. В состав сывороточно-декстрозно-го агара помимо обычной питательной основы входит 10 % сыворотки крови и 1 % декстрозы. Некоторые виды бруцелл растут при повышенном содержании в атмосфере оксида углерода (*B. abortus*, *B. ovis*). Так как неизвестно, каким видом бруцелл заражен исследуемый материал, половину посевов инкубируют в обычной атмосфере, другую — в

атмосфере, содержащей 10...15% оксида углерода. Посевы культивируют в течение 30 сут, периодически просматривая. Рост бруцелл чаще появляется на 7...10-е сутки, иногда позже. На плотных средах возбудитель формирует мелкие, прозрачные, круглые, с ровными краями, гладкой поверхностью, с голубоватым оттенком колонии (S-форма), возможно появление шероховатых колоний (R-форма). По мере старения колонии мутнеют и за счет пигментообразования могут темнеть. На жидких питательных средах рост бруцелл проявляется равномерным помутнением среды, образованием голубоватого пристеночного кольца, позднее формируется небольшой осадок. У выросших культур изучают морфологию и тинкториальные свойства клеток в мазках, окрашенных по методам Грама, Козловского.

Серотипизация. Культуру идентифицируют серологически в РА на стекле с позитивной бруцеллезной сывороткой, разведенной в соотношении 1:50. Виды *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* антигенно родственны, поэтому их клетки агглютинируют в стандартной бруцеллезной сыворотке. Для идентификации *B. ovis* кроликов иммунизируют выделенной культурой и затем кроличью сыворотку исследуют в РДСК со стандартным овисным антигеном (*B. ovis*) - должна быть четкая положительная реакция, если это культура *B. ovis*.

Для определения видовой принадлежности у выделенных культур бруцелл изучают потребность в оксиде углерода (IV), образование сероводорода, способность к росту на питательных средах с тионином и фуксином, чувствительность к бруцеллезным бактериофагам, ферментацию аминокислот, углеводов, а также агглютинабельность с моноспецифическими сыворотками против отдельных клеточных антигенов бруцелл (А, М, R).

Биопроба. Это эффективный метод обнаружения бруцелл в исследуемом материале, особенно загрязненном. Морских свинок перед заражением исследуют в РА, в опыт берут животных, в сыворотке которых не обнаружены антитела к возбудителю. Тканевый материал в виде суспензии (1:10) в объеме 1 мл вводят подкожно. О результате биопробы судят по данным исследования сыворотки крови на 15, 25 и 40-й день после заражения (животные не погибают). Появление антител в титре 1:10 и более оценивают как положительный результат. Реагирующих животных убивают и подвергают бактериологическому исследованию.

Серологическая диагностика: при массовых диагностических исследованиях ставят пробирочную РА, роз-бенгал пробу (РА на стекле), РСК, РДСК, кольцевую реакцию с молоком (КР), ИФА.

Биопрепараты. Живая сухая вакцина против бруцеллеза из слабоагглютиногенного штамма № 82, живая вакцина против бруцеллеза овец из штамма Рев-1.

Задания для самостоятельной работы

1. Приготовить мазки из культуры вакцинного штамма бруцелл, окрасить по Козловскому и Граму, промикроскопировать, заполнить протокол.
2. Изучить культуральные и биохимические свойства возбудителей.
3. Поставить пробирочную РА, РБП, КР с молоком.
4. Ознакомится с биопрепаратами.

Протокол

Бруцеллы в мазках, окрашенных по Граму или Козловскому (рисунок)	Описание роста на питательных средах	Результаты пробирочной, капельной РА и кольцевой реакции с молоком

Контрольные вопросы

1. Какой материал направляют в лабораторию для бактериологического исследования на

бруцеллез?

2. Основной метод выявления больных бруцеллезом животных в хозяйствах?
3. Как дифференцируются выделенные бруцеллы?
4. Какие реакции используются для серологической диагностики бруцеллеза?