

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

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

**А.А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ,
Л.В. ШЕВЧЕНКО, Г.А. ДЖАИЛИДИ,
Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ, А.Р. ЛИТВИНОВА,
Т.В. ЛЕВЧЕНКО, А.В. СКОРИКОВ,
Е.В. ЯКУБЕНКО**

ДИАГНОСТИКА ЭШЕРИХИОЗА ЖИВОТНЫХ

Учебное пособие

г. Краснодар, 2013

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

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

**А. А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ, Л.В. ШЕВЧЕНКО,
Г.А. ДЖАИЛИДИ, Д.Ю. ЗЕРКАЛЕВ, А.Р. ЛИТВИНОВА,
Т.В. ЛЕВЧЕНКО, А.В. СКОРИКОВ, Е.В. ЯКУБЕНКО**

ДИАГНОСТИКА ЭШЕРИХИОЗА ЖИВОТНЫХ

Учебное пособие

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

КРАСНОДАР, 2013

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев, А.Р. Литвинова, Т.В. Левченко,
А.В. Скориков, Е.В. Якубенко
Учебное пособие «Диагностика эшерихиоза животных».
Краснодар: КубГАУ, 2013. 22 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителей эшерихиоза животных; описаны бактериоскопические, бактериологические, биохимические, биологические и серологические методы диагностики и дифференциальной диагностики заболевания.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Лысенко А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, декан факультета ветеринарной медицины КубГАУ.

Куриннов В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии.

Рекомендовано методической комиссией факультета ветеринарной медицины КубГАУ протокол №3 от 19 ноября 2012 года.

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

Диагностика эшерихиоза животных

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

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

Практически важное для ветеринарии значение имеет один вид — *E. coli*. Естественным местом обитания *E. coli* является толстый отдел кишечника человека, млекопитающих животных, птиц, многих пресмыкающихся, рыб и насекомых. С испражнениями эшерихии попадают во внешнюю среду (почва, вода, пищевые продукты и др.), где могут сохраняться в течение нескольких месяцев.

Являясь представителями резидентной (постоянной) микрофлоры кишечника, эшерихии у здоровых животных старше 20-30, дневного возраста не превышают 1-2% от общей численности бактерий кишечника. Из-за особенностей становления кишечной микрофлоры у новорожденных животных первых дней жизни и до 2-3, недельного возраста число эшерихии может достигать 50% и более. Если среди них преобладают энтеропатогенные, токсигенные варианты, а животные имеют недостаточную иммунную защиту (что часто бывает у молодняка), то развиваются кишечные инфекции эшерихиозной этиологии: колибактериоз телят, поросят, ягнят, кроликов, нутрий, собак, птиц; у поросят отечная форма. Транслокация эшерихий из кишечника в кровяное русло является причиной развития у разных животных септицемии, у свиноматок симптомокомплекса ММА (метрит-мастит-агалактия), у коров и других животных мастита, может стать причиной воспаления слизистых оболочек уrogenитального, респираторного тракта, осложнять раневые инфекции и т.д.

Эшерихиоз (колибактериоз) — остропротекающая инфекционная болезнь молодняка животных всех видов, включая птиц. Протекает в септической, энтеритной (колидиарей), токсикосептиче-

ской формах, у поросят-отъемышей — еще и в форме энтеротоксемии (отечная форма), у птиц — в виде септицемии, реже — в виде сальпингита и колигранулематоза. Возбудителем болезни являются патогенные эшерихии вида *E. coli*.

Лабораторная диагностика эшерихиоза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование включает:

- обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой микроскопии,
- выделение чистой культуры,
- идентификацию возбудителя на уровне вида,
- определение его принадлежности к группе патогенных вариантов.

Бактериологическое исследование

Для исследования используют свежие трупы мелких животных и птиц целиком, трубчатая кость, доля печени с желчным пузырем, селезенка, почка, сердце, перевязанное лигатурой у аорты, брыжечные лимфоузлы, отрезок тонкого кишечника, перевязанный с двух сторон. При направлении трупов целиком в лаборатории, помимо указанного материала, исследуют еще и головной мозг.

Для прижизненной диагностики в лабораторию могут направляться фекалии, кровь.

Микроскопическое исследование исходного материала

Из поступившего материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Эшерихий являются мелкими (1,0-3,0x0,3-0,6 мкм) прямыми палочками. Грамотрицательные.



Схема бактериологического исследования на колибактериоз

Выделение и идентификация культур патогенных эшерихий

Культивирование. Эшерихии — факультативные анаэробы, обладающие дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура роста 37- 38° С, рН среды 7,0-7,2, хорошо растут на всех широко используемых в лабораторной практике питательных средах.

Исследуемый материал высевают на плотные селективно-дифференциальные среды Эндо, или Левина, или Мак-Конки и среду с сорбитом. Посевы инкубируют при 37° С в течение 18-24 часов. По истечении этого срока посевы просматривают и отбирают 10 колоний (5, выросших после посева фекалий или соскобов со слизистой кишечника, и 5 - из других органов, в т.ч. брыжеечных лимфатических узлов), типичных для эшерихий, которые пересевают в МПБ, на МПА и среду Минка (при наличии колоний слизистой консистенции, т.е. тянущихся за петлей, их обязательно отсе-

вают на среду Минка) в чашках, разделенных карандашом для стекла на 10 секторов (каждую колонию на 2 среды в отдельный пронумерованный сектор). При подозрении или целенаправленном исследовании на отечную болезнь поросят (энтеротоксемию) дополнительно пересевают несколько колоний на кровяной агар в чашке, разделенной на соответствующее количество секторов. С чашек с культурами на среде с сорбитом отсевают 3-4 колонии S-формы серовато-белого цвета в пробирки со скошенным МПА. Культуры, выделенные от птиц, на МПА и среду Минка не пересевают. Их высевают в специальные питательные среды для изучения биохимических свойств.

Характер роста эшерихий на питательных средах. На плотных питательных средах эшерихий образуют круглые с гладкой, вышуклой поверхностью, ровным краем, диаметром 2-4 мм колонии. На МПА колонии полупрозрачные, сероватого цвета. На средах Эндо, Левина и Мак-Конки за счет ферментации лактозы и закисления среды приобретают цвет индикаторов: на среде Эндо - красные, малиново-красные с металлическим блеском или без него; на среде Левина — темно-синие, фиолетовые, черные с металлическим блеском или без него; на среде Мак-Конки — розовые, красные (отдельные штаммы эшерихий могут не ферментировать лактозу и формировать на перечисленных средах бесцветные колонии). На среде с сорбитом эшерихий серогруппы O157 (варианты O157:H7 и O157:H), вызывающие диарею животных с признаками геморрагического гастроэнтерита, образуют серовато-белые колонии S-формы. Колонии эшерихий других серогрупп — красно-малинового цвета. Колонии штаммов, образующих гемолизин, на кровяном агаре окружены зоной гемолиза. В МПБ рост эшерихий проявляется в виде равномерного помутнения среды с образованием легко разбивающегося осадка.

Обнаруженные на данном этапе исследований эшерихий с гемолитическими свойствами, выделенные от поросят-отъемышей с признаками отечной болезни (из содержимого тонкого отдела их кишечника и (или) брыжеечных лимфатических узлов), относят к возбудителю отечной болезни (энтеротоксемии) поросят.

Морфология клеток эшерихий в культуре. В мазках, приготовленных из культур, эшерихий обнаруживают в виде грамотрицательных, мелких (1,0-3,0x0,3-0,6 мкм) прямых палочек с закругленными концами. В поле зрения микроскопа располагаются одиночно, реже попарно. Спор не образуют. Некоторые (штаммы серо групп 08, 09, 020, 0101) образуют капсулу или микрокапсулу. Большинство подвижно за счет перетрихиальных жгутиков, но встречаются и неподвижные.

Идентификация эшерихий по ферментативным признакам. Выделенные чистые культуры микроорганизмов с характерными для эшерихий культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами окончательно относят к роду *Escherichia* и виду *E.coli* на основании изучения их ферментативных свойств. Ориентируясь на критерии к *E.coli* относят штаммы, образующие индол, не образующие H_2S , дающие положительную реакцию с метиловым-красным (среда окрашивается в розово-красный цвет) и отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра (среда окрашивается в желтый цвет), не растущие на среде Симмонса, не расщепляющие мочевины, образующие лизиндекарбоксилазу. Большая часть эшерихий образует орнитиндекарбоксилазу, ферментирует манит. Все (за редким исключением) сбрасывают лактозу.

На данном этапе исследований диагноз на колибактериоз считают установленным в том случае, если выделены чистые культуры *E. coli* не менее чем из двух ниже указанных органов и тканей: селезенки, крови, крови сердца, костного мозга, головного мозга свежего трупа животного без изучения патогенных свойств штаммов и установления их серогрупповой принадлежности. В остальных случаях устанавливают патогенность выделенных культур.

Серологическая идентификация. Важнейшую информацию о патогенных свойствах эшерихий получают при определении их антигенной структуры. Клетки эшерихий содержат три вида антигенов: О — соматический; К — оболочечный и Н — жгутиковый. Эшерихии в своем составе содержат 164 варианта О-антигена, 55 вариантов Н-антигена и 90 вариантов К-антигена.

О-антиген термостабилен (выдерживает нагревание при 100° С в течение 2,5 часов). Является липополисахаридо-протеиновым комплексом, неоднороден, и на его основе эшерихий делят на группы (164 О-групп).

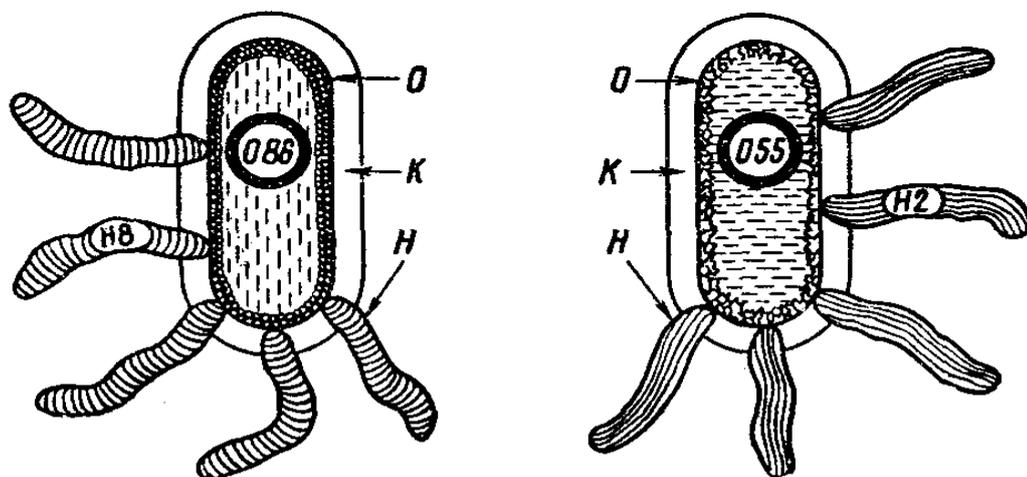
К-антигены поверхностные, оболочечные (кислые полисахариды, редко протеины). По своим свойствам их подразделяют на три типа: L-антиген термолабильный, инактивируется при 100° С в течение часа;

В-антиген в этих же условиях теряет агглютинабельность; А-антиген термостабильный, инактивируется при 120° С в течение 2,5 часов, имеется у слизистых капсулообразующих эшерихий О-групп 08,09,020,0101;

Н-антиген термолабильный, инактивируется при 60° С в течение 1 часа, протеин, располагается в фимбриях (пилях), пронизывающих клеточную стенку, поэтому в последнее время его чаще называют фимбриальным антигеном.

К-антигены покрывают О-антиген и делают клетки эшерихий иннагглютинабельными в гомологичных О-сыворотках. Они обладают адгезивными свойствами, т.е. с их помощью бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам кишечника. Адгезивные антигены являются фактором патогенности, который изучается у чистых культур *E.coli* в первую очередь.

Н-антиген — жгутиковый, состоит из протеина, термолабилен, имеет несколько десятков разновидностей, определяемых в РА. Для диагностики существенного значения не имеет. Сочетание О-, К- и Н-антигенов характеризует серологический вариант (серовар) эшерихий.



Типы К-антигена

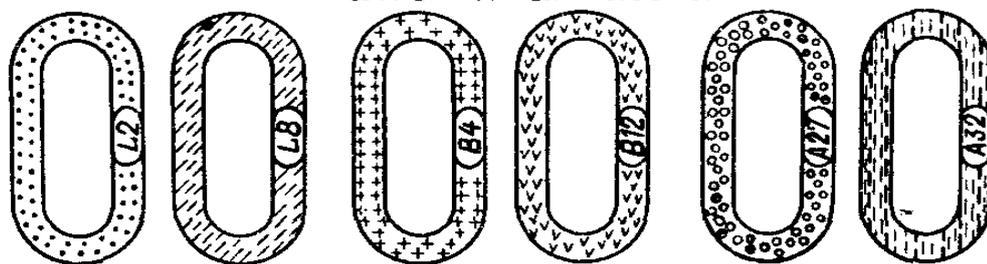


Схема антигенного строения *E. coli*

Факторами патогенности *E. coli* являются:

1. Факторы адгезии и колонизации – необходимы для прикрепления к клеткам ткани и их колонизации.

2. Факторы инвазии

С их помощью энтероинвазивные *E. coli* проникают в эпителиальные клетки кишечника и развиваются в них.

а) экзотоксины

У патогенных *E. coli* наиболее известными являются термолабильные (LT) и термостабильные (ST).

б) эндотоксины – липополисахариды - определяют антигенную специфичность бактерий, форму колоний, вызывают эндотоксикоз.

В зависимости от содержания факторов патогенности различают следующие категории диареегенные *E. coli*:

- энтеротоксигенные *E. coli* (ЭТКП);
- энтероинвазивные *E. coli* (ЭИКП);
- энтеропатогенные *E. coli* (ЭПКП);
- энтерогеморрагические *E. coli* (ЭГКП);

- энтероагрегирующие *E.coli* (ЭАКП).

Энтеротоксигенные кишечные палочки обнаружены среди представителей более 70 O-групп.

Эти кишечные палочки образуют токсины, нарушающие равновесие между секрецией и всасыванием жидкости эпителиальными клетками тонкого кишечника, вызывая диарею.

К энтеропатогенным *E.coli* относится около 20 представителей O серогрупп.

Они вызывают поражение тонкого кишечника с повреждением поверхности эпителия, с образованием эрозий и умеренного воспаления.

Энтероинвазивные *E.coli* более 10 представителей, они способны внедряться в эпителиальные клетки, размножаться в них, вызывая гибель.

В результате появляется воспаление и изъязвление слизистой оболочки толстого кишечника.

Энтерогеморрагические кишечные палочки около 10 представителей колонизируют толстый кишечник, вызывая геморрагический колит.

Это сопровождается общей интоксикацией и поражением внутренних органов.

Они синтезируют специфические цитолизины.

Данные эшерихиозы являются зоонозами.

Энтероагрегирующие кишечные палочки отличаются морфологическими особенностями адгезии в культурах эпителиальных клеток человека (Hep2 и Hela).

Известно, что патогенные эшерихии вызывают и внекишечные поражения: цистит, пиелонефрит, сепсис.

Ведущая роль в развитии колибактериоза принадлежит эшерихиям с адгезивными антигенами K88, K99, F41, F18, 987P, A20 и др. Наличие этих адгезинов можно выявить в реакции агглютинации на стекле или в ELISA-тесте с соответствующими антисыворотками. В нашей стране наиболее распространенным методом выявления адгезивных антигенов у эшерихий является РА. Для этой цели промышленностью выпускается набор агглютинирующих сывороток к

адгезивным антигенам эшерихий. Этот набор включает моновалентные агглютинирующие сыворотки к антигенам K88, K99, F41, 987P, A20 и поливалентную агглютинирующую сыворотку, представляющую собой смесь моновалентных сывороток в равных объемах. Сыворотки выпускаются в сухом виде во флаконах по 0,5 см³, что обеспечивает сохранение их специфической активности на срок не менее 5-ти лет.

Постановка РА. В ампулу (флакон) с сухой сывороткой добавляют растворитель (дистиллированная вода или физиологический раствор) до первоначального объема сыворотки (0,5 см³), затем растворителем разводят поливалентную сыворотку в соотношении 1:2, а моновалентные — 1:10 (рабочий титр). Разведенные сыворотки хранят в пробирках (флаконах) под резиновой пробкой при температуре 4-10° С до 3 месяцев. По внешнему виду разведенные сыворотки должны представлять собой прозрачную или слегка опалесцирующую бледно-розовую жидкость. Мутные сыворотки, проросшие плесенью или другими микроорганизмами, с обильным осадком к употреблению непригодны.

Для выявления антигенов K88, 987P и A20 используют культуры эшерихий, выращенные на МПА или агаре Хоттингера, для обнаружения антигенов K99 и F41 — на среде Минка. В обоих случаях посеы инкубируют при 37-38° С в течение 20-24 часов.

Культуры эшерихий, выделенные от птиц, для выявления адгезивных антигенов не используют. Выросшие культуры исследуют в РА на стекле вначале с поливалентной, а затем (в случае положительной реакции) с моновалентными сыворотками. С этой целью каплю поливалентной сыворотки наносят на предметное стекло, бактериологической петлей берут испытуемую культуру и тщательно растирают с сывороткой. Реакцию учитывают в течение одной минуты при легком покачивании стекла при температуре от 18 до 28° С. Контролем служит испытуемая культура, смешанная с каплей физиологического раствора (рН 7,2 -7,4) и с каплей нормальной кроличьей сыворотки, разведенной 1:10 (для исключения самоагглютинации культуры).

Положительная реакция характеризуется склеиванием микробных клеток в зерна или хлопья различной величины и полным или частичным просветлением сыворотки при отсутствии агглютинации в контроле.

Эшерихии, давшие положительную реакцию агглютинации с одной из сывороток, считают возбудителем колибактериоза (колидиареи).

Наличие адгезивных антигенов у энтеропатогенных эшерихии (ЕРЕС) имеет определенную связь с хозяевами этих возбудителей и О-серогруппами (табл.1).

Культуры эшерихии на скошенном МПА, полученные после пересева серовато-белых колоний со среды с сорбитом (не ферментирующие этот многоатомный спирт), исследуют с агглютинирующей коли-сывороткой О157 в РА на стекле. Реакцию ставят с живыми культурами. Для исключения самоагглютинации бактериальных клеток культуру исследуют с 0,85%-ным раствором натрия хлорида. При отсутствии агглютинации в контроле и ее наличии на стекле с коли-сывороткой О157 исследуемые эшерихии относят к возбудителю колибактериоза.

Таблица 1 - Распространение адгезивных антигенов у ЕРЕС в зависимости от хозяина и О-серогрупп

Адгезивные антигены	Хозяин	Главные О-группы, носители антигенов
К-88	Поросята	08,0141,0147,0149,0157
987Р	Поросята	09,020,0141
К99	Поросята, телята, ягнята	08, 09, 020, 0101
F41	Телята	09, 101
18	Поросята	н.д.
A20	Телята, ягнята	н.д.

Со штаммами, давшими отрицательную реакцию агглютинации, а также со штаммами выделенными от птиц, проводят дальнейшие диагностические исследования. При этом определяют их О-групповую принадлежность в РА с поливалентными и моновалентными агглютинирующими О-коли-сыворотками или изучают их патогенность в биопробе на белых мышах (штаммы, выделенные от млекопитающих) или цыплятах (штаммы, выделенные от птиц).

Серогрупповая принадлежность эшерихии определяется в реакции агглютинации на стекле и в пробирочной реакции агглютинации. Для этого выпускаются наборы агглютинирующих О-количесывороток, включающие моновалентные сыворотки к О-антигенам 30 основных серогрупп ЕРЕС, и четыре поливалентные, каждая к О-антигенам 6-8 серогрупп. Агглютинирующие О-количесыворотки выпускают во флаконах в жидком виде. Пригодные к использованию сыворотки представляют собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета.

Ход определения. 1. Испытуемый штамм выращивают на МПА при 37-38° С в течение 18-24 часов, смывают физиологическим раствором, переносят в стерильные пробирки, прогревают в течение часа в водяной бане при температуре 100° С для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антигенов или автоклавировуют при температуре 120° С в течение 2-2,5 часов для разрушения термостабильного А-антигена. Если во взвеси бактерий после кипячения или автоклавирования образуются хлопья или зернистость (R-форма), то ее не используют для реакции. Прогретую взвесь бактерий центрифугируют при 3 тыс. об/мин в течение 20 минут, надосадочную жидкость сливают, а осадок используют в качестве антигена для постановки реакции на стекле. Оставшуюся часть антигена разводят стерильным физиологическим раствором по оптическому стандарту мутности до концентрации 500 млн. микробных клеток в 1см³ и используют для постановки пробирочной реакции агглютинации.

2. На предметное стекло наносят по одной капле каждой из четырех поливалентных сывороток. В каждую из них бактериологической петлей вносят осажденную центрифугированием культуру и хорошо перемешивают. Реакция протекает при комнатной температуре, учитывают ее в течение 3 минут. Положительная реакция характеризуется образованием мелкозернистого агглютината и полным или частичным просветлением жидкости. При отрицательном результате антиген остается в капле сыворотки в виде равномерной взвеси.

3. Каждый антиген, агглютинирующийся одной из поливалентных сывороток, исследуют в реакции агглютинации на стекле с мовалентными, разведенными 1:10, сыворотками, входящими в состав данной поливалентной сыворотки, а затем в пробирочной реакции агглютинации с каждой сывороткой, давшей положительную реакцию на стекле.

4. Пробирочную РА ставят в обычных серологических или бактериологических пробирках в объеме 1 мл.

Сыворотку разводят стерильным физиологическим раствором от 1:25 до титра, указанного на этикетке. Для приготовления исходного разведения к 2,4 см³ физиологического раствора добавляют 0,1 см³ сыворотки. Во все другие пробирки разливают по 0,5 см³ физиологического раствора. Из исходного разведения 0,5 см³ смеси переносят во вторую пробирку, из второй — в третью и т.д. Каждое разведение готовят отдельной пипеткой. Содержимое каждой пробирки смешивают. Из первой пробирки удаляют 1,5 см³, из последней — 0,5 см³ антигена, имеющего концентрацию 500 млн. микробных тел в 1 см³.

Одновременно ставят контроли:

- а) антиген + физиологический раствор (для исключения самоагглютинации);
- б) сыворотка в разведении 1:25 без антигена (для исключения флоккуляции).

Штатив с пробирками встряхивают и выдерживают 16-18 часов при температуре 37° С и 6-8 часов при комнатной температуре.

5. Положительная реакция характеризуется просветлением жидкости и образованием на дне пробирки осадка в форме раскрытого зонтика, который при встряхивании распадается на мелкие хлопья или комочки.

Реакцию считают отрицательной, когда на дне пробирки образуется осадок в виде пуговки (диска), который при встряхивании разбивается в равномерную взвесь. Аналогичный результат должен быть в контрольных пробирках.

6. В том случае, когда поливалентные О-коли-сыворотки не агглютинируют в РА на стекле, антиген, прогретый при температуре

100° С, и суспензию из исследуемых бактерий автоклавируют при температуре 120° С в течение 2 -2,5 часов.

Полученный антиген исследуют в пробирочной РА с сыворотками серогрупп 08, 09, 020 и 0101.

7. Исследуемый штамм относят к той О-группе, с сывороткой которой он вступает в реакцию до титра или не ниже половины титра сыворотки.

Определение серогрупповой принадлежности эшерихий имеет важное диагностическое значение, поскольку по морфологическим, ферментативным и культуральным свойствам патогенные и непатогенные разновидности эшерихий не отличаются друг от друга. В то же время установлено, что из более чем 160 О-серогрупп известных в настоящее время эшерихий лишь около 40 являются основными возбудителями колибактериоза (эшерихиоза) у животных и птиц (табл. 2). Отнесение изучаемого штамма к одной из этих серогрупп дает основание для постановки диагноза на колибактериоз.

е) Определение патогенных свойств *E.coli*. Патогенность изучаемых штаммов эшерихий может быть установлена в биопробе на белых мышах или цыплятах. Для этого испытуемый штамм выращивают на МПА при 37-38° С в течение 18-24 часов, смывают стерильным физиологическим раствором, готовят суспензию концентрацией 1 млрд. микробных клеток в 1см³ по оптическому стандарту мутности и вводят внутрибрюшинно по 0,5 см³ трем белым мышам массой 14-16 г или трем цыплятам 3-4-недельного возраста (при исследовании материала от птиц). Наблюдение за зараженными животными проводят в течение трех суток. В случае гибели двух и более зараженных мышей или цыплят выделенный штамм признают патогенным и считают возбудителем инфекции.

Таблица 2 - Основные серогруппы эшерихий, патогенные для животных

Виды животных и патология	Основные серогруппы EPEC
1. Крупный рогатый скот:	
сепсис у телят	078, 08, 09, 015, 055, 086, O1 15, 0117, 041, O1 19
диарея у телят	08,09,020,0101
мастит у коров	09, 08, 06, 02, 021, 081, 086
2. Свиньи:	
диарея у поросят	08, 09, O20, 045, O101, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149,0157
энтеротоксемия у поросят	0138,0139,0140,0141
3. Овцы:	
сепсис у ягнят	078, 015, O20, 035, 075, O1 14, 0115, 0119, 0125, 0137,
диарея у ягнят	09,08,0101
4. Собаки: энтериты	04, 025, 042
5. Кролики, нутрии: диарея	085, 02, 01, 0101, 06, 018, 0128, 055, 044
6. Лошади: из репродуктивных органов	018,02,06,0147,0141
7. Птица: септицемия цыплят, сальпингит кур-несушек, колигранулематоз	01, 02, 078, 015, O101, 0115, 041

Постановка биопробы завершает общепринятую схему бактериологического исследования материала на колибактериоз (эшерихиоз). При необходимости могут быть проведены исследования токсигенных свойств изучаемых штаммов.

Одним из факторов вирулентности эшерихий является продуцируемый ими экзотоксин. Экзотоксины *E.coli* относят к энтеротоксинам, а штаммы, их продуцирующие, — к энтеротоксигенным *E.coli* (EPEC). Выявление EPEC позволяет установить диагноз на колибактериоз при бактериологическом исследовании материала. Кроме того, наличие энтеротоксигенных штаммов необходимо учитывать при конструировании вакцин против колибактериоза.

EPEC продуцируют два типа энтеротоксинов: термостабильный (ТС) и термолабильный (ТЛ), отличающиеся друг от друга по молекулярной массе, структурной организации, иммуногенности и механизму действия.

Синтез ТЛ-токсина детерминирован конъюгативной (передающейся другим, в т.ч. и непатогенным, бактериям) плазмидой. Он секретируется во внешнюю среду, окружающую бактерию, адсор-

бируется на ворсинках эпителиальных клеток тонкого кишечника, где стимулирует аденилатциклазу. Последняя вызывает увеличение концентрации аденозинмонофосфата, который ведет к гиперсекреции воды и хлоридов в просвет кишечника и угнетению реабсорбции натрия. Просвет кишки переполняется жидкостью, развиваются усиленная перистальтика кишечника и диарея. Молекулярная масса ГЛ-токсина 24000 Д, он является пептидом и обладает антигенными свойствами. Разрушается при 60° С в течение 30 минут, инактивируется в среде с рН 4,0 -5,0 и под воздействием проназы.

ТС-токсин также находится под генетическим контролем гетерогенной группы конъюгативных Ent-плазмид. Адсорбируясь на клетках эпителия тонкого отдела кишечника, он вызывает гиперсекрецию воды и электролитов, путем активации гуанилатциклазы. Молекулярная масса ТС-токсина колеблется от 1000 до 10 000 Д, он является гаптенем и не обладает антигенной активностью. Сохраняет биологическую активность при температуре 65° С в течение 15 мин., при 100° С - 2 мин. Полностью разрушается при кипячении в течение 30 мин. Устойчив к действию трипсина, проназы, протеиназы, дезоксирибонуклеазы. Имеется две разновидности термостабильного энтеротоксина: ТС_а и ТС_в.

Синтез энтеротоксинов у *E. coli* не связан с их серогрупповой принадлежностью. Так, ЕТЕС-возбудители колибактериоза телят могут принадлежать к серогруппам 08, 09, 020, 026, 0101 и другим, колибактериоза поросят — к 08, 045, 0141, 0149, 0149, 0139 и 0157.

Энтеротоксигенные *E.coli* — возбудители колибактериоза новорожденных телят, ягнят и козлят, синтезируют в основном ТС_а энтеротоксин (среди них такие штаммы встречаются в 86,4 - 100% случаев), редко — ГЛ-энтеротоксин (0 - 9,1%).

Кроме того, ЕТЕС выделяются при колибактериозе поросят и жеребят, при отечной форме у поросят, редко выделяются от щенков.

Данные о корреляции у штаммов *E. coli* между адгезивными антигенами, энтеротоксигенностью и хозяевами представлены в табл. 3.

Под влиянием антибактериального или антиадгезивного иммунитета или специфических сывороток ЕТЕС теряют способность к адгезии и не проявляют энтеротоксичности. То же происходит с энтеротоксигенными *E. coli* при утрате ими плазмид, детерминирующих адгезивные антигены.

Таблица 3 - Взаимозависимость между адгезинами, энтеротоксинами и хозяевами

Тип адгезинов	Главные хозяева штаммов	Продуцируемые энтеротоксины		
		ТС	ТЛ	ТСиТЛ
К 88	Поросята	+	+	+
К 99	Телята, ягнята	+	-	-
987 P	Поросята	+	-	-
F41	Телята	+	-	-

Поскольку, как отмечалось выше, в большинстве случаев корреляция между энтеротоксигенностью штаммов эшерихий и их серогрупповой принадлежностью отсутствует, проводить диагностику заболеваний, вызванных ЕТЕС с помощью обнаружения у них О- или К-антигенов, нецелесообразно. Для этой цели необходимо выявлять либо адгезины, либо непосредственно энтеротоксины.

Определение энтеротоксигенных свойств *E. coli* проводят на изолированных петлях тонкого кишечника кролика или морской свинки. Метод основан на феномене расширения кишечной петли за счет скопления в ее просвете жидкости, что и является показателем токсигенной активности испытуемых штаммов.

При использовании кроликов (классическая модель) отбирают клинически здоровых животных массой 2,0-2,5 кг, выдерживают их на голодной диете со свободным доступом к воде в течение 36-48 часов, после чего оперируют под эфирным наркозом с фиксацией в спинном положении. Общепринятыми хирургическими методами осуществляется лапаротомия, тонкий кишечник извлекается на сте-

рильную салфетку и орошается физиологическим раствором через каждые 5-7 минут операции. На кишечник накладывают шелковые лигатуры так, чтобы образовалось 8-12 сегментов по 10 см с промежутками между ними в 3-5 см. В опытные сегменты вводят испытуемый материал в объеме 2 см^3 (суспензия испытуемого штамма эшерихий в физиологическом растворе концентрацией 1 млрд. микробных клеток в 1 мл. Культуру выращивают на плотных средах в течение 16-24 часов. В контрольные сегменты вводят по 2 см^3 стерильного физиологического раствора. Петли кишечника вправляют в брюшную полость, брюшину с брюшными мышцами зашивают непрерывным швом. Через 16-18 часов кроликов усыпляют. Извлекают кишечник, из каждого опытного сегмента жидкость переносят в мерный цилиндр. Индекс дилатации определяют соотношением объема скопившейся жидкости в сегменте к длине этого сегмента. Энтеротоксигенными считают штаммы, дающие индекс дилатации 1 и более.

При использовании морских свинок тест выполняется аналогичным образом. При этом отбирают животных массой 250-500 г. Лигатуры накладывают на тощую кишку так, чтобы образовались сегменты длиной 1,0-1,5 см. Исследуемый материал вводят в объеме $0,1 \text{ см}^3$. Энтеротоксигенными признают штаммы, дающие индекс дилатации 0,5 и более.

Для обнаружения ТЛ-энтеротоксина в настоящее время используют тест отека лап белых мышей, кожную пробу на кроликах, реакцию агрегации тромбоцитов, реакцию отсутствия прилипания лейкоцитов в вате, реакцию латекс-агглютинации, РИД по Манчини и др. ТС-энтеротоксин выявляют в анальной пробе на 15-дневных мышатах-сосунах или в пробе на 15-дневных куриных эмбрионах.

Патогенные эшерихии сероваров O157:H7 и O157:H-, вызывающие диарею животных с признаками геморрагического гастроэнтерита, бактерии, образующие адгезивный антиген F 18 и вызывающие отечную форму колибактериоза поросят, продуцируют вероцитотоксин.

Контрольные вопросы:

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

Список использованной литературы

1. Акатов А.К., Зуева В.К. Стафилококки. М.: «Медицина», 1983.
2. Антонов Б.И, Борисова В.В, Волкова П.М. и др. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986.
3. Белоусов В.И., Каврук Л.С, Малахов Ю.А. и др. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. М., 2000.
4. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред. проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.
5. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.
6. Колычев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.
7. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родионова В.Б, Скородумов Д.И. М.: Колос, 2001.
8. Сидоров М.А, Скородумов Д.И, Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995.
9. Скородумов Д.И, В.В. Субботин, Сидоров М.А, Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: ИзографЪ, 2005.
10. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных. – Краснодар. - 2009, 575 с.
11. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Литвинова А.Р., Брилев Р.О., Злищева М.А. Совершенствование специфической профилактики

крупного рогатого скота//Труды Кубанского государственного аграрного университета. Серия: Ветеринарные науки, 2009. – №1 (ч.1). - С. 127-129.

12. Шевченко А.А., Зеркалев Д.Ю., Шевченко Л.В., Баженова Е.А., Шарова Т.В. Специфическая профилактика и лечение колибактериоза кроликов//Труды Кубанского государственного аграрного университета. Серия: Ветеринарные науки, 2009. – №1 (ч.1). - С. 122-125.

13. Двадненко А.И. Эпизоотологические особенности , специфическая профилактика и лечение эшерихиоза кроликов//Ж. Ветеринария Кубани, 2012. – №2. – С.15-16.

14. Двадненко А.И., Шевченко А.А. Изучение нозологического профиля инфекционных болезней кроликов в Краснодарском крае//Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2012. – №2 (35). - С. 357-359.

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев, А.Р. Литвинова, Т.В. Левченко,
А.В. Скориков, Е.В. Якубенко

Учебное пособие «Диагностика эшерихиоза животных».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13