

**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**

**ДИАГНОСТИКА НЕКРОБАКТЕРИОЗА
И
КОПЫТНОЙ ГНИЛИ 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,**

**ДИАГНОСТИКА НЕКРОБАКТЕРИОЗА
И КОПЫТНОЙ ГНИЛИ ЖИВОТНЫХ**

Учебное пособие

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

КРАСНОДАР, 2013

УДК 619:616.98-07:579.852.13(075)

ББК 48.73

Д 44

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев

Учебное пособие «Диагностика некробактериоза и копытной гнили животных». Краснодар: КубГАУ, 2013. 20 с.

В учебном пособии изложены патматериал, отбираемый для лабораторных исследований, основные свойства возбудителей некробактериоза и копытной гнили 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 некробактериоза и копытной гнили животных

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

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

Некробактериоз — инфекционная болезнь, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями, локализующимися на нижних частях конечностей, а в отдельных случаях — в ротовой полости, на вымени, половых органах, в печени, легких, мышцах и других тканях и органах. Возбудителем болезни является анаэробная грамотрицательная бактерия — *Fusobacterium necrophorum*. Род *Fusobacterium* содержит 17 видов. Из клинических образцов от животных, наряду с *F. necrophorum*, могут быть выделены другие виды фузобактерий: из кишечного тракта — *F.gonidioformans*, *F.necrogenes*, *F.russii*, *F.pseudonecrophorum*; со слизистой ротовой полости — *F.simiae*. В зависимости от вида и возраста животных проявление некробактериоза может иметь некоторые особенности.

F.necrophorum в сочетании с *Actinomyces pyogenes* вызывает форму некробактериоза, именуемую дифтерией телят, которая сопровождается образованием некротических фокусов в области гортани, трахеи, грудной полости, а также абсцессов в печени. У взрослого крупного рогатого скота *F.necrophorum* также может быть причиной поражения конечностей, метритов, маститов. У овец *F.necrophorum* вызывает преимущественно поражение конечностей, кожи губ, слизистых ротовой полости и половых органов. У свиней некробактериоз при кожной форме сопровождается поражениями в области шеи, туловища, вымени, кончиков ушей, хвоста. Могут развиваться некротический энтерит, абсцессы в печени. У лошадей некробактериоз чаще проявляется в виде гангренозного дерматита конечностей, у северных оленей — флегмонозно-

гнойным воспалением нижних фаланг конечностей, артритами. У собак поражаются хвост, кожа вокруг ануса, лапы, слизистые губ и носа.

Лабораторная диагностика некробактериоза основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Для исследования прижизненно берут соскобы на границе здоровой и некротизированной ткани из области венчика, межкопытной щели, ротовой полости, ноздрей и т.д. Трупы мелких животных доставляют в лабораторию целиком, от крупных животных — паренхиматозные органы и ткани с некротическими очагами. Следует учитывать, что материалы из кожных поражений, слизистой ротовой и носовой полостей, трахеи, гортани, кишечника, содержат другие анаэробные грамотрицательные бактерии из категории представителей нормальной микрофлоры и не только рода *Fusobacterium*, что значительно осложняет исследование. По указанной причине вероятность выделения культуры возбудителя выше, если объектом исследования является гной из абсцессов, жидкость из пораженных суставов, грудная или перитонеальная жидкость, внутренние органы с поражениями. Возбудитель отличается слабой устойчивостью, поэтому образцы материала в лабораторию необходимо направлять в кратчайшие сроки, желательно в анаэробных контейнерах. Для транспортировки образцов подходит модифицированная транспортная среда Cary-Blair. Материал лучше транспортировать и хранить при температуре выше температуры холодильника, так как при низких температурах кислород сорбируется сильнее. В любом случае материал должен быть подвергнут исследованию в течение нескольких часов после взятия.

В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике некробактериоза» (М., 1985) материал для лабораторного исследования направляют в свежем виде или консервируют 30%-ным раствором глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала. Мазки окрашивают по Граму, методу С.Н.Муромцева и Л.Новиковой (цит. по Львову В.М., 1960). В последнем случае пре-

параты фиксируют спирт-формалином (4:1) в течение 10 минут и затем 30 секунд окрашивают раствором фуксин-синьки. Микроскопическая картина: фон — фиолетово-розовый, бактерии — сине-голубые. Приготовление красителя: основной фуксин — 0,15 г, этанол 95° — 20 мл, фенол — 10 мл, метиленовый синий — 0,25 г, вода — 200 мл.

Четкая микроскопическая картина получается при фиксации мазков спирт-эфиром и окрашивании в течение 2-3 секунд фуксином Циля. Может быть использована окраска по Романовскому-Гимза. В мазках-отпечатках из исследуемого материала *F.necrophorum* имеет форму длинных, иногда переплетающихся, неравномерно окрашенных грамотрицательных нитей, длиной 10-100 и более мкм, шириной 0,75-1,0 мкм. Длинные нити часто имеют утолщения. Кроме нитей обнаруживаются единично расположенные палочковидные клетки или цепочки из нескольких клеток, концы могут быть округлыми или заостренными. Нитевидные формы преобладают в пораженной ткани на границе со здоровой. Ближе к здоровой ткани количество нитей уменьшается. В мазках, сделанных из центра некротического фокуса, возбудитель обычно обнаруживается в виде коротких палочек, нити встречаются реже. В мазках из плевральной и перикардальной жидкости возбудитель имеет преимущественно форму длинных нитей.

В мазках из материала могут быть выявлены клетки *F.pseudonecrophorum*, которые чаще имеют форму правильных коротких палочек или кокков. *F.russii* обнаруживается в форме нитей, без утолщений, концы заостренные. Короткие и кокковидные клетки, как правило, не встречаются.

F.simiae обычно имеет форму палочек с заостренными концами, клеток с утолщениями и колбовидных форм нет. *F.necrogenes* и *F.gonidiaformans* по морфологии идентичны *F.necrophorum*. *F.naviforme* преимущественно имеет форму правильных палочек с заостренными концами.

Кроме того, в материале из пораженных конечностей вероятно присутствие бактерий из рода *Bacteroides* — *Bacteroides nodosus*, клетки которого грамотрицательные, размером 1,7x3-6 мкм, неред-

ко с утолщениями на одном или обоих концах, располагаются единично или парами; *Bacteroides melaninogenicus* имеет форму грамотрицательных палочек (0,5-0,8x0,9-2,5 мкм), иногда в виде коротких нитей; *Bacteroides fragilis* и *Bacteroides levii* имеют форму грамотрицательных палочек размером 0,6 -1,3x1,6-8 мкм, располагающихся единично, парами. Таким образом, в окрашенных препаратах из контаминированного материала могут присутствовать сходные по морфологии и тинкториальным свойствам бактериальные клетки. Клетки *F.necrophorum* имеют определенное сходство не только с фузобактериями и бактероидами, но и с клетками некоторых грамположительных бактерий родов *Eubacterium* и *Clostridium*, которые при окраске по Граму легко обесцвечиваются.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. Возбудитель — строгий анаэроб, оптимальное разрежение — 4 -10 мм ртутного столба, температурный оптимум 36-37° С, рН 7,4-7,6, лучше растет на средах с добавлением крови, сыворотки крови, глюкозы, лактозы, дрожжевого экстракта.

Первичные посевы обычно производят на плотные питательные среды с последующей отливкой культур на жидкие среды. Из жидких сред посев материала проводят на среду Кита-Тароцци, мартековский бульон, лучше с добавлением 10% стерильной крови барана или крупного рогатого скота, а также 0,4% глюкозы. Используют тиогликолатный бульон с К-геминовой добавкой. Посев на жидкие среды целесообразно проводить при малом содержании возбудителя в исследуемом материале, с последующим высевом культуры на плотные среды. Для лучшего роста в жидкие питательные среды добавляют 0,4% глюкозы и витаминную К-геминовую добавку, сыворотку крови. Перед использованием среды обязательно выдерживают в течение 20-30 минут в кипящей водяной бане и охлаждают до 37-38° С. По данным Я.Р.Коваленко, *F.necrophorum* растет в стерильной сыворотке крови. Из полужидких сред может быть использован ПЖА по Муромцеву с добавлением 5-10% сыворотки крови, 2% глюкозы, 0,2% цистина.

В качестве плотных сред для первичной изоляции возбудителя применяют глюкозный (1%), сывороточный (10-20%) агар, глюкозо-кровоной агар. Агаровые среды готовят непосредственно перед посевом или выдерживают перед использованием в течение 6-24 часов в анаэробных сосудах. С целью стимуляции роста возбудителя рекомендуется добавлять дрожжевой экстракт, витамин К и гемин. Для создания условий анаэробноза используют общепринятые методы: культивирование на жидких средах под слоем вазелинового или парафинового масла, добавление в среды редуцирующих веществ, на плотных средах в анаэробстатах с удалением воздуха при помощи вакуумного насоса до необходимой степени разрежения или заменой воздуха газовой смесью (H_2 - 10%, CO_2 - 5%, N_2 — 85%) либо с использованием газпакетов (см. «Культивирование анаэробов»).

При исследовании загрязненного посторонней микрофлорой материала рекомендуют для подавления протей добавлять к агару 5,5-6% этанола (95%) перед его разливом в чашки Петри. На такой среде протей теряет способность к ползучему росту и образует округлые, выпуклые, с ровными краями колонии. Культивирование посевов проводят при 36-37° С в течение 5-7 суток, с ежедневным просмотром.

На сывороточно-глюкозном агаре через 48-72 часа инкубирования возбудитель формирует очень мелкие росинчатые колонии диаметром до 1 мм, которые через 4-5 суток достигают диаметра 2-3 мм. Колонии округлые или продолговатые, с гладкой блестящей поверхностью, ровными или слегка зазубренными краями, в центре небольшое углубление, структура мелкозернистая, цвет серовато-белый или зеленоватый до желтоватого. При выращивании на кровяных агаровых средах (кровь кролика) гемолитическая активность варьирует, гемолиз типа β или α . Колонии легко снимаются с поверхности среды и эмульгируются в физиологическом растворе. При культивировании на желточном агаре большинство штаммов проявляют липазную, но не лецитиназную активность. При посеве методом заливок в глубине глюкозного агара на 4-5-е сутки образуются небольшие чечевицеобразные серовато-белые колонии. Ве-

личина и форма колоний зависят от плотности агара. В сывороточном агаре через 2-3 суток формируются непрозрачные четко контурованные колонии с видимыми под малым увеличением микроскопа отходящими нитями.

На полужидком печеночном агаре (0,15%) через 24-72 часа инкубирования возбудитель растет в виде облачка с интенсивным помутнением среды и заметным газообразованием. На мозговой среде возбудитель растет хорошо, после добавления к среде раствора сернокислого железа происходит ее почернение ввиду выделения возбудителем сероводорода. В среде Кита-Тароцци рост наблюдается через 15-48 часов инкубирования в нижних слоях питательной среды, позднее — в верхних. Через 9-10 часов среда просветляется, на кусочках печени формируется ватообразный налет, разбивающийся при встряхивании в равномерную взвесь. Слабое газообразование отмечается только на ранней стадии роста культуры. Для улучшения роста возбудителя в среду добавляют 10% крови или сыворотки крови крупного рогатого скота или барана. В стерильной сыворотке крови *F.necrophorum* через 24-48 часов инкубирования растет в виде сероватых нитевидных хлопьев по всему столбику среды, с последующим формированием осадка.

Морфология клеток *F.necrophorum* в культуре

В первичных культурах, в печеночном бульоне с добавлением сыворотки крови клетки имеют форму нитей с утолщениями, без разветвлений, длиной 10-100 мкм и шириной 0,5-0,7 мкм. В старых бульонных культурах и агаровых преобладают палочки длиной 1,8-2 мкм, шириной 0,5-0,7 мкм. Характерным является неравномерное зернистое окрашивание клеток возбудителя, что хорошо проявляется при фиксации мазков спирт-эфиром и окрашиванием в течение 2-3 секунд фуксином Циля, метиленовым Синим Леффлера или фуксином-синькой по Муромцеву. *F. necrophorum* спор, капсул и жгутиков не образует.

Идентификация *F.necrophorum* по ферментативным признакам. При изучении ферментативной активности у выделенной чистой культуры определяют способность гидролизовать гиппурат, эскулин, образовывать индол, сероводород, кислоту из углеводов.

Для возбудителя некробактериоза характерно: отсутствие способности к гидролизу гиппурата, эскулина, образованию кислоты из галактозы, маннозы, целлобиозы, мелибиозы, сахарозы, трегалозы, раффинозы, салицина; возбудитель непостоянно расщепляет глюкозу, дает кислотообразование на среде с фруктозой, сахарозой, мальтозой. Отдельные штаммы могут ферментировать маннит, дульцит, глицерин; не расщепляет желатину и свернутую сыворотку, не редуцирует нитраты, образует индол и сероводород. Критерии дифференциации *F.necrophorum* от сходных фузобактерий представлены в таблице 84. При изучении ферментативной активности фузобактерий могут быть использованы коммерческие анаэробные идентификационные системы (API 20A, API - LYM, АТВ 32А, Minitек anaerobic 11). Вид *F.necrophorum* неоднороден по биологическим свойствам, что позволяет выделить в нем 4 биотипа (таблица 87).

Биопроба

Проводят с целью выделения чистой культуры возбудителя и проверки патогенных свойств. Выделение чистой культуры возбудителя, ввиду частой контаминации материала сопутствующей микрофлорой, путем посева на питательные среды не всегда успешно. Поэтому изоляция возбудителя с использованием биопробы имеет существенное диагностическое значение. Из лабораторных животных чувствительны кролики и белые мыши. Наиболее удобной лабораторной моделью является кролик. Биопробу проводят одновременно с посевом материала на питательные среды. Исследуемый материал растирают в физиологическом растворе (1:10) и вводят кроликам в дозе 0,5-1 мл подкожно в область средней трети наружной поверхности уха или внутрикожно в область живота. Белым мышам материал вводят в дозе 0,2-0,4 мл подкожно у основания хвоста. В случае необходимости аналогичным образом животных заражают выделенной культурой. Наблюдение за животными осуществляют в течение 10 суток. В положительных случаях на месте инъекции через 3-4 дня или позднее развивается воспалительный процесс с некрозом кожи.

**Таблица 1 - Дифференциальные признаки видов
рода *Fusobacterium***

Признаки	<i>F.necrophorum</i>	<i>F.necrogenes</i>	<i>F.russii</i>	<i>F.simiae</i>	<i>F.gonidioformans</i>	<i>F.pseudonecrophorum</i>
Гидролиз гиппурата	-	-	-/+	+	V	н.д.
Гидролиз эскулина	-	+	-	-	-	-
Рост в среде с желчью (20% КРС)	-/+	-/+	-	+	-	+
Образование индола	+	-	-	+	+	+
Образование H ₂ S	+	+	-/+	+	+	+
Гемолиз	β/a	$\beta/-$	$-\beta$	-	$a/-$	-
Образование кислоты из: Глюкозы	-/w	w/+	-	+	-	w
Галактозы	-	н.д.	-	-	-	-
Маннозы	-	w/+	-	-	-	-
Фруктозы	w/+	w/+	-	+	-	w
Целлобиозы	-	-/w	-	-	-	-
Мелибиозы	-	-/w	-	-	-	-
Сахарозы	-	-/w	-	-	-	-
Трегалозы	-	w/-	-	-	-	-
Рафинозы	-	-/w	-	-	-	-
Салицина	-	-/w	-	-	-	-

Примечание: w — слабая реакция; н.д. — нет данных; v — варьирующая реакция.

У кроликов при заражении в кожу живота процесс распространяется на подкожную клетчатку, брюшные мышцы, развивается перитонит. При генерализации процесса некротические очаги возникают в печени, сердце, легких и других органах. При заражении под кожу уха на месте инъекции формируется язва, затем наступает парез уха и некроз кожи головы. При заражении слабовирулентными штаммами процесс развивается медленнее и некротические очаги обнаруживаются во внутренних органах.

Таблица 2 - Свойства биотипов *F. necrophorum*

Признаки	А	Биотип АВ	В	С
Агглютинация куриных эритроцитов	+	+ /-	-	-
Гемолизин	+	+	+	-
Оседание в жидкой питательной среде	-	+ /-	+	-
Патогенность для мышей суточной бульонной культуры	+++	++	+	-

У зараженных мышей некротический процесс локализуется в коже у корня хвоста, захватывает глубокие ткани. Мыши обычно погибают через 6-10 дней после заражения.

При обнаружении некротических очагов материал берут на границе здоровой и пораженной ткани для микроскопического исследования и посева на питательные среды. Рекомендуется брать для выделения чистой культуры возбудителя у кролика на последней стадии заболевания кровь из сердца (2 мл) и высевать на сывороточный (10%) агар (рН 7,0) методом заливок. Из выросших колоний культуру возбудителя отвивают на жидкие питательные среды (10%-ный сывороточный бульон).

От павших или убитых на 4-5-е сутки зараженных животных, помимо некротических кожных поражений исследуют материал из очагов во внутренних органах. В этом случае вероятность выделения чистой культуры выше.

Лабораторная диагностика копытной гнили овец и коз

Копытная гниль — инфекционная, хронически протекающая контагиозная болезнь овец и коз, характеризующаяся мацерацией и воспалением кожи свода межкопытной щели, прогрессирующим гнойно-некротическим распадом копытного рога и хромотой.

Возбудитель — анаэробная, грамотрицательная, неспорообразующая палочковидная бактерия *Bacteroides nodosus*, рода *Bacteroides*, семейства *Bacteroidaceae*. Род *Bacteroides* содержит

более сорока видов, часть из которых наряду с *B.nodosus* могут быть выделены от больных животных.

Лабораторная диагностика копытной гнили основана на результатах бактериологического исследования

Бактериологическое исследование

Для микроскопического исследования готовят мазки-отпечатки из свежепораженных участков основы кожи копытцев и слизи, покрывающей кожу межпальцевых щелей. Для биопробы материал берут из различных участков копытцев и используют для постановки биопробы немедленно.

Для выделения культуры возбудителя и транспортировки жидкий материал отсасывают в стерильные шприцы, удаляют из них воздух, иглы сгибают. Посмертно отбирают кусочки свежепораженной ткани размером 2 см³. Материал можно также собирать стерильными тампонами, свободными от кислорода, стерилизованными во флаконах, заполненных азотом. Процедуру взятия материала такими тампонами проводят максимально быстро и затем тампон глубоко погружают в транспортную среду Cary-Blair. Кусочки тканей, шприцы с материалом помещают в специальные анаэробные контейнеры, пластиковые термостабильные контейнеры с газогенерирующим содержимым и индикатором анаэробных условий. Исследуемый материал хранят (транспортируют) при температуре выше 4-6° С. Все виды материалов необходимо исследовать в течение пяти часов.

Микроскопическое исследование исходного материала

Мазки из исследуемого материала окрашивают по Граму, а также фуксином Циля (1:10) в течение 6-8 минут, поскольку бактерии плохо воспринимают красители, окраска по методу Грама и изучение морфологии клеток в таких мазках затруднительна. В положительных случаях в поле зрения обнаруживают крупные (3-6x1,7 мкм) грамотрицательные палочковидные бактерии, прямые или слегка изогнутые, часто один или оба конца клетки утолщены и окрашены более интенсивно, чем остальная часть бактерии («гантелевидные» бактерии); располагаются одиночно или последовательно парно. Нередко клетки возбудителя окружены ради-

ально отходящими мелкими грамотрицательными бактериями (феномен Бевериджа).

Наряду с *B.nodosus* в мазках в большом количестве присутствуют сопутствующие микроорганизмы (кокки, палочковидные клетки, спирохеты). Клетки *F.necrophorum* обычно длинные и нитевидные с характерной неравномерностью в окраске. Обычно в поле зрения обнаруживают не более 8-10 клеток возбудителя, и при хроническом течении болезни для выявления *B.nodosus* необходимо просмотреть несколько полей зрения. Эффективно использование на этой стадии исследования метода флуоресцирующих антител.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *B.nodosus* —строгий анаэроб, температурный оптимум 37-38° С, рН 6,7-7,2. Анаэробные условия создают путем удаления из анаэростана воздуха до разрежения 25 мм ртутного столба с последующим введением 5-10% CO₂, 5-10%) H₂ или азота с 10% H₂. Процедуру повторяют трехкратно. Для этой же цели могут быть использованы газ-пакеты. В обоих случаях используют в качестве индикатора анаэробноза раствор метиленового синего, который при рН 7,0 и Eh 71 мВ полностью окислен (окрашен), а при Eh 49 мВ — восстановлен (бесцветный). Посев и культивирование осуществляют в соответствии с принципами Хангейта для строгих анаэробов. Агаровые среды в чашках Петри выдерживают в анаэробных условиях до посева в течение 8-24 часов и сразу же после посева помещают в анаэробные условия. Если такой возможности нет, чашки помещают в сосуд, продуваемый CO₂ свободным от кислорода. Посевы проводят платиновыми или никелевыми, но не нихромовыми петлями. Пипетки, используемые для посева, предварительно заполняют стерильным газом. Манипуляции при посеве исследуемого материала на питательные среды осуществляют в потоке CO₂ свободного от кислорода.

Первичные посевы производят на обогащенные плотные агаровые среды: кровяной (5%) агар на основе сердечно-мозгового, триптически-соевого агара, бруцелла-агара, плотной среды Бектемирова. К указанным средам в качестве стимулятора роста добав-

ляют витамин К, гемин и дрожжевой экстракт. В качестве питательной селективной среды, а также для определения пигментообразования применяют Brucella-агар с канамицином, который добавляют до автоклавирования, ванкомицином и 5% лаковой крови. Последнюю получают путем трехкратного замораживания и оттаивания.

Посев на жидкие питательные среды особенно ценен, если по данным микроскопического исследования содержание *B.nodus* в материале невелико. Используют тиогликолатный бульон, среду Кита-Тароцци, мясо-пептонный бульон с глюкозой, в которые также вносят витамин К-геминовую добавку. Жидкие среды перед посевом прогревают в кипящей водяной бане 15-20 минут, охлаждают и при посеве по возможности не встряхивают. Посев производят пастеровскими пипетками. Инкубирование проводят при 37° С до семи суток. При соблюдении оптимальных условий рост может наблюдаться уже через 48 часов.

Посевы на плотных средах начинают просматривать через 48 часов инкубирования в потоке обескислороженного СО₂. Обращают внимание на образование пигмента на среде с лаковой кровью. На плотных питательных средах *B.nodosus* может формировать колонии трех типов: В, М и С. Колонии В-типа сосочковидные или сферические, обычно формируют вирулентные штаммы, выделяемые от овец. Мукоидные колонии (М-тип) образуют менее вирулентные штаммы от овец и крупного рогатого скота. Колонии С-типа — гладкие, появляются в результате пассирования культур на питательных средах и характерны для штаммов, утративших вирулентность. Часто в поверхности среды под колониями, после их снятия, обнаруживаются углубления. Колонии обычно имеют серо-белый цвет и через 3-7 дней инкубирования достигают диаметра 0,5-3,0 мм.

Размер и форма колоний зависят в определенной степени от состава и консистенции питательной среды. На кровяном агаре с 1,5% агар-агара большинство штаммов образуют мелкие (до 1 мм), гладкие, плоские, прозрачные, с выпуклым центром и неровными краями колонии. На аналогичной среде с 3% агар-агара тот же ви-

рулентный штамм формирует более крупные (диаметр 1,5-2,0 мм) шероховатые колонии. Гемолитической активностью *B.nodosus* не обладает.

В среде Кита-Тароцци с 0,1% агар-агара *B.nodosus* растет в виде серовато-белых вертикально опускающихся тяжей. В аналогичной жидкой питательной среде возбудитель растет с ее равномерным помутнением. На указанных средах в анаэробных условиях могут расти факультативные анаэробы. Микроскопическое исследование мазков, окрашенных по Граму, позволяет дифференцировать *B.nodosus* от некоторых из них. Субкультуры из подозрительных колоний после микроскопического исследования твивают на тиогликолатный или мясной бульон с глюкозой.

Морфология клеток *B. nodosus* в культуре. В мазках из культур морфология клеток *B.nodosus* сходна с таковой у клеток в исследуемом материале. Возбудитель не образует жгутики, капсулу, споры. При окраске по Граму на стадии изучения первичных культур могут быть ошибочно приняты за *B.nodosus* грамположительные анаэробы, потерявшие способность к грамположительной окраске. Для избежания таких ошибок рекомендуется следующий тест: на предметное стекло в две капли КОН (3%-ный, вес/объем) вносят бактериологическую петлю 48-часовой культуры изучаемой колонии с плотной среды и суспендируют на площади 2 см². Если при этом формируются тянущиеся нити, то микроорганизм является грамотрицательным.

Идентификация возбудителя по ферментативным свойствам

При изучении ферментативных характеристик определяют способность культуры образовывать индол, каталазу, сероводород, уреазу, желатиназу, гемолизин, разлагать мясо, гидролизовать крахмал, эскулип, образовывать кислоту из сахаров и высокоатомных спиртов. При пересеве культур соблюдают требования относительно создания анаэробноза, изложенные выше.

Для исследования указанных признаков используют обычные методы или коммерческие анаэробные идентификационные системы API 20A, API-ZYM, АТВ 32А, Minitec anaerobic II и др. Для *B.nodosus* характерна инертность в отношении углеводов и много-

атомных спиртов, образование сероводорода, желатиназы, разложение мяса, отсутствие индола, гемолизина, уреазы, пигмента на агаре с лаковой кровью, отсутствие роста или очень слабый рост на питательных средах с 20% желчи крупного рогатого скота.

Серологическая идентификация *B.nodosus*. На стадии работы со смешанными и чистыми культурами *B.nodosus* идентификация возбудителя может быть проведена при помощи непрямого метода иммунофлуоресценции.

Биопроба. Проводят с целью обнаружения возбудителя в исследуемом материале. Лабораторные животные к *B.nodosus* не чувствительны. Биопробу ставят на здоровых овцах (ягнятах). Материал используют в нативном виде или разводят стерильным физиологическим раствором 1:5. В межпальцевой щели скальпелем делают 10-15 поверхностных линейных разрезов эпидермиса кожи и втирают исследуемый материал. Дополнительно в копытцевые щели помещают ватные тампоны, пропитанные материалом, и копытца на 2-3 дня забинтовывают. Заражение овец проводят в две конечности, животных содержат на влажной подстилке. Как положительный результат биопробы расценивают появление на 4-6-е сутки карманов в результате отторжения рогового и производящего слоев эпидермиса. Позднее отслаиваются внутренние боковые стенки копытца, и через 2-3 недели процесс распространяется на подошву и наружные боковые стенки. По мере развития процесса из пораженных тканей готовят мазки и микроскопически подтверждают наличие *B.nodosus*.

В соответствии с действующей инструкцией «Лабораторная диагностика копытной гнили овец и коз» лабораторный диагноз на копытную гниль в РФ устанавливают на основании результатов микроскопического исследования материала с подтверждением, в случае необходимости, в биопробе.

Питательные среды

Рецепты базовых питательных сред для культивирования *B.nodosus* изложены в других разделах (Brucella-агар, агар Schadler и др.).

Стимулирующая ростовая добавка для выращивания V.nodosus

а) Раствор гемина: 50 мг гемина растворяют в 1 мл 1 N NaOH, добавляют 100 мл воды, автоклавируют при 121° С 15 минут.

б) Раствор витамина К (менадион): 100 мг менадиона растворяют в 20 мл 95%-ного этанола и стерилизуют фильтрацией.

в) смешивают 1 мл менадиона и 100 мл гемина. К 100 мл питательной среды добавляют 1 мл смеси.

г) В питательную среду вносят 0,5% дрожжевого экстракта.

Питательная среда с селективными свойствами.

Базовая среда Brucella-агар, селективные добавки: канамицин — 75 мкг/мл, ванкомицин — 75 мкг/мл.

Плотная среда в модификации Бектимирова. Тщательно очищенные от волосяного покрова голяшки овец вместе с роговым башмаком копытец заливают водопроводной водой и варят в закрытой кастрюле 2-3 часа до отделения тканей от костей. Полученный бульон фильтруют через бейтинг-ткань или ватно-марлевый фильтр. Добавляют 0,5% пептона, 0,5% хлорида натрия и 2% агара. Кипятят до полного растворения агара, устанавливают рН 7,6 и стерилизуют при 120° С 30 минут. В расплавленную и остуженную до 45-50° С среду вносят асептически 0,05% солянокислого цистеина (в виде 2%-ного раствора), 20% среды № 199, 20% дефибрированной крови лошади. Посевы инкубируют в атмосфере углекислого газа.

Жидкая среда в модификации Бектимирова. Смешивают 650 мл бульона из голяшек овцы и 300 мл экстракта головного мозга, добавляют 10 г пептона, 50 мл экстракта копытного рога, 5 г хлорида натрия. Стерилизуют при 120° С 30 минут и разливают по пробиркам. Культивирование проводят в анаэробе в течение 24 ч.

Приготовление экстракта из головного мозга. Головной мозг овцы или крупного рогатого скота заворачивают в марлю, заливают водой и кипятят 15-20 минут, после чего выжимают и растирают в небольшом количестве мясо-пептонного печеночного бульона (МППБ) до получения кашицеобразной массы. Полученную массу

суспендируют в МППБ в соотношении 1:9 и автоклавируют при 120° С 30 минут. Отстоявшуюся после автоклавирования смесь центрифугируют, надосадочную жидкость стерилизуют через фильтр Зейтца и хранят при 4° С.

Приготовление экстракта копытного рога. Копытный рог овцы высушивают и тонко измельчают до получения порошка, смешивают

1 часть порошка и 9 частей 0,8%-ного раствора хлорида натрия. К полученной смеси добавляют 20% трипсина и инкубируют в течение 2-3 суток при 37° С, поддерживая рН 7,5-7,8. Смесь нагревают до 60° С, после чего фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют через фильтр Зейтца.

Контрольные вопросы. 1. Правила взятия, оформления и отправки в лабораторию патматериала для исследования? 2. Как ставят диагноз на некробактериоз и копытную гниль? 3. Дифференциальная диагностика некробактериоза и копытную гниль. 4. Методы лабораторной диагностики некробактериоза и копытную гниль. 5. На чем основана лабораторная диагностика на некробактериоз и копытную гниль?

Список использованной литературы

1. Акатов А.К., Зуева В.К. Стафилококки. М.: «Медицина», 1983.
2. Антонов Б.И, Борисова В.В, Волкова П.М. и др. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986.
3. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва. Владимир: «Посад», 2001.
4. Бакулов И.А., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. Особо опасные болезни животных. Покров.: ВНИИВВиМ, 1998.
5. Белоусов В.И., Каврук Л.С, Малахов Ю.А. и др. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. М., 2000.
6. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонады. М.: «Медицина», 1990.
7. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред.

- проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.
8. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.
9. Колычев Н. И. Ветеринарная микробиология и иммунология. Омск 1996г.
10. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Костенко Т.С., Родионова В.Б, Скородумов Д.И. М.: Колос, 2001.
12. Сидоров М.А, Скородумов Д.И, Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. – М.: Колос, 1995.
13. Скородумов Д.И, В.В. Субботин, Сидоров М.А, Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: ИзографЪ, 2005.
14. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных. – Краснодар. - 2009, 575 с.

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,
Г.А. Джаилиди, Зеркалев Д.Ю.
Учебное пособие «Диагностика некробактериоза и копытной гнили
животных»

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13