

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ**

**Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии**

**Государственное управление ветеринарии  
Краснодарского края**

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

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

**ДИАГНОСТИКА ИЕРСИНИОЗОВ  
ЖИВОТНЫХ**

**Учебное пособие**

**г. Краснодар, 2013**

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии**

**Государственное управление ветеринарии  
Краснодарского края**

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

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

**ДИАГНОСТИКА ИЕРСИНИОЗОВ  
ЖИВОТНЫХ**

**Учебное пособие**

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

**КРАСНОДАР, 2013**

УДК 619:616.98-07:579.842.23(075)

ББК 48.73

Д 44

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,  
Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев, Е.А. Горпинченко, А.В. Скориков  
Учебное пособие «Диагностика иерсиниозов животных».  
Краснодар: КубГАУ, 2013. 27 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителей иерсиниозов 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 иерсиниозов животных

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

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

Род *Yersinia* согласно «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (1994) объединяет 11 видов: *Y. pestis*; *Y. pseudotuberculosis*; *Y. enterocolitica*; *Y. kristensenii*; *Y. intermedia*; *Y. frederiksenii*; *Y. aldovae*; *Y. rohdei*; *Y. mollaretii*; *Y. bercovieri*; *Y. ruckeri*. Из них зоопатогенными видами являются: *Y. pestis* — возбудитель чумы, острого инфекционного заболевания животных и человека, относящегося к группе особо опасных инфекций; *Y. pseudotuberculosis* — возбудитель псевдотуберкулеза животных; *Y. enterocolitica* — возбудитель иерсиниоза животных и человека; *Y. ruckeri* — возбудитель «красного рта» радужной форели и других видов рыб, остановимся на диагностике иерсиниоза и псевдотуберкулеза.

Иерсиниоз - инфекционная болезнь многих видов животных и человека, характеризующаяся у молодняка животных гастроэнтероколитами с развитием диареи (фекалии нередко с примесью крови), которая может перемежаться с запорами. Реже могут наблюдаться артриты, конъюнктивиты, дерматиты и бронхопневмония. У коров могут наблюдаться маститы, эндометриты, рождение нежизнеспособного приплода, энтериты. У кроликов болезнь протекает в виде эпизоотии с высокой летальностью. При этом у больных животных отмечают анорексию, прогрессирующее истощение, субфебрильную температуру и последующий смертельный исход. Широко распространено длительное бактерионосительство. У человека кроме диареи возможно развитие псевдоаппендицита, мезентериального лимфаденита, артритов, менингита, гепатита, поражения сетчатки, сепсиса, сопровождающегося высоким уровнем смертности.

Возбудителем болезни является *Y. enterocolitica*. Эти бактерии выделены практически от всех видов млекопитающих, птиц, рыб,

земноводных, моллюсков, насекомых. Они обнаружены в воде, почве, сточных водах, пищевых продуктах, включая овощи и фрукты. Широкой распространенности иерсиний способствуют их психрофильные свойства (способность размножаться и накапливаться в различных питательных субстратах при 4° С).

Псевдотуберкулез — инфекционная болезнь многих видов животных и человека, характеризующаяся преимущественно латентным течением, мезентериальным лимфаденитом, длительным расстройством деятельности желудочно-кишечного тракта. Возможно развитие тяжелой септицемии. У лошадей может наблюдаться пневмония и сильное обезвоживание на фоне диареи. У крупного рогатого скота наблюдают пневмонию, аборт и маститы. Аборты и маститы при псевдотуберкулезе могут быть у овец и коз. У кроликов болезнь возможна в острой, подострой и хронической формах. У птиц отмечают острую форму заболевания с развитием поносов, одышки, истощением, взъерошенностью шерсти, потемнением кожных покровов. У собак и кошек псевдотуберкулез чаще всего начинается остро без заметного продромального периода. Появляются лихорадка, угнетение, анорексия, диарея, рвота, боль в мышцах при пальпации. В ряде случаев отмечают кашель, а также признаки поражения печени (желтушное окрашивание склер, темный цвет мочи). Нередко клинические признаки кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза оказываются весьма сходными.

У людей различают кишечную, скарлатиноподобную, артритную формы течения псевдотуберкулеза. Нередко болезнь протекает с поражением печени и напоминает болезнь Боткина. Возможно развитие септической формы, особенно у детей, пожилых и ослабленных лиц.

Возбудителем болезни является *Y. pseudotuberculosis*, выделяемая от млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, земноводных, членистоногих и рыб.

Принципиальные схемы лабораторной диагностики кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза сходны и потому ниже излагаются совместно.

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

**Бактериологическое исследование** включает в себя обнаружение возбудителя в исходном материале методом световой и люминесцентной микроскопии, выделение чистой культуры и иден-

тификацию возбудителя по культурально-морфологическим, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

### **Бактериологическое исследование**

Для исследования направляют свежие трупы мелких животных и птиц целиком, трубчатая кость, доля печени с желчным пузырем, селезенка, почка, отрезки тонкого и толстого отделов кишечника, перевязанные с двух сторон, мезентериальные и подчелюстные лимфоузлы, корень языка, миндалины.

С целью прижизненной диагностики используют фекалии. При наличии в фекалиях примеси крови, слизи, гноя, пленок для исследования отбирают именно такие пробы. Наибольшие шансы на выделение возбудителя имеются, если материал отбирают в период острого течения болезни при повышенной температуре тела.

**Микроскопическое исследование исходного материала.** Из поступившего материала готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Иерсиний являются грамотрицательными прямыми палочками с закругленными концами, иногда имеют вид коккобактерий. Диаметр клеток 0,5-0,8 мкм, длина от 0,8-1,2 до 2,0-3,0 мкм.

### **Выделение и идентификация культур иерсиний**

**Культивирование.** Возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза являются факультативными анаэробами, обладающими и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Хемоорганотрофы. Оптимальная температура культивирования 22-28° С, но размножаться они способны при температурах от 2 до 40° С. Диапазон рН 6,0-9,0, оптимальная величина рН 7,4-7,6.

Иерсиний хорошо растут на дезоксихолатном агаре, средах Мак-Конки, Эндо, Серова, СБТС. Среда Плоскирева и висмут-сульфит агар обладают выраженным ингибирующим действием на иерсиний обоих видов. Оба возбудителя способны расти на голодных средах (голодно-кислый агар, фосфатно-буферный раствор и др.).

Высеву исследуемого материала на питательные среды обычно предшествует его обогащение, позволяющее повысить эффективность выделения культур иерсиний.

Общепризнанным методом обогащения материала при исследованиях на иерсиниозы является метод холодного обогащения, ос-

нованный на способности иерсиний размножаться в питательных субстратах при низких плюсовых температурах. Большинство других микроорганизмов, включая и энтеробактерии иных родов, такой способностью не обладает. Способность *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* расти на голодных средах и использование в силу этого фосфатно-буферного раствора в качестве среды обогащения, придают методу дополнительную эффективность.

Исследуемый материал массой не менее 20 г растирают в ступках. Измельченные пробы вносят в пробирки со стерильной средой обогащения (фосфатно-буферный раствор) в соотношении 1:5. Пробирки помещают в холодильник при температуре 4° С. Начиная со вторых-третьих суток хранения из пробирок начинают делать ежедневно (до получения положительных результатов, но не более 15 суток хранения) высевы на среду Эндо или среду с индикатором бромтимоловым синим (СБТС), являющуюся дифференциально-диагностической для выделения возбудителей иерсиниоза и псевдотуберкулеза.

Существенным недостатком классического метода холодного обогащения является его длительность (до 15 суток), из-за чего бактериологические исследования в ряде случаев затягиваются до 28 суток. Устранить этот недостаток позволяют рекомендуемые для выделения и идентификации чистой культуры *Y. enterocolitica* экспресс-методы, предусматривающие использование «холодового удара», «теплого удара» и «щелочной обработки».

При применении метода «холодового удара» пробирки с исследуемым материалом помещают в холодильную камеру при температуре минус 18° С на 18 часов. Затем материал оттаивают и делают из него высевы на среды Эндо или СБТС.

При использовании метода «теплого удара» пробирки с исследуемым материалом помещают в термостат при 42° С на 18 часов. После этого производят посевы на среды Эндо или СБТС.

Для метода «щелочной обработки» предварительно готовят 40%-ный раствор едкого кали на стерильной дистиллированной воде и хранят его в холодильнике. Перед проведением исследований из 40%-ного раствора готовят 0,5%-ный раствор едкого кали на стерильном 0,5%-ном растворе натрия хлорида. Для этого в стерильных условиях смешивают 7,9 мл 0,5%-ного раствора натрия хлорида с 0,1 мл 40%-ного раствора едкого кали.

Приготовленный таким образом раствор щелочи разливают по 0,2 мл в лунки полистироловой пластины и вносят в них 0,2 мл исследуемого материала в среде обогащения. Смесь тщательно перемешивают. Выдерживают в течение 3-5 мин и делают высевы в бульон Хоттингера. Посевы инкубируют при 37° С в течение суток и делают из них высевы в чашки со средами Эндо или СБТС.

Помимо фосфатно-буферного раствора в качестве сред обогащения могут быть использованы буферно-казеиново-дрожжевая среда, 1%-ная забуферная пептонная вода, 1%-ная пептонная вода с добавлением  $K_2HPO_4$ .

Исследуемый материал с жидких сред обогащения высевают на среду Эндо или СБТС петлей из верхней трети слоя среды (но не с поверхности). Перед посевом содержимое пробирок не взбалтывают. Посевы инкубируют при 22-25° С в течение 18-24 час (на СБТС — в течение 48 час). По истечении этого срока посевы просматривают и характерные для иерсиний колонии пересевают на слабощелочной МПА или агар Хоттингера. Посевы инкубируют при 22-25° С в течение суток. Из типичных изолированных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Из тех же колоний делают высевы на питательный бульон для определения оксидазной активности. Посевы инкубируют при 22-25° С в течение суток. В бульонные культуры добавляют 0,2 мл оснафтола и 0,3 мл диметилпарафенилендиамина, содержимое пробирок перемешивают. При наличии оксидазы в течение 30 сек происходит окрашивание бульона в фиолетовый цвет. Дальнейшему изучению подлежат только грамтрицательные, не образующие оксидазу культуры (сем. *Enterobacteriaceae*). Такие культуры высевают на среду Клиггера и среду с мочевиной по Кристенсену. Для дальнейшего изучения отбирают культуры, не образующие сероводород (оранжево-красный цвет среды Клиггера не изменяется в черный после 24 час инкубирования посевов), обладающие уреазной активностью (красно-малиновое окрашивание среды Кристенсена в течение 1-4 суток инкубирования посевов).

**Характер роста иерсиний на питательных средах.** На плотных питательных средах при 4-28° С оба возбудителя в аэробных условиях образуют колонии S-формы. На агаре Хоттингера и МПА через 18-24 часа образуются круглые с ровными краями, полупрозрачные, блестящие колонии с голубоватым оттенком, мягкой консистенцией и диаметром 0,5-1,0 мм. На агаре Эндо колонии круг-



лые, выпуклые, блестящие с ровными краями, бесцветные со слегка розоватым оттенком, диаметром от 0,1 до 1,0 мм.

На СБТС агаре через 48 часов на сине-голубом фоне среды образуются голубые колонии с фестончатым краем, выпуклым центром и суховатой матовой поверхностью, диаметром 1,5-2,0 мм. При взятии петлей они сдвигаются по поверхности агара. Иногда (особенно у возбудителя псевдотуберкулеза) виден светло-голубой ободок по краю колонии. Колонии других энтеробактерий, не разлагающих мочевины (эшерихии, сальмонеллы и др.), изменяют окраску среды, приобретая желтый цвет и характерную морфологию (сочные, выпуклые). В жидких средах (МПБ, бульон Хоттингера) образуют равномерное помутнение.

При температурах культивирования свыше 28° С микроорганизмы обоих видов диссоциируют в R-форму. При этом на плотных питательных средах, наряду с описанными выше колониями S-формы, появляются колонии с выраженным полиморфизмом по размеру, форме, цвету (особенно при температуре 37° С и выше). Чаще всего R-формы колоний имеют бугристую поверхность, неправильную форму, неровные изрезанные края, коричнево-желтоватый цвет. Нередко они имеют суховатую консистенцию. В жидких средах R-формы образуют помутнение и хлопьевидный осадок либо осадок и рыхлую поверхностную пленку с прозрачной надосадочной жидкостью.

**Морфология иерсиний в культуре.** В мазках из культур возбудители обоих видов представляют собой грамотрицательные овоидные палочки или коккобактерии размером 0,5- 0,8x1,0-3,0 мкм. Спор и капсул не образуют. *Y. enterocolitica* чаще располагается в мазках поодиночно, но может образовывать и цепочки различной длины. *Y. pseudotuberculosis* цепочки образует чаще, а также может окрашиваться биполярно.

Иерсиний обоих видов подвижны при температуре ниже 30° С (подвижность выражена максимально при 20-22° С) за счет перитрихально расположенных жгутиков и неподвижны при 37° С. У *Y. enterocolitica* подвижность обычно выражена в большей степени, чем у *Y. pseudotuberculosis*.

**Идентификация иерсиний по ферментативным признакам.** Выделенные чистые культуры микроорганизмов с характерными для иерсиний культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами относят к роду *Yersinia* на основании изучения их

ферментативных свойств. К иерсиниям относят штаммы микроорганизмов, не обладающие оксидазной активностью, не образующие сероводород, уреазопозитивные, дающие положительную реакцию с метиловым-красным, отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра (при 37° С), не растущие на среде Симмонса, не образующие лизиндекарбоксилазу, фенилаланиндезаминазу, подвижные при 4-28° С и неподвижные при 37-42° С, не ферментирующие лактозу и ферментирующие с образованием кислоты маниит, L-арабинозу. Ни *Y. pseudotuberculosis*, ни *Y. enterocolitica* не растут в присутствии KCN. При дифференциации *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* следует иметь в виду, что *Y. pseudotuberculosis* не ферментирует лактозу, сахарозу, раффинозу, целлобиозу, дульцит, инозит, сорбит, инулин и D-арабинозу, но ферментируют с образованием кислоты глюкозу, галактозу, L-арабинозу, левулезу, маннозу, ксилозу, рамнозу, мальтозу, трегалозу, маинит и салицин; редуцируют нитраты, метиловый синий; вступают в реакцию с метиловым красным; образуют каталазу; обладают уреазной активностью; не образуют ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра при температурах 25 и 37° С.

*Y. enterocolitica* не ферментируют лактозу (есть лактозоположительные варианты, часто среди сероваров 05 и 07, 8), рамнозу, раффинозу; не обладают фенилаланиндезаминазой, лизиндекарбоксилазой и аргининдегидролазой. Реакция Фогес-Проскауэра положительная при температуре 25° С и отрицательная при 37° С.

Другие 8 видов рода *Yersinia*, а именно: *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Yruckeri* могут находиться в испражнениях людей, животных и в смывах с предметов окружающей среды. Они так же, как *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* хорошо растут на питательных средах для выделения иерсиний. Тесты, позволяющие дифференцировать *Y. pseudotuberculosis*, 5 биоваров *Y. enterocolitica* от других часто встречающихся видов иерсиний, представлены в таблице 1.

**Таблица 1 - Основные биохимические свойства *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica*, отличающие их от других видов рода *Yersinia***

Тесты	Y.pseudotuberculosis	Y. enterocolitica					Y. frederiksenii	Y. intermedia	Y. kristensenii	Y. aldovae
		Биовары								
		I	II	III	IV	V				
Лактоза 37° С	-	+	-	-	-	-	d	d	-	-
Мальтоза 37° С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Сахароза 37° С	-	+	+	+	+	d	+	+	-	-
Фогес-Проскауер 37° С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Фогес-Проскауер 25° С	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Рамноза 25° С	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Цитрат Симмонса 37° С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Цитрат Симмонса 25° С	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d
Индол	-	+	+	-	-	-	+	+	d	-
Ксилоза 37° С	+	+	+	+	-	-	+	+	d	d
Салицин 37° С	d	+	-	-	-	-	+	+	d	-
Сорбит 37° С	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Трегалоза 37° С	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

Обозначения: «+» — признак положительный; «-» — признак отрицательный; «d» — признак варьирует у различных штаммов.

Возбудитель псевдотуберкулеза по ряду свойств сходен с возбудителем чумы (*Y. pestis*) и в ряде случаев, главным образом при исследовании материала от грызунов (особенно в природных очагах чумы), когда посевы из органов производят непосредственно на плотные питательные среды, может возникнуть необходимость дифференциации этих возбудителей. Основные отличительные признаки *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* представлены в таблице 2.

**Таблица 2 - Свойства и дифференциация *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis***

Тест или свойство	Реакция	
	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>

Подвижность при 37° С	-	-
Подвижность при 25° С	-	+
Гидролиз мочевины	-	+
Ферментация адонита	-	+
Ферментация L-рамнозы	-	+
Ферментация мслибиозы	-	+
Чувствительность к фагу при 37° С	+	d
Чувствительность к фагу при 25° С	+	-
Реакция с антисывороткой к фракции I <i>Y.pestis</i>	+	-
Продукция коагулазы	+	-
Продукция фибринолизина	+	-
Патогенность для мышей	+	+
Патогенность для белых крыс	+	-
Патогенность для морских свинок	+	+
Патогенность для кроликов	-	-

Наиболее ценными для дифференциации этих возбудителей являются тесты, характеризующие их отношение к мочеvine, подвижность, наличие фибринолизина и плазмокоагулазы. Кроме того, следует учитывать неприхотливость к питательным средам *Y.pseudotuberculosis* и отсутствие полиморфизма у колоний *Y.pestis*, который обычно растет на специальных средах, и при 28° С на вторые сутки образует колонии только R-формы. При подозрении на выделение *Y.pestis* дальнейшую идентификацию проводят в специализированных учреждениях.

Культуры, отнесенные к видам *Y.enterocolitica* и *Y.pseudotuberculosis*, подвергают серологической идентификации в реакции агглютинации на стекле. Завершающим этапом является определение патогенных свойств выделенных штаммов иерсиний.

**Серологическая индикация и идентификация иерсиний.** *Y.enterocolitica* имеют соматический (O) и жгутиковый (H) антигены. У вирулентных штаммов обнаруживаются V- и W-антигены, расположенные в наружной мембране клетки. У отдельных штаммов имеется антиген K1, связанный с фимбриями и разрушающийся только автоклавированием при 120° С в течение час.

O-антигены возбудителя кишечного иерсиниоза являются полисахаридами, устойчивыми к нагреванию и действию этанола. Согласно классификации Winbland—Wauters по O-антигену различа-

ют более 60 сероваров *Y. enterocolitica*, которые обозначают арабскими цифрами 1,2 и т.д. Часть сероваров имеет разделение на субсеровары, обозначаемые буквами а, в и т.д. Также буквами обозначают и жгутиковый термолабильный антиген, разрушающийся при кипячении.

Наиболее распространенными среди животных и людей являются серовары: 01,2а,3; 02а, 2в,3; 03; 04,32; 04,33; 05; 05,27; 06,30; 06,31; 07,8; 08; 09; 010; 013,7; 014; 015; 018; 019, 8; 020; 021 и 022.

*Y. enterocolitica* серовара О3 распространены на всех континентах. Частота их обнаружения на территории России составляет от 15 до 60% и более. Далее следуют серовары 04,32 и 05,27 (10-50%), 07,8 (5-10%) и 09 (1-30%). Другие из названных сероваров встречаются значительно реже. Часть культур типировать не удастся.

*Y. pseudotuberculosis* имеют жгутиковый антиген (Н), 2 соматических (О) антигена S и R, антигены вирулентности — V и W, расположенные в наружной мембране и выраженные при температуре культивирования иерсиний 37° С. Н-антиген образуется при температуре 18-20° С, термолабилен и не имеет диагностического значения. R-антиген является общим для всех псевдотуберкулезных бактерий, а также и для *Y. pestis*. Обнаружена общность этого антигена с сальмонеллами групп В и D. По S-антигену различают 8 сероваров *Y. pseudotuberculosis*, обозначаемых римскими цифрами (I-VIII). Большая часть штаммов, выделенных на территории России, как и в других странах, от животных, человека, из объектов внешней среды, относится к серовару I (60-90%). На втором месте по частоте обнаружения находится серовар III (10-30%). Серовары II, IV, V обнаруживают в 2-8% случаев. О циркуляции в нашей стране *Y. pseudotuberculosis* сероваров VI, VII и VIII сведений нет.

Антигенные связи *Y. pseudotuberculosis* и большинства сероваров *Y. enterocolitica* слабые и выявляются лишь иммунодиффузионными методами. Более значительные антигенные взаимодействия, проявляющиеся в традиционной РА, имеют место у возбудителя псевдотуберкулеза серовара I с культурами *Y. enterocolitica* сероваров 08; 018 и 021.

Оба возбудителя имеют общий антиген с энтеробактериями других видов, за счет чего могут быть получены положительные реакции с сыворотками к некоторым представителям этого семейства. У *Y. pseudotuberculosis* установлены антигенные связи с сальмонеллами шигеллами и эшерихиями, у *Y. enterocolitica* — с саль-

монеллами, протейями, серрациями, гафниями, клебсиеллами. Особо следует отметить наличие антигенного родства у серовара 09 с представителями рода *Brucella*.

В связи с этим в благополучных по бруцеллезу хозяйствах нередко выявляются неспецифические реакции с бруцеллезным диагностикумом, обусловленные инфицированием крупного рогатого скота *Y.enterocolitica*. Возбудитель кишечного иерсиниоза имеет антигенное родство с холерным вибрионом и возбудителем туляремии. С *Y.pestis* близкие антигенные связи и постоянные перекрестные положительные результаты реакций имеет возбудитель псевдотуберкулеза. *Y.enterocolitica* не имеет антигенных связей с *Y.pestis*.

Серологической идентификации подлежат культуры, отнесенные по биохимическим свойствам к видам *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica*. Ее проводят с помощью реакции агглютинации на стекле с диагностическими сыворотками к наиболее распространенным сероварам иерсиний. Наборы, выпускаемые для этих целей (Санкт-Петербургский институт им. Пастера), включают сыворотку, поливалентную к I-V сероварам, и сыворотки, моновалентные к I и III сероварам *Y.pseudotuberculosis*, а также сыворотки к сероварам: 03; 04,32; 04,33; 05,27; 05; 06,30; 07,8; 08; 09 и 013,7 *Y.enterocolitica*.

*Реакция агглютинации* ставится по общепринятой методике. С этой целью из флакона пастеровской пипеткой набирают сыворотку, не захватывая при этом осадка со дна флакона. Каплю сыворотки наносят на предметное стекло и тщательно растирают в ней петлю 20-24-часовой агаровой культуры испытуемого штамма. После получения гомогенной суспензии стекло покачивают осторожными круговыми движениями. Положительная реакция (агглютинация) наступает сразу или не позднее 2-3 мин в виде склеивания бактериальной массы с образованием плотных, с трудом разбивающихся зернышек. Жидкость при этом полностью или частично просветляется.

При отрицательной реакции смесь сыворотки и бактериальной массы остается в виде равномерной гомогенной взвеси.

В последние годы разработан и успешно апробирован ряд методов диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, направленных на обнаружение возбудителей или их антигенов в патологическом материале от павших животных, а также в копро-

фильтратах и моче больных животных с подозрением на псевдотуберкулез и иерсиниоз.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** В последнее десятилетие установлена прямая зависимость между степенью выраженности вирулентных свойств *Y.pseudotuberculosis* и концентрацией антигенов вирулентности в наружной мембране. Показано, что для реализации адгезии возбудителя к эпителию слизистой оболочки кишечника с последующей инвазией и размножением в эпителии и макрофагах необходима экспрессия белков наружной мембраны (БНМ) — антигенов вирулентности. Данное обстоятельство делает перспективным использование БНМ с диагностическими целями.

В настоящее время разработано и апробировано 3 варианта тест-систем для ИФА, направленного на обнаружение БНМ иерсиний:

*ИФА-ЛПС* — псевдотуберкулезная система с широким спектром применения как для диагностики псевдотуберкулеза, так и для решения эпидемиологических вопросов. Чувствительность метода —  $10^5$  микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$  пробы, что соответствует 100 мкг/мл липополисахарида возбудителя. Эффективность метода 70,2-81,1%;

*ИФА-БНМ-1* — тест-система для ранней диагностики псевдотуберкулеза. Обладает строгой специфичностью и позволяет выявлять возбудителя в органах и тканях животных, копрофильтратах и моче. Она наиболее эффективна при исследовании материала в начальный период болезни, когда антигены обнаруживаются в 69-84% проб копрофильтратов и в 21-38% проб мочи. Чувствительность метода  $10^8$ - $5 \times 10^5$  микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$ ;

*ИФА-БНМ-П* — тест-система для выявления антигенов возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в материалах от больных (копрофильтраты, моча), павших и вынужденно убитых животных.

Для определения видовой принадлежности выявленных иерсиний (антигенов возбудителя) пробы, давшие положительную реакцию в тест-системе ИФА-БНМ-П, проверяют в тест-системе ИФА-ЛПС для выявления возбудителя (антигенов) псевдотуберкулеза.

Чувствительность метода —  $10^5$  микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$ , эффективность — до 83,6% положительных проб при исследовании копрофильтратов в первые 5 дней болезни. На пике инфекционного процесса данным методом выявляют до 70% инфицированных животных.

Для исследования материала в тест-системе ИФА-БНМ-П копрофильтраты, выпот брюшной полости вносят в фосфатно-буферную или буферно-казеиново-дрожжевую среду в количестве 1 г на 5 см<sup>3</sup> среды для подращивания при температуре 3-7° С. Внутренние органы и ткани растирают с этими средами в ступке (соотношение 1:5). Образцы исследуют в первые сутки получения проб и затем на 3-5-е сутки от начала подращивания. Мочу исследуют в нативном виде.

Результаты учитывают визуально или спектрофотометрически. В первом случае реакцию оценивают в крестах по интенсивности появляющегося коричневого окрашивания в лунках. Положительной считают реакцию с пробой, которая дала реакцию не менее чем на ++, и по интенсивности окраски существенно отличается от проб отрицательного контроля (К-, оцененные как «-» или «+»). Положительные результаты должны быть и в пробе с положительным контролем (К +).

При спектрофотометрическом учете результатов содержимое лунок с отрицательным контрольным образцом (К-) используют в качестве нулевого контроля. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 450 нм и считают результат положительным, если коэффициент поглощения светового потока исследуемого образца достигает величины не менее 0,05.

Наборы компонентов для постановки всех трех вариантов ИФА разработаны Санкт-Петербургским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Каждый из компонентов рассчитан на проведение 192 анализов, включая контроли.

**Реакция коаггутинации (РКА).** Для постановки РКА пробы мочи и копрофильтратов (с подращиванием и без него) прогревают в водяной бане в течение 30-40 мин, центрифугируют, фильтруют и исследуют надосадочную жидкость. Сыворотку крови исследуют в нативном состоянии.

На предметное стекло, разделенное на необходимое число секторов, наносят капли исследуемого материала. В каждую из капель исследуемого образца добавляют по 1 капле коаггутинирующих диагностикумов различных видов и сероваров иерсиний, в последнюю каплю вносят взвесь несенсибилизированных стафилококков (отрицательный контроль). В качестве положительного контроля на отдельном предметном стекле смешивают по 1 капле каждого использованного диагностикума с 1 каплей липополисахарида соот-



ветствующих бактерий в концентрации 10-20 мкг/см<sup>3</sup>. Капли перемешивают осторожным покачиванием стекла, не допуская слияния проб, расположенных рядом. Результат реакции учитывают через 5-30 минут экспозиции стекол во влажной камере по образованию хлопьев агглютината стафилококков и просветлению жидкости.

*РКА* наиболее эффективна в начальный период острого заболевания (1-5-й дни), при других формах — в сроки максимальной выраженности клинических признаков. По данным различных авторов чувствительность данного метода исследований составляет 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> микробных клеток/см<sup>3</sup>. Эффективность при кишечном иерсиниозе — до 85%, при псевдотуберкулезе — до 60-70% в первые 5 дней от начала болезни. В отличие от РА при постановке РКА не наблюдается перекрестных реакций с другими представителями энтеробактерий, бруцеллами. Использование РКА сокращает сроки исследования на иерсиниоз с 14-17 до 3-4 суток в сравнении с традиционным бактериологическим исследованием.

**Реакция латекс-агглютинации (РЛА).** РЛА используют для выявления антигенов возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в копрофильтратах и в смывах с объектов внешней среды. В отличие от РКА, в качестве носителей иммуноглобулинов используют частицы латекса, которые не обладают антигенностью, а потому предпочтительнее стафилококка. Латексный псевдотуберкулезный диагностикум выпускается Санкт-Петербургским НИИ вакцин и сывороток. Сконструированы латексные диагностикумы и для индикации *Y. enterocolitica* сероваров 03; 05, 30; 07,8.

Чувствительность метода — 10<sup>6</sup> микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> исследуемой пробы. Диагноз на псевдотуберкулез данным методом может быть подтвержден у 73% больных животных.

Большинство штаммов *Y. enterocolitica*, выделяемых на территории Российской Федерации от животных, человека и из объектов внешней среды, относятся к сероварам 03; 09; 05, 27; 08; 06, 30. В Европе преобладают бактерии сероваров 03 и 09, в США — 08, на Дальнем Востоке — 06.

В многочисленных работах, посвященных изучению иерсиниозов у животных, сообщается, что практически на всех территориях от свиней изолируют *Y. enterocolitica* сероваров 03; 04,32; 05; 05,27; 06,30; 07; 08; 09; 011;012;017 и 019, а иерсиний, выделенные от крупного рогатого скота, относятся к сероварам 03; 04; 05,27; 07,8; 012; 013 и 018.

**Определение патогенности** *Y.pseudotuberculosis* являются патогенными микроорганизмами. У них, в отличие от *Y.enterocolitica*, отсутствует зависимость вирулентности от наличия плазмиды, контролирующей синтез V- и W-антигенов и кальцийзависимость роста, поскольку бесплазмидные варианты сохраняют инвазивные и цитотоксические свойства. Это указывает на определяющую роль хромосомного контроля основных патогенных свойств *Y.pseudotuberculosis*. Поэтому выделение чистой культуры, отнесение ее к виду *Y.pseudotuberculosis* и определенному его серовару являются достаточными основаниями для постановки диагноза на псевдотуберкулез. Однако и в этом случае иногда прибегают к постановке биопробы. С этой целью ставят кератоконъюнктивальную пробу (тест Шереня) на морских свинках. При этом в один из конъюнктивальных мешков животного инокулируют каплю суспензии испытуемого штамма концентрацией  $10^{10}$  микробных тел. При положительном результате в течение 48-72 час развивается гиперемия конъюнктивы, отек век и сужение глазной щели, наблюдают серозно-гнойное истечение.

Возможно использование для постановки биопробы и белых мышей, которых заражают орально, внутривенно или внутрибрюшинно. В зависимости от метода инокуляции псевдотуберкулезного возбудителя, животные погибают на 3-9-е сутки. На вскрытии обнаруживают увеличение печени и селезенки, которые имеют многочисленные некротические очажки, напоминающие туберкулезные бугорки, но в отличие от них, не подвергающиеся обызвествлению. Аналогичные абсцессы или узелки обнаруживают и в легких.

К безусловно патогенным *Y.enterocolitica* относятся бактерии сероваров 03; 04, 32; 05; 05, 27; 06, 30; 07,8; 08; 09 биоваров II и IV, реже I и III. Наряду с ними выделяется и значительная часть апатогенных иерсиний. При этом принадлежность того или иного штамма к определенному серологическому и биологическому варианту далеко не всегда подтверждает либо опровергает его этиологическую значимость. Имеется достаточно сообщений о выделении патогенных штаммов иерсиний серобиоваров, ранее считавшихся непатогенными, и наоборот. Из-за столь неоднозначной роли различных серобиоваров *Y.enterocolitica* в патологии животных для правильного решения вопроса о патогенности того или иного штамма,

а следовательно, и для правильной постановки диагноза необходимы дополнительные исследования его факторов вирулентности.

Для большинства патогенных штаммов *Y. enterocolitica* характерны выраженные адгезивные свойства, обуславливающие колонизацию возбудителя на энтероцитах, а также энтеротоксигенность. Продуцируемый возбудителем в больших количествах термостабильный энтеротоксин весьма сходен с таковым энтеротоксигенных неинвазивных эшерихий.

Механизм действия термостабильного энтеротоксина *Y. enterocolitica* связан с активацией аденилатциклазы в эпителиальных клетках кишечника, что ведет к накоплению циклического гуанозинмонофосфата и нарушению водноэлектролитного баланса и энтеросорбции. В реализации действия энтеротоксина принимают участие и простоглаидины. Наблюдаемая при этом колонизация энтероцитов при минимальной инвазии или ее отсутствии подтверждает важную роль энтеротоксина в патогенезе кишечного иерсиниоза. Энтеротоксигенные *Y. enterocolitica* вызывают у животных и человека диареи различной интенсивности.

Штаммы *Y. enterocolitica*, обладающие инвазивностью, способностью размножаться в органах и тканях организма хозяина, вызывают генерализованную инфекцию. Корреляции между энтеротоксигенностью и инвазивностью у данного возбудителя не установлено.

В отличие от *Y. enterocolitica*, у *Y. pseudotuberculosis* установлены максимальная инвазивность, цитотоксичность и способность к генерализации инфекции. Действие энтеротоксина *Y. pseudotuberculosis* на слизистую оболочку кишечника выражено значительно меньше, чем у *Y. enterocolitica*.

К настоящему времени установлено, что к возбудителю кишечного иерсиниоза чувствительны некоторые лабораторные животные: гибель морских свинок наблюдается при внутрибрюшном их заражении патогенными иерсиниями в дозе  $3 \times 10^9$  микробных клеток в течение 24-48 часов. К подкожному введению возбудителя животные оказались устойчивы; у морских свинок конъюнктивит, а в ряде случаев абортивный кератит при введении патогенных иерсиний серовара 09 в конъюнктивальную полость. При этом штаммы серовара 03 патологической реакции не вызвали.

Лучшими способами заражения являются внутрибрюшное и подкожное введение бактерий. При этих способах аппликации иер-

синий в разных опытах и для различных сероваров (03; 08; 09; 06,30) ЛД<sub>50</sub> возбудителя составляли от  $1,5 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^8$  микробных клеток.

При пероральном заражении мышей инфекционный процесс удавалось воспроизвести только при искусственном подавлении иммунитета (бестимусные животные, обработка иммунодепрессантами) либо на мышах-гнотобиотах.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что патогенность *Y. enterocolitica* для лабораторных животных изучена еще недостаточно. Дополнительную сложность в изучении данного вопроса вызывает циркуляция в природе патогенных иерсиний с различной степенью вирулентности для животных, включая и лабораторных. Вследствие этого нередко при заражении патогенными иерсиниями лабораторных животных их гибели не наблюдается, поэтому биопроба для проверки патогенности *Y. enterocolitica* не рекомендуется.

Выше упоминалось о том, что патогенность у *Y. enterocolitica* детерминируется плазмидой и сопровождается наличием у таких штаммов ряда культуральных особенностей, которые предложено использовать в качестве маркеров вирулентности.

**Определение способности к аутоагглютинации.** Феномен аутоагглютинации проявляется при культивировании в жидкой питательной среде и заключается в спонтанном склеивании клеток иерсиний. Для проверки данной способности в две пробирки со средой Кларка засевают чистую культуру испытуемого штамма *Y. enterocolitica*, полученную на МПА. Посевной материал вносят в количестве  $10^6$ - $10^8$  микробных клеток в объеме 1 см<sup>3</sup>. Одну из пробирок инкубируют при температуре 37° С, вторую — при 25° С в течение 24-48 часов.

Патогенные иерсинии при температуре культивирования 37° С образуют обильный хлопьевидный осадок, а при 25° С — равномерное помутнение, при этом возможен небольшой, компактный осадок.

Непатогенные бактерии в обеих пробирках дают рост в виде равномерного помутнения при отсутствии хлопьев.

При длительном лабораторном хранении штаммов с частыми пересевами и культивированием при 37° С часть изначально патогенных клеток, составляющих популяцию изучаемого штамма, может утрачивать плазмиду, отвечающую за вирулентность. При наличии в популяции 30-70% таких бесплазмидных клеток результа-

ты теста становятся нечеткими. В таких случаях его повторяют после предварительного клонирования с целью выделения плазмидо-содержащих клонов. Данную операцию можно осуществить при определении кальцийзависимости роста изучаемого штамма, что также относится к одному из маркеров вирулентности у данного вида бактерий.

**Определение кальцийзависимости роста.** Данный тест основан на том, что у патогенных иерсинии при культивировании их на кальцийдефицитной агаровой среде при температуре 37° С проявляется ограничение роста. Это выражается образованием колоний значительно меньшего диаметра, чем при культивировании на обычных питательных средах или при дефиците ионов Са ++, но при температуре 25° С.

Для определения кальцийзависимости готовят специальную кальцийдефицитную среду на основе коммерческого агара АГВ. На поверхность этой среды в двух чашках Петри засевают культуру испытуемого штамма, выращенную в среде Кларка при 25° С. Посев ведут с тем расчетом, чтобы получить рост изолированных колоний (от 100 до 500 клеток на стандартную чашку Петри). Одну чашку инкубируют при 37° С, вторую — при 25° С в течение 48 часов, после чего учитывают результаты теста.

Патогенные иерсинии при 37° С вырастают в виде колоний значительно меньшего диаметра, чем на чашке, инкубированной при 25° С. Иногда рост может отсутствовать вовсе. Дополнительное инкубирование такой чашки при 25° С в течение 24-48 часов ведет к образованию колоний обычного размера.

Непатогенные иерсинии при обеих температурах образуют колонии обычной величины (через 24 часа диаметром 1,0-1,5 мм, через 48 часов — до 1,5-2,0 мм).

При наличии в популяции патогенных иерсинии клеток, утративших плазмиду, детерминирующую факторы патогенности, рост при 37° С отмечают в виде различного соотношения крупных и мелких колоний.

**Определение температурозависимой морфологии колоний.** Морфологию колоний иерсинии изучают после их 24-48-часового инкубирования при 25° С и 37° С на агаре АГВ в чашках Петри.

Учет результатов осуществляют невооруженным глазом или с помощью лупы. Диаметр колоний измеряют окуляр-микрометром.

При 37° С патогенные иерсинии образуют малопрозрачные, желтоватого цвета, зернистые, выпуклые колонии, диаметр которых, как правило, не превышает 1,0 мм.

При 25° С колонии патогенных штаммов сходны по морфологии и размерам с колониями, образуемыми непатогенными иерсиниями при обеих температурах инкубирования. Они более прозрачны, голубоватого цвета, плоские, маслянистой консистенции, имеют диаметр в 1,5- 3 раза больший, чем у патогенных иерсинии, вырастающих при 37° С.

**Определение пиразинамидазной активности.** Тест основан на способности непатогенных *Y. enterocolitica* продуцировать пиразинамидазу и отсутствии такой способности у патогенных штаммов.

Для выполнения теста готовят специальную плотную питательную среду с пиразинкарбоксамидом. В пробирку со скошенной питательной средой высевают культуру испытуемого штамма и инкубируют посева в течение 48 часов при 25-30° С. По окончании инкубирования на поверхность среды с выросшими колониями наносят 1%-ный водный свежеприготовленный раствор железистого сульфата аммония. Учет результатов теста проводят через 15 минут.

Колонии непатогенных иерсинии, продуцирующих пиразинамидазу, приобретают розовую окраску, патогенных — не изменяют своего цвета.

**Серологическая идентификация вирулентных иерсинии в реакции агглютинации на стекле (РА-СВИ).** Вирулентные иерсинии выявляют с помощью диагностической сыворотки к вирулентным иерсиниям (СВИ) в РА на стекле.

Комплект для РА с сывороткой диагностической к вирулентным иерсиниям (СВИ) содержит СВИ с рабочим разведением 1:10 и 10 %-ную нормальную кроличью сыворотку («К-» для контроля специфичности).

Для постановки реакции на обезжиренное предметное стекло наносят 1 каплю СВИ и 1 каплю «К-». В обе капли добавляют по одной петле культуры испытуемого штамма, выращенной на МПА при 25-37° С, и растирают биомассу до образования гомогенной суспензии. Затем стекло осторожно покачивают, наблюдая за результатом реакции.

Положительная РА вирулентных иерсиний с СВИ характеризуется появлением крошек агглютината в течение 3 минут. Агглюти-

нат лучше заметен на темном фоне при косом освещении. В суспензии с нормальной сывороткой («К-») агглютинат образовываться не должен.

При отрицательной реакции в обеих каплях сохраняется равномерная, гомогенная суспензия бактерий.

### **Серологическая диагностика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза**

**Реакция агглютинации.** Для постановки РА используют стандартные иерсиниозные антигены, представляющие собой суспензию инактивированных формалином культур эталонных штаммов *Y. enterocolitica* сероваров 03; 04,32; 04,33; 05; 05,27; 06,30; 07,8; 09 и *Y. pseudotuberculosis* сероваров I и III концентрацией 10 млрд. микробных клеток в 1 см<sup>3</sup>. Перед постановкой реакции, которую осуществляют методом равных объемов, антигены разводят до рабочей концентрации 1 млрд/см<sup>3</sup> (1:10).

При кишечном иерсиниозе характер гуморального иммунного ответа в значительной степени зависит от тяжести и клинического проявления болезни. Высокие титры антител обнаруживаются при тяжелом поражении суставов и септической форме инфекции. При легком течении, особенно при гастроэнтероколитах, антитела выявляют в более низких титрах, однако и в этом случае их уровень часто достигает диагностических величин. Выше упоминалось о наличии у иерсиний общих внутриродовых антигенов и антигенов, обуславливающих перекрестные реакции с рядом энтеробактерий других родов, бруцеллами. Однако на пике инфекционного процесса уровень видосеровароспецифических антител, как правило, значительно превышает уровень гетерологичных антител. Этим обусловлен минимальный диагностический титр в РА, равный 1:160-1:200. Лучше использовать метод парных сывороток крови, при котором достоверным считается 2-4-кратное и более нарастание титров антител. Антитела к *Y. enterocolitica* начинают выявляться со 2-й недели болезни.

К антигенам антитела в крови появляются уже к концу первой недели болезни, а существенное увеличение титров (1:200 и более) отмечают к началу 3-й недели. Этими сроками определяется необходимость использования, как и при кишечном иерсиниозе, метода парных сывороток при постановке РА. Через 2 месяца наблюдается снижение концентрации антител, и к 6 месяцам их титры обычно не превышают значений 1:50-1:100.

**Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).** В последнее время для серодиагностики иерсиниозов все шире применяется РНГА, как тест более чувствительный в сравнении с РА. С этой целью разработаны моновалентные антигенные эритроцитарные диагностикумы к *Y.enterocolitica* сероваров 03; 05; 07,8; 06,30; 09 и *Y.pseudotuberculosis* сероваров I и III, двухвалентный диагностикум к сероварам 03 и 09, а также поливалентный диагностикум дополнительно содержащий псевдотуберкулезный антиген.

РНГА применяют со 2-3-й недели болезни, используя метод парных сывороток. Диагностический титр — разведение сыворотки 1:100 и более.

РНГА с использованием антительных эритроцитарных диагностикумов используется для обнаружения иерсиниозных антигенов в патологическом материале и в объектах внешней среды. Исследуемый материал при этом перед исследованием подращивают 3-5 суток, инактивируют при 56° С и берут для исследования надосадочную жидкость.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Для дифференциации специфического иммунного ответа, возникающего в острый период иерсиниоза и псевдотуберкулеза, от неспецифических антител используют иммуноферментное определение количественного содержания IgM и IgG.

В острый период данных заболеваний в сыворотке крови преобладают IgM, которые замещаются IgG к концу первого месяца от начала инфекционного процесса. Поэтому обнаружение специфических IgM при однократном исследовании проб крови может с большой долей вероятности подтвердить клинический диагноз.

Используется твердофазный ИФА в пластинах и ДОТ-ИФА.

В первом случае реакцию учитывают визуально по изменению окраски содержимого лунки планшета либо спектрофотометрически по оптической плотности продукта реакции, которая у положительных образцов должна превышать в 2-3 раза таковую в контрольных пробах.

ДОТ-ИФА проводят на нитроцеллюлозных мембранах. Данный вариант анализа не уступает по чувствительности твердофазному, но проще его в техническом исполнении. При этом используются микроколичества антигена, а результаты оцениваются визуально. Положительным результатом считается появление коричне-



вых точек па фильтрах с исследуемыми образцами при отсутствии окрашивания в контроле.

Чувствительность ИФА превышает чувствительность РА и РНГА в 10 раз. Антитела при псевдотуберкулезе выявляются начиная с 3-й недели болезни. Диагностический титр 1:256 и более.

Наибольшие трудности представляет дифференциация иерсиниоза, обусловленного сероваром 09, от бруцеллеза. Это связано с выраженным антигенным родством их возбудителей. В таких случаях, помимо постановки серологических реакций Райта, Хеддельсона, Роз-Бенгал на бруцеллез, перспективно применение метода дифференциации иерсиниоза и бруцеллеза по классам иммуноглобулинов (М и G) в ИФА. При этом в качестве специфического антигена используют убитую ацетоном культуру *Br.abortus*. Стандартный антиген представляет собой взвесь убитых ацетоном бруцелл концентрацией 10 млрд./мл. Перед постановкой реакции антиген разводят 1:10 (рабочая концентрация 1 млрд./мл) 0,9%-ным раствором натрия хлорида.

Методика приготовления компонентов реакции, техника постановки и учета ИФА изложены в инструкции по применению пероксидазных конъюгатов к иммуноглобулинам М и G, выпускаемым ТОО «Полигност» (Санкт-Петербург).

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

### Список использованной литературы

1. Антонов Б.И, Борисова В.В, Волкова П.М. и др. Лабораторные исследования в ветеринарии. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1986.
2. Бакулов И.А., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. Особо опасные болезни животных. Покров.: ВНИИВВиМ, 1998.
3. Ветеринарная микробиология иммунология: Учебник /Под ред. проф. Н. А. Радчука. - М. Агропромиздат 1991.
4. Костенко Т.С., Скаршевская Е.И., Гительсон С.С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. Агропромиздат 1989.

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

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко,  
Г.А. Джаилиди, Зеркалев Д.Ю., Е.А. Горпинченко, А.В. Скориков  
Учебное пособие «Диагностика иерсиниозов животных».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13