

**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**

**ДИАГНОСТИКА КЛОСТРИДИОЗОВ
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**

**ДИАГНОСТИКА КЛОСТРИДИОЗОВ
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, Е.А. Горпинченко
Учебное пособие «Диагностика клостридиозов животных».
Краснодар: КубГАУ, 2013. 36 с.

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

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 клостридиозов

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

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

В род *Clostridium* относят палочковидные микроорганизмы (0,3-0,2x1,5-20,0), плеоморфные, в молодых культурах окрашиваются по методу Грама положительно, подвижные, образуют овальные или сферические споры, каталазоотрицательные, облигатные анаэробы.

Патогенные клостридии подразделяют на нейротоксические (*C. botulinum*, *C. teteni*), гистотоксигенные (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. colinum*) и энтеротоксемические (*C. perfringens*).

Таблица 1 – Патогенные клостридии

Вид клостридий	Вызываемая патология
<i>C. perfringens</i> тип А	Пищевые отравления у человека и животных; газовый отек у человека и животных; некротизирующий мастит КРС; энтерит собак, некротизирующий энтерит кур.
<i>C. perfringens</i> тип В	Дизентерия ягнят, жеребят; энтеротоксемия молодняка различных видов животных.
<i>C. perfringens</i> тип С	Геморрагическая энтеротоксемия овец, поросят. Телят, жеребят; некротический энтерит цыплят.
<i>C. perfringens</i> тип D	Энтеротоксемия овец («мягкая почка»), коз, телят.
<i>C. perfringens</i> тип E	Энтеротоксемия овец и телят.
<i>C. chauvoei</i>	Эмфизематозный карбункул КРС, реже буйволов, овец и коз.
<i>C. septicum</i>	Злокачественный отек КРС, овец, свиней; бразот овец.
<i>C. novyi</i> тип А	Злокачественный отек КРС, овец.
<i>C. novyi</i> тип В	Некротический гепатит овец.
<i>C. novyi</i> тип С	Хронический остеомиелит буйволов.
<i>C. novyi</i> тип D	Бациллярная гемоглобинурия КРС.

<i>(C. haemolyticum)</i>	
<i>C. sordellii</i>	Газовая гангрена КРС, овец, лошадей.
<i>C. colinum</i>	Язвенный энтерит молодняка птицы (цыплята, индюшата).
<i>C. teteni</i>	Столбняк животных, человека.
<i>C. botulinum</i> (типы А- F)	Ботулизм животных, человека.
<i>C. botulinum</i> тип G <i>(C. argentinense)</i>	Ботулизм человека.

Лабораторная диагностика инфекционной энтеротоксемии животных

Инфекционная энтеротоксемия - остропротекающая инфекционная болезнь овец, ягнят, телят, поросят, пушных зверей, птицы, характеризующаяся тяжелой интоксикацией. Возбудитель - *C. perfringens*, продуцирующий токсины типов В, С, D реже А и Е.

Лабораторная диагностика основана на обнаружении токсина в содержимом кишечника, выделении культуры возбудителя и определении токсигенных свойств.

Бактериологическое исследование. Для исследования в лабораторию направляют труп животного целиком или наиболее пораженные отрезки тонкого отдела кишечника (с содержимым), перевязанные с обоих концов, а также часть печени, селезенку и почку, экссудат брюшной полости, отечной подкожной клетчатки, трубчатую кость, мезентериальные лимфоузлы. Патматериал берут не позже 3-4 часов после гибели животного. От больного животного для исследования направляют фекалии (150-200г).

Микроскопическое исследование исходного материала. Из мукозы кишечника, органов готовят мазки, окрашивают по Граму. При микроскопии в положительных случаях находят крупные, короткие (0,6- 0,8х 1,2-4 мкм) со слегка закругленными концами, грамположительные, палочковидные клетки, имеющие капсулу. Необходимо принимать во внимание наличие *C. perfringens* в кишечнике клинически здоровых животных.

Обнаружение токсина в исследуемом материале. Объектом исследования является содержимое тонкого отдела кишечника. Ре-

зультат исследования зависит от времени исследования после смерти животного, так как токсины возбудителя лабильны. В идеале исследование должно быть начато в пределах 30 минут после взятия материала и, во всяком случае, не позднее 3-4 часов. Токсические субстанции *C. perfringens* представлены в таблице 85. Содержимое кишечника суспендируют в равном объеме стерильного физиологического раствора, встряхивают, центрифугируют для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость можно обрабатывать пенициллином и стрептомицином для подавления микрофлоры. Надосадочную жидкость целесообразно стерилизовать фильтрацией через мембранные фильтры. Наличие муцина затрудняет фильтрацию. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии животных и анаэробной дизентерии ягнят» содержимое кишечника после разведения физиологическим раствором рекомендуется выдерживать при 20-22°C 1 час, фильтровать через ватно-марлевый фильтр и центрифугировать при 3-5 тыс. об/мин в течение 20 минут.

Обнаружение токсинов. Фильтрат в объеме 0,4 мл вводят внутривенно двум мышам. У мышей в положительном случае в течение пяти минут возможно развитие шока, летальный исход в течение 10 часов. Согласно «Методическим указаниям...» в лабораториях РФ наличие токсина рекомендуется выявлять введением 0,5 мл фильтрата внутривенно или внутрибрюшинно двум белым мышам массой 16-18г или 1,0-1,5 мл кролику массой 1,8-2,0 кг с наблюдением за животными в течение 12 часов. При более поздней гибели, особенно если материал не подвергали стерилизации, необходимо бактериологически исследовать трупы животных, чтобы исключить сопутствующую инфекцию. Экспресс-индикацию токсина в фекалиях проводят в ИФА РНГА, латекс-агглютинацию, но в РФ чаще используют РН.

Токсические субстанции (α , β , ϵ , i) *C. perfringens* различных типов (A, B, C, D, E)

Тип <i>C. perfringens</i>	A	B	C	D	E
Наличие токсина	α	α, β, ϵ	α, β	$\alpha \epsilon$	α, i

<p>α -токсин (альфа-токсин)</p> <p>(β -токсин (бета-токсин)</p> <p>ϵ -токсин (эпсилон-токсин)</p> <p>i -токсин (йота-токсин)</p>	<p>- лецитиназа (фосфолипаза), разрушает мембрану клеток, вызывает на кровяном агаре зону неполного гемолиза</p> <p>- обладает летальным и некротизирующим действием, легко разрушается</p> <p>- выделяется как протоксин, активизируется в кишечнике под влиянием протеаз</p> <p>- выделяется как протоксин, активизируется трипсином, обладает летальным и некротизирующим действием</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Идентификация токсинов *C. perfringens*. После обнаружения токсина его идентифицируют в реакции нейтрализации во внутрикожном тесте на морских свинках альбиносах или внутривенном (внутрибрюшинном) на белых мышах. Тест на мышах считается менее информативным, так как его результаты более подвержены неспецифическим воздействиям.

Внутрикожный тест на морских свинках. Смешивают 0,5 мл токсического материала с 0,2 мл питательного бульона и 0,1 мл антитоксической сыворотки. Общий объем должен составлять 0,8 мл. Если смешивают более чем одну сыворотку, то уменьшают количество бульона при сохранении общего объема смеси 0,8 мл. Аналогичные смеси готовят с трипсинизированным фильтратом: в фильтрат добавляют 1% трипсина (Дифко 1:250) и выдерживают один час при 37° С. Трипсин активирует эпсилон-протоксин и разрушает бета-токсин. Смесь инъецируют внутрикожно морским свинкам в объеме 0,2 мл. Реакцию учитывают через 24 и 48 часов.

Тест нейтрализации на мышах. Смеси готовят так же, как для теста на морских свинках, и инъецируют двум мышам. Результат учитывают в течение трех дней. О наличии или отсутствии токсина судят по смерти или выживанию животных. При наличии токсина в достаточном количестве смерть обычно наступает в течение 10 часов. Схема постановки реакции нейтрализации представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Схема постановки реакции нейтрализации на морских свинках

Смеси фильтрата и антитоксических сывороток сывороток		Тип токсина				
		A	B	C	D	E
Необработанный фильтрат	Бульон	+	+	+	±	+
	Сыворотка типа А (анти-альфа)	-	+	+	(-)*±	±
	Сыворотка типа А + С (антиальфа и анти-бета)	-	(-)*±	-	(-)*±	±
Трипсинизированный фильтрат	Сыворотка типа А + С + D (анти-альфа, анти-бета, анти-эпсилон)	-	-	-	-	±
	Бульон	±	+	(-)±	+	+
	Сыворотки типа А (анти-альфа)	-	+	(+)±	+	+
	Сыворотки типа А + D (анти-альфа, анти-эпсилон)	-	(-)±	(-)±	-	+
	Сыворотки типа А + С + D (анти-альфа, анти-бета, анти-эпсилон).	-	-	-	-	+
	Сыворотка типа А + E (анти-альфа, анти-йота). Обычно не ставят из-за редкого присутствия йота-токсина	-	+	(-)±	+	-
Идентифицируемый токсин		α	β+	β	ε	i

(-) * — почти всегда отрицательная, так как эпсилон-токсин находится в форме протоксина.

(-) — почти всегда отрицательная, так как бета-токсин разрушается трипсином.

Таблица 3 - Схема теста нейтрализации на мышах

Испытуемая жидкость (мл)	Типовая антисыворотка (мл)	Объем смеси, вводимый мышам (мл)	Количество мышей
0,9	0,3 А	0,4	2
0,9	0,3 В	0,4	2
0,9	0,3 С	0,4	2
0,9	0,3 D	0,4	2
0,9	0,3 E	0,4	2
0,9	Нет	0,4	2

Интерпретация результатов, полученных в течение трех дней:

1. Антитоксин А нейтрализует только гемологический токсин.
2. Антитоксин В нейтрализует токсины А, В, С и D.
3. Антитоксин С нейтрализует токсины А и С.
4. Антитоксин D нейтрализует токсины А и D.
5. Антитоксин E нейтрализует токсины А и E. Эти данные представлены в таблице 56.

Таблица 4 - Идентификация токсинов *C. perfringens* в реакции нейтрализации

Антитоксическая сыворотка	Тип токсина				
	А (альфа)	В (альфа, бета, эпсилон)	С (альфа, бета)	Д (альфа, эпсилон)	Е (альфа, йота)
А антиальфа	-	+	+	+	+
В антиальфа, -бета, -эпсилон	-	-	-	-	+
С антиальфа, -бета	-	+	-	+	+
Д антиальфа, -эпсилон	-	+	+	-	+
Е антиальфа, -йота	-	+	+	+	-

+ гибель; - гибель отсутствует

В соответствии с «Методическими указаниями...» в лабораториях РФ реакцию нейтрализации рекомендуется проводить путем смешивания в отдельных пробирках 1 мл антитоксических сывороток (А, С, D, Е), содержащих в 1 мл 10АЕ и 1 мл фильтрата. В пятой пробирке смешивают фильтрат и физиологический раствор. Компоненты инкубируют 30 минут при 37° С и по 0,5 мл смеси вводят двум белым мышам внутривенно (внутрибрюшинно) или морским свинкам (кроликам) по 0,2 мл внутрикожно. Результат учитывают в течение двух суток при гибели контрольных мышей или образовании некроза у контрольных животных и интерпретируют по схеме.

Таблица 5 - Определение типа токсина *C. perfringens* в реакции нейтрализации

Тип <i>C. perfringens</i>	Токсин в исследуемом материале	Антитоксическая сыворотка				Контроль
		А	С	Д	Е	
А	альфа	-	х	х	х	+
В, С, F	бета	+	-	+	+	+
Д	эпсилон	+	+	-	+	+
Е	йота	+	+	+	-	+

Примечание к таблице 5

- (+) — мыши пали, у морских свинок и кроликов некроз на месте введения ;
- (-) — мыши живы, у морских свинок и кроликов некроз отсутствует;
- (х) — результат не учитывается

Выделение культуры *C. perfringens*, определение ее токсигенных свойств. *C. perfringens* является относительно аэротолерантным видом анаэробных клостридий. Температурный оптимум для типов А и D составляет 45° С, В и С — 37-45° С.

Согласно «Методическим указаниям...» в лабораториях РФ рекомендуется посев из содержимого кишечника и паренхиматозных органов делать на среду Кита-Тароцци с подавлением роста сопутствующей микрофлоры следующими способами. Применяют метод частых пересевов выросшей культуры с интервалом 2-3 часа на свежую среду Кита-Тароцци или засеянные пробирки прогревают при 65° С в течение 10 минут и затем культивируют 18 часов при 38° С. Рост *C. perfringens* в среде Кита-Тароцци — быстрый (3-8 часов), характеризуется помутнением, бурным газообразованием, образованием гомогенного или слизистого осадка. Из выросших культур делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. Клетки *C. perfringens* в мазках из культуры выглядят как короткие, толстые, грамположительные палочки с обрубленными концами, жгутиков не имеют. В старых культурах клетки образуют центральные или субтерминальные споры. При незначительной контаминации культуры посторонней микрофлорой производят дробный высев на глюкозо-кровяной агар Цейсслера. Посевы инкубируют при 37-38° С в течение суток. *C. perfringens* на кровяном агаре формирует колонии трех типов диаметром 2-5 мм: S — гладкие, М — слизистые, R — махровые. Гладкие колонии первоначально напоминают капельки росы, затем прозрачность исчезает, колонии приобретают белую или сероватую окраску. Форма круглая, рельеф выпуклый, поверхность блестящая, гладкая, края ровные. М-колонии формируют капсулообразующие клетки, они сходны с

S-колониями, но имеют слизистую консистенцию. Шероховатые колонии — неправильной формы, края фестончатые. По мере пребывания на воздухе колонии всех типов приобретают зеленоватый оттенок, что является характерным признаком. Колонии окружены зоной гемолиза, полного или частичного. Зона гемолиза может быть двойной: вокруг колоний полный гемолиз (действие гемолизина), на отдалении — неполный (действие лецитиназы). Среда в процессе роста *C. perfringens* становится буро-коричневой.

Из типичных колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении характерных для *C. perfringens* по морфологии и тинкториальным свойствам клеток культуру от-

вивают на среду Кита-Тароцци, выращивают 8-16 часов при 37-38° С и определяют в биопробе на мышах наличие токсина (методику см. выше).

Если предполагается наличие *C. perfringens* типов E и D, токсин перед постановкой опыта на животных переводят из состояния протоксина в токсин. Предварительно культуру подщелачивают до pH 8,0-8,2, вносят 0,25% трипсина или 0,5% панкреатина и выдерживают, встряхивая, 2 часа при 37-38° С. При наличии токсина типа С токсичность снижается, В — сохраняется, D и E — увеличивается. Тип токсина устанавливают в реакции нейтрализации, как указано выше. В настоящее время фирма Techlab Inc. выпускает диагностический набор для иммуноферментного выявления токсинов возбудителя в содержимом кишечника. Перспективно применение для идентификации токсичных штаммов *C. perfringens* ПЦР-диагностики.

С целью идентификации выделенных культур на видовом уровне изучают их ферментативные свойства. Для *C. perfringens* характерно наличие лецитиназы, желатиназы, казеиназы, способности расщеплять с образованием кислоты глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, свертывать молоко за 8-10 часов, при этом образуются прозрачная сыворотка и рыхлый сгусток казеина. Принимают во внимание, что штаммы типа А расщепляют инулин, но инертны по отношению к глицерину, типа Д утилизируют глицерин, но не инулин, типы В и С не разлагают оба эти углевода. Также используют тест-системы API 20А, Anacrotest 23 и др. *C. perfringens* — единственный вид клостридий, образующий капсулу, жгутиков не имеет.

Характер патологоанатомических изменений у морских свинок, зараженных подкожно, описан в разделе «Злокачественный отек».

Лабораторная диагностика браздота овец

Браздот — остропротекающая неконтагиозная болезнь овец, характеризующаяся геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычуга, двенадцатиперстной кишки, перерождением паренхиматозных органов, сильным образованием газов в желудке и кишечнике. Возбудителями являются *C. septicum*, *C. novyi* типа В, нередко выделяют *C. sordellii* и *C. perfringens*. В Западной Европе и

США как самостоятельные нозологические единицы выделяют северный браздот (Nordic Bradsot), вызываемый *C. septicum*, который характеризуется геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычуга; инфекционный некротический гепатит овец, крупного рогатого скота, свиней (германский браздот), вызываемый *C. novyi* типа В. Кроме того, *C. novyi* типа D рассматривают как причину бациллярной гемоглобинурии крупного рогатого скота в Америке и Австралии, *C. novyi* типа С — как возбудитель остеомиелита буйволов, а *C. novyi* типа А возбудитель газовой гангрены.

Лабораторная диагностика браздота овец основана на выделении и идентификации культур возбудителей (*C. septicum*, *C. novyi*).

Бактериологическое исследование. Для исследования в лабораторию направляют паренхиматозные органы, измененные участки стенки сычуга, отечную ткань, трубчатую кость, экссудат грудной и брюшной полостей, инфильтрат подкожной клетчатки, участок двенадцатиперстной кишки, перевязанный лигатурами. Материал берут только от свежих трупов.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из материала готовят мазки, окрашивают по Граму и Муромцеву. Клетки *C. novyi* видны в препарате как крупные грамположительные палочки (0,8-1,0x3-10 мкм) с закругленными концами, располагающиеся одиночно, парами, иногда в виде коротких цепочек. Клетки *C. septicum* имеют форму грамположительных палочек размером 0,6-0,8x3-8 мкм, характерным признаком считается наличие нитевидных форм в мазках-отпечатках с серозных покровов. Споры у перечисленных возбудителей овальные субтерминальные или центральные.

Выделение и идентификация возбудителей браздота

Культивирование. *C. septicum* и *C. novyi* — строгие анаэробы, очень чувствительны к кислороду, оптимум рН — 7,6-7,8, температуры — 37-38° С.

Посевы производят из отечной подкожной клетчатки, подслизистой сычуга, паренхиматозных органов, экссудата грудной и брюшной полостей в среду Кита-Тароцци, глюкозо-кровоной агар в чашках Петри.

Учитывая, что возбудители строгие анаэробы, целесообразно, по возможности, применять среды, содержащие цистеин, натрия тиогликолят для создания оптимального окислительно-восстановительного потенциала сред. Чашки с посевами инкубируют в анаэроостате. Время инкубирования 24-48 часов.

Характер роста возбудителей на питательных средах. Рост *C.septicum* на среде Кита-Тароцци характеризуется интенсивным равномерным помутнением и образованием газа. На глюкозо-кровяном агаре возбудитель образует кружевные сплетения в виде «нитей-арабесок» с зоной гемолиза. В агаре столбиком (1%-ный) формирует колонии диаметром 1-2 мм с уплотненным центром и радиально отходящими нитевидными перепутанными отростками. В глубине более плотного агара (2%-ный) колонии чечевицеобразной формы, иногда с отростками, коричневато-желтоватого цвета. При росте в мозговой среде образует газ.

C. novyi в жидкой питательной среде растет с ее помутнением, образованием однородного или хлопьевидного осадка, газообразование слабое. *C. novyi* тип В (*C. gigas*) на глюкозо-кровяном агаре формирует плоские, шероховатые колонии с неправильными бахромчатыми краями и отростками, образующими на периферии параллельные петли. Внутренняя структура колоний обычно неоднородна (мозаичность, кристаллы). Колонии *C. novyi* типов А, В, С нередко проявляют тенденцию к образованию дочерних колоний. Колонии окружены зоной гемолиза. Колонии *C. novyi* типа D чаще мелкие, рассыпчатые. В агаре высоким столбиком с глюкозой колонии *C. novyi* напоминают кусочки ваты с уплотненным, более темным (коричневатым, желтоватым) центром или имеют форму линзы.

Морфология клеток возбудителей в культуре. В мазках из культуры клетки *C. novyi* крупные, грамположительные прямые или слегка изогнутые палочки (0,6-1,4x2-17 мкм) с закругленными или обрубленными концами, перитрихи, клетки располагаются единично или парами. Споры овальные, центральные или субтерминальные, лучше образуются на средах, бедных утилизируемыми углеводами и другими питательными веществами. В старых культурах клетки возбудителя окрашиваются грамотрицательно.

C. septicum — полиморфная, грамположительная палочковидная бактерия размером 0,6-0,8x2-35 мкм, располагается единично или парами. В старых культурах окрашивается грамотрицательно.

но, капсулу необразует, перетрих, споры центральные или субтерминальные.

Идентификация *C. novyi* и *C. septicum* по ферментативным свойствам. При обнаружении в посевах бактерий с типичными для *C. novyi* и *C. septicum* культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами их отвивают для получения чистых культур и определяют наличие лецитиназы, липазы, желатиназы, казеиназы, индола, способность расщеплять глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу (табл. 6). Используют для идентификации тест-системы (см. выше).

Таблица 6 - Ферментативные свойства *C. septicum* и *C. novyi*

Вид клостридий	Признаки								
	Лецитиназа	Липаза	Желатиназа	Казеиназа	Индол	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза
<i>C. septicum</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>C. novyi</i> тип А	+	+	+	-	-	+	-	-	+
тип В	+	-	+	+	V	+	-	-	+
тип С	-	-	+	-	+	+	-	-	н.д.
тип D (<i>C. haemolyticum</i>)	+	-	+	+	+	+	-	-	-

V — варьирующий признак; нд — нет данных.

Дополнительными характеристиками *C. novyi* являются токсигенные свойства. *C. novyi* типов А и В синтезируют токсин «альфа», который обладает летальным и некротизирующим действием. *C. novyi* типов В и D (*C. haemolyticum*) продуцируют бета-токсин, причем тип D в большем количестве, а тип В — в меньшем. *C. novyi* типа С указанные токсины не образует. В реакции нейтрализации *C. novyi* типов А и В за счет общего альфа-токсина неразличимы. В рутинной диагностической практике реакцию нейтрализации не используют.

Биопроба. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике браздота овец» биопробу проводят одновременно с посевом исследуемого материала на питательные среды для выделения культуры возбудителя или проверки вирулентности выделенной культуры. Для заражения используют морских свинок массой 300-400 г. Патологический материал измель-

чают в стерильной ступке в МПБ. Двум морским свинкам вводят подкожно в область брюшных мышц 0,5-1,0 мл тканевой суспензии или культуры. При наличии возбудителей в материале животные погибают через 16-48 часов. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 8 суток.

При наличии в исследуемом материале *C. septicum* у павших морских свинок на месте инъекции обнаруживают следующие изменения: кожа легко отделяется от мышц, мышцы влажные, светло-красного цвета, в подкожной клетчатке пузырьки газа, кишечник вздут, в сердечной сорочке и грудной полости значительный объем транссудата. Заражение морских свинок *C. novyi* дает следующие патологоанатомические изменения: на месте инъекции студенистый отек соединительной ткани, мышцы бледные. *C. sordellii* вызывает сходную картину изменений.

Павших животных подвергают бактериологическому исследованию. Обязательно делают мазки-отпечатки с серозных покровов печени. Клетки *C. septicum* в таких препаратах имеют форму длинных нитей.

Лабораторная диагностика клостридиоза птиц

C. colinum вызывает у цыплят, индюшат язвенный энтерит, поражения почки, селезенки.

Лабораторная диагностика основана на выделении и идентификации культуры возбудителя.

Бактериологическое исследование. В качестве материала берут сегменты кишечника с изъязвлениями, пораженные участки печени, селезенки, в которых наблюдают диффузные некротические очаги.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму. Клетки *C. colinum* грамположительные, палочковидные (1х3-4 мкм). Споры овальные, субтерминальные, но образуются редко.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Возбудитель клостридиоза птиц *C. colinum* анаэроб, его первичная изоляция из исследуемого материала представляет трудности. Посев материала производят в глюкозный бульон с 8% цит-

ратной овечьей плазмы, тиогликолатный бульон с 8-10% сыворотки крови овцы, заражают 5-8-дневные куриные эмбрионы. На этих средах возбудитель необходимо пассажировать несколько раз, прежде чем производить высев на глюкозо-кровоной агар. Контаминированный материал высевают на среды с добавлением 25 мг/см³ полимиксина В. У выделенных культур *C. colinum* исследуют ферментативные характеристики.

Для вида характерно отсутствие лецитиназы, липазы, желатиназы, казеиназы, образование индола, кислоты из глюкозы, сахарозы, мальтозы, но не лактозы.

Лабораторная диагностика эмфизематозого карбункула

Эмфизематозный карбункул — остропротекающая неконтагиозная инфекционная болезнь крупного и мелкого рогатого скота, характеризующаяся появлением в мускулатуре крепитирующих отеков.

Возбудитель — *C. chauvoei*. Лабораторная диагностика основана на результатах бактериологического исследования.

Бактериологическое исследование

Для исследования из пораженных участков стерильным инструментом вырезают кусочки ткани 3х3х3 см³, при вскрытии трупа также берут кусочки печени, селезенки, кровь сердца. Материал должен быть взят не позднее 4 часов после гибели животного. В теплое время года материал консервируют 30%-ным раствором глицерина.

Микроскопическое исследование исходного материала. Готовят мазки-отпечатки, окрашивают по Граму, Муромцеву. В окрашенных препаратах возбудитель виден как грамположительные палочковидные бактерии размером 0,5-1,6х1,5-9,6 мкм, с закругленными концами, тенденцией к полиморфизму (грушевидные, веретенообразные, шаровидные формы), с центральными и субтерминальными спорами. Иногда возбудитель образует цепочки из 3-5 клеток, но, в отличие от *C. septicum*, в мазках с серозных оболочек не имеет форму нитей.

Выделение и идентификация культуры возбудителя

Культивирование. *S. chauvoei* — строгий анаэроб, требует разрежения до 5-10 мм ртутного столба. Температурный оптимум 36-38° С. Посев на питательные среды производят предварительно профламбированными кусочками тканей, жидкий материал высевают пастеровскими пипетками. В качестве питательных сред используют среду Кита-Тароцци, кровяной агар (кровь овцы) с печеночным экстрактом глюкозо-кровоной агар Цейсслера. Для получения изолированных колоний посев материала желателно производить на 3-4 чашки Петри.

Параллельно производят посевы на МПА и МПБ, для исключения аэробной микрофлоры. Несвежий материал целесообразно растереть в ступке со стерильным физиологическим раствором (1:4), прогреть при 80° С в течение 15-20 минут и затем посеять на питательные среды. Рекомендуется также посев на МППБ с 0,5% карболовой кислоты. После инкубирования и выявления спорных клеток в окрашенных препаратах со дна пробирки пастеровской пипеткой отбирают 3-5 мл среды, прогревают до 60° С в течение 30 минут и засевают на плотные среды.

При использовании метода посева в глубину сывороточного агара исходный материал (0,5 мл) засевают в пробирку с расплавленным и остуженным агаром, затем этой же пипеткой производят последовательный перенос материала из этой пробирки еще в четыре пробирки с агаровой средой. Содержимое 4 и 5 пробирок переливают в трубки Виньял-Вейона. Выросшие колонии отвивают на среду Кита-Тароцци и глюкозо-кровоной агар. Посевы в чашках инкубируют в строго анаэробных условиях в анаэроостатах, лучше с 10% CO₂ при 37° С в течение 2-4 дней, пробирки со средой Кита-Тароцци выдерживают в термостате 1-2 суток при 37° С.

Заключение о целесообразности обработки материала с целью деконтаминации от посторонней микрофлоры делают на основании результатов микроскопического исследования материала.

Характер роста возбудителя на питательных средах. На среде Кита-Тароцци рост *S.chauvoei* сопровождается равномерным легким помутнением среды, слабым газообразованием, через 2-3 су-

ток среда просветляется и формируется рыхлый беловатый осадок. Старые культуры имеют запах прогорклого масла. Гнилостный запах и потемнение среды указывают на загрязнение. Скорость спорообразования зависит от ряда факторов и может варьировать от 24 до 72 часов. При получении смешанной культуры проводят дробный посев на глюкозо-кровяной агар в чашках Петри. В толще сывороточного агара возбудитель образует чечевицеобразные или круглые колонии с нежными отростками.

На кровяном агаре возбудитель формирует округлые колонии диаметром 0,5-3 мкм в большинстве случаев с небольшой зоной (β -гемолиза в виде «перламутровой пуговицы» (S-форма) или плоские с изрезанными краями в виде виноградного листа (R-форма). При посеве в мозговую среду последняя закисляется, есть газообразование, почернения нет, позднее в толще среды отмечается легкое покраснение. В молоке с кусочками печени рост обнаруживается уже через 16-18 часов при свертывании молока на 3-6-е, иногда на 14-е сутки.

Морфология клеток возбудителя в культуре. Из выросших культур готовят мазки, окрашивают по Граму. Клетки в мазках прямые или слегка изогнутые, полиморфные. Располагаются одиночно, парами, реже — цепочками, капсулу не образуют, перитрихи, споры овальные центральные или субтерминальные. В молодых культурах клетки возбудителя окрашиваются грамположительно, в старых имеют тенденцию к грамотрицательной окраске.

Идентификация возбудителя на основании изучения ферментативных свойств. Исследуемую культуру высевают на желточный агар, желатину, молоко, среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой, салицином, проводят пробу на индол. Для *S.chauffoei* характерен гидролиз желатины, расщепление перечисленных углеводов с образованием кислоты, отсутствие утилизации салицина, образование лецитиназы, липазы, казеиназы, индола. При исследовании ферментативных свойств, кроме классических сред и тестов, может быть использована система API20A для анаэробов (Analytab Products).

Биопроба. Проводят с целью выделения возбудителя из исследуемого материала или определения патогенных свойств выделен-

ной культуры. Очистка загрязненного материала путем заражения морских свинок менее эффективна, чем посев на плотные кровяные среды. Тканевый материал растирают в ступке со стерильным МПБ (1:10), в объеме 0,5-1,0 мл вводят подкожно в область брюшных мышц морским свинкам массой 350-400 г. За животными наблюдают в течение 8 суток. Гибель обычно наступает на 1-4-е сутки. При наличии в материале возбудителя на месте инъекции в коже обнаруживают кровоизлияния, геморрагический выпот. Кожа от пораженных мышц отделяется с трудом. Мышцы темно-красного цвета, в клетчатке немного газа, кишечник не вздут, желчный пузырь переполнен содержимым. Возможно наличие слабовирулентных штаммов, поэтому целесообразно внутримышечное введение материала с 1-2 каплями 20%-ого раствора молочной кислоты, подавляющей фагоцитоз. При подкожном заражении кролик не погибает (дифференцирующий признак).

Путем микроскопии мазков-отпечатков из тканей на месте инъекции отличить *S. chauvoei* от других возбудителей злокачественного отека достаточно сложно, за исключением *S. septicum*, который образует на серозных покровах длинные нити.

Лабораторная диагностика злокачественного отека

Злокачественный отек (газовая гангрена) — остропротекающая неконтагиозная раневая инфекционная болезнь всех видов животных, проявляющаяся воспалительным отеком, некрозом пораженных тканей и интоксикацией. Возбудители: *S. septicum*, *S. novyi*, *S. sordellii*, *S. perfringens*, *S. histolyticum*, иногда *S. chauvoei*.

Лабораторная диагностика основана на выделении и идентификации культур возбудителей.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования являются фрагменты пораженных мышц, тканевый экссудат и паренхиматозные органы.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из поступившего материала готовят мазки, окрашивают по Граму, Му-

ромцеву, микроскопируют. Морфология *C.perfringens*, *C.novyi*, *C.chauvoei* в тканевом материале описана выше.

Клетки *C.histolyticum* видны в препарате как тонкие грамположительные палочковидные бактерии размером 0,2-0,5х3-9 мкм с закругленными концами, расположенные одиночно, парно, редко цепочками. В организме возбудитель споры не образует.

Клетки *C.sordellii* полиморфные, палочковидные с закругленными концами, размером 1,2-1,5 х 3,8 мкм, располагаются изолированно, по 2-3 клетки, редко — цепочками.

Выделение и идентификация культур возбудителей

Культивирование. *C.histolyticum* — нестрогий анаэроб, *C.sordellii* — строгий анаэроб. Температурный оптимум 37-38° С. Культивирование других возбудителей злокачественного отека изложено выше.

Исследуемый материал засевают в среду Кита-Тароцци, глюкозо-кровоной агар, МПБ, МПА. Чашки Петри с посевами инкубируют в анаэроостате. Время культивирования посевов 24-48 часов.

Характер роста возбудителей на питательных средах. Особенности роста на питательных средах *C. perfringens*, *C.novyi*, *C.chauvoei* описаны ранее. *C.histolyticum* на среде Кита-Тароцци растет с равномерным помутнением, последующим просветлением среды и образованием осадка, газообразования нет. На глюкозо-кровоном агаре формирует мелкие, росинчатые, полусферические с ровным краем, блестящей поверхностью колонии диаметром 0,5-1 мм. С возрастом колонии становятся непрозрачными, серыми или белыми, с изрезанными краями. В толще сахарного агара неподвижные штаммы образуют чечевицеобразные колонии. Штаммы, имеющие жгутики, — колонии с уплотненным центром.

C. sordellii на среде Кита-Тароцци в течение 24 часов вызывает сильное помутнение и умеренное газообразование, культура имеет неприятный гнилостный запах. По мере старения в среде появляется слизистый осадок. На глюкозо-кровоном агаре через 24-48 часов формирует слабовыпуклые, серо-белые колонии неправильной формы, с шероховатой поверхностью, изрезанными краями. Обычно

колонии окружены узкой зоной β -гемолиза. В агаре столбиком формирует чечевицеобразные колонии.

Морфология клеток возбудителей в культуре. *C.histoliticum* в старых культурах формирует овальные споры, располагающиеся центрально или субтерминально («игольное ушко»), перитрих.

C.sordellii в культуре образует овальные центральные или субтерминальные споры. В молодых культурах активно подвижен (перитрих).

Идентификация возбудителей по ферментативным свойствам. При обнаружении в первичных посевах на среде Кита-Тароцци бактериальных клеток с типичными для возбудителей злокачественного отека морфологическими и тинкториальными свойствами из культур делают дробный посев на глюкозо-кровяной агар Цейсслера. В случае выявления типичных клеток возбудителя в колониях на глюкозо-кровяном агаре, в первичных или последующих посевах, из подозрительных колоний отвивают чистую культуру и у субкультур проверяют ферментативные свойства. Биохимические свойства *C.perfringens*, *C.novyi*, *C.chauvoei* изложены ранее в соответствующих разделах. Для *C.histoliticum* и *C.sordellii* характерны ферментативные свойства. Вирулентные штаммы *C.sordellii* продуцируют летальный токсин типа А-токсина *C. novyi*. Многие штаммы выделяют кислородолабильный гемолизин, неидентифицированные протеазы. *C.histoliticum* на казеиновых средах вырабатывает летальный и некротический токсин, высокоактивную коллагеназу и протеиназу, а также чувствительный к кислороду гемолизин. Для определения ферментативных свойств и типа токсина используют методы, указанные ранее (см. «Инфекционная энтеротоксемия»).

Таблица 7 - Ферментативные свойства *C. histolyticum* и *C. sordellii*

Вид кlostридий	Ферментативные свойства								
	Лецитиназа	Липаза	Желатиназа	Казеиназа	Индол	Образование кислоты			
						Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза
<i>C. sordellii</i>	+	-	+	+	+	+		-	+
<i>C. histolyticum</i>		-	+	+	-	-	-	-	-

Биопроба. Проводят для обнаружения возбудителей непосредственно в исследуемом материале, а также для определения патогенных свойств изолированных культур.

В первом случае в стерильной ступке растирают кусочки исследуемого материала с небольшим количеством МПБ и 0,5-1,0 см³ материала вводят подкожно морским свинкам в область брюшных мышц. За животными наблюдают в течение 8 суток. В положительном случае животные погибают через 1-2 суток. Погибших морских свинок вскрывают, учитывают характер патологоанатомических изменений и проводят бактериологическое исследование. Характер патологоанатомических изменений у морских свинок, зараженных *C. novyi*, описан ранее. При наличии в материале *C. perfringens* типов А и D кожа на месте инъекции легко отслаивается от мышц, которые имеют серовато-грязный цвет, кишечник вздут, сосуды кровенаполнены. В случае заражения *C. perfringens* типов В и С кожа легко отделяется, но мышцы красного цвета, сухие. Кишечник геморрагически воспален, вздут. Заражение *C. sordellii* приводит к образованию на месте инъекции студенистого отека, мышцы бледные. *C. histolyticum* при заражении редко вызывает гибель животных. Эффективно внутримышечное заражение. В этом случае кожа на месте инъекции красно-фиолетовая, мышцы расплавляются (кашицеобразная масса), газа нет.

Лабораторная диагностика ботулизма

Ботулизм — остропротекающая кормовая токсикоинфекция. Характеризуется поражением центральной нервной системы и сопровождается парезами двигательных мышц. Возбудитель — *Clostridium botulinum*, продуцирует несколько типов токсинов. К токсинам отдельных типов наиболее чувствительны: А — человек, куры; В — человек, КРС, куры; Са — водоплавающая птица; Сб — КРС, лошади, собаки; D — КРС, овцы, реже — лошади, человек; Е — человек; F — человек; G (*C. argentinense*) — человек.

Лабораторная диагностика ботулизма основана на обнаружении и идентификации ботулинического токсина в крови больных, недавно погибших животных, кормах (пищевых продуктах), а также выделении культуры *C. botulinum* и выявлении ее токсигенных свойств.

Бактериологическое исследование

Объектом исследования являются пробы подозрительных кормов, содержимое желудка, кусочки печени, серозный экссудат. От больных животных берут пробы крови. Материал берут не позднее двух часов после гибели животного.

Обнаружение ботулинического токсина. Кровь (сыворотку крови), серозный экссудат, из-за быстрого разрушения токсина, необходимо исследовать в кратчайшие сроки. Перечисленные материалы вводят белым мышам внутривенно (0,3 мл). Наблюдение за животными ведут в течение пяти суток. В положительных случаях у животных развиваются общая и мышечная слабость, параличи задних конечностей.

Пробы корма, содержимое желудка, кусочки печени массой 25-30 г растирают в ступке со стерильным песком, заливают равным объемом стерильного физиологического раствора, выдерживают два часа при комнатной температуре. Затем 2/3 материала фильтруют через вату или центрифугируют при 3000 об/мин 30 минут. Половину фильтрата прогревают в водяной бане при 100° С в течение 20-30 минут. Ботулинический токсин разрушается при 100° С за 20 минут. Гретый и не гретый фильтрат вводят внутривенно двум белым мышам массой 16-18 г (0,5-0,8 мл), морским свинкам массой 350 г — подкожно (3-5 мл). Наблюдение ведут в течение пяти су-

ток. В положительных случаях отмечают наличие шаткой походки, расслабление скелетной мускулатуры, западение брюшной стенки (осиная талия) и гибель на 2-5-е сутки животных, которым ввели не гретый фильтрат, и отсутствие клинических симптомов у животных с гретым материалом («Методические указания по лабораторной диагностике ботулизма»).

Обнаружение токсина может быть проведено несколько иным способом. Приготовленную взвесь центрифугируют, фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Поскольку токсин может присутствовать в форме протоксина (E), то для его активации девять частей фильтрата смешивают с одной частью 1%-ного раствора трипсина, выдерживают 45 минут при 37° С и затем вводят животным.

На следующем этапе проводят идентификацию токсина в реакции нейтрализации с анитоксическими сыворотками типов А, В, С, D, E. С этой целью смешивают по 0,2 мл сыворотки каждого типа в одной пробирке, добавляют 1 мл фильтрата, инкубируют 45 минут при комнатной температуре или 30 минут при 35-37° С. Далее вводят двум белым мышам массой 16-18 г внутрибрюшинно по 0,8 мл смеси. Двум контрольным животным инъецируют исследуемый фильтрат, разведенный 1:1 стерильным физиологическим раствором. Учет результатов проводят, как описано выше. При нейтрализации токсина смесью антисывороток и гибели контрольных животных токсин идентифицируют как ботулинический.

В случае необходимости определяют в РН тип ботулинического токсина по следующей схеме. Фильтрат разливают в шесть пробирок по 2,4 мл. В пять пробирок вносят по 0,6 мл тех или иных типовых антисывороток (А, В, С, D, E), в шестую — 0,6 мл физиологического раствора. Смеси инкубируют, как описано выше, и вводят каждую внутрибрюшинно двум белым мышам в дозе 0,8-1 мл. Результат учитывают в течение четырех суток. В настоящее время выпускается диагностический набор для иммуноферментного выявления ботулинического токсина (фирма Elcotech).

Обнаружение ботулинического токсина в исследуемом материале считается достаточным основанием для постановки диагноза. При исследованиях по выявлению токсина в животном материале необходимо учитывать, что споры *C. botulinum* могут присутствовать в кишечном тракте здоровых животных, после их смерти спо-

собны размножаться в кишечнике в анаэробных условиях и продуцировать токсин.

Выделение и идентификация культуры *C.botulinum*

Пробы исследуемого материала, подготовленные, как указано выше, для обнаружения ботулинического токсина высевают в жидкую среду Кита-Тароцци с 0,5% глюкозы в два флакона емкостью 100-200 мл. Оптимум рН питательных сред 7,0-7,6, температурный оптимум — 30-37° С. Максимальное накопление токсина типов А и Е наступает через 4 суток, типов В и С — через 5 суток, типа D — через 10 суток инкубирования посевов. После посева материала один флакон прогревают при 80° С в течение часа, другой не подвергают термической обработке. Прогревание уничтожает большую часть сопутствующей неспорообразующей микрофлоры и инициирует прорастание спор возбудителя. Споры возбудителя типа Е требуют обработки лизоцимом. Параллельно, с целью выделения чистой культуры возбудителя, материал высевают на глюкозо-кровяной агар Цейсслера в чашках Петри, которые инкубируют в анаэроостатах с разрежением воздуха не более 5 мм ртутного столба или замещают воздух смесью водорода и СО₂. Посевы инкубируют при 35° С в течение 5 суток.

Рост возбудителя на жидкой питательной среде сопровождается ее постепенным помутнением (на 2-3-й сутки), газообразованием, появлением у культуры запаха прогорклого масла. Из выросших культур делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении в мазках грамположительных палочковидных бактерий (0,9-1,2x4-6мкм) субтерминальными спорами на 5-7-е сутки инкубирования проводят выявление токсина и его идентификацию в реакции нейтрализации на мышах, как описано выше. Смешанные первичные культуры могут быть посеяны на глюкозо-кровяной агар для получения чистой культуры.

Посевы исследуемого материала или первичных бульонных культур на глюкозо-кровяной агар просматривают на 2-4-е сутки инкубирования. Колонии *C. botulinum* круглые или с корневидными отростками, бесцветные или сероватые, выпуклые, диаметром 2-6 мм, в большинстве случаев окружены зоной β-гемолиза. При обнаружении в колониях бактериальных клеток, типичных для *C.*

botulinum, культуры отвивают на оптимальные питательные среды, подвергают идентификации по биохимическим признакам, определяют наличие способности к токсинообразованию и тип токсина (см. выше). С целью видовой идентификации у культур исследуют наличие лецитиназы и липазы путем посева на желточный агар, определяют наличие желатиназы, казеиназы, способности образовывать индол, кислоту из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы. По перечисленным критериям культуры *C. botulinum* могут быть отнесены к одному из четырех ферментативных типов (табл.8). Применяют тест-системы для анаэробов (см. ранее).

Таблица 8 - Ферментативные свойства *C.botulinum*

Тип	Признаки									Тип токсина
	Лецитиназа	Липаза	Желатиназа	Казеиназа	Индол	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	
1	-	+	+	+	-	+	-	-	+	A, B, F
2	-	+	+	-	-	-	-	-	+	B, E, F
3	±	+	+	-	±	+	-	-	±	C, D
4	-	-	+	+	-	-	н.д.	-	н.д.	

— варьирующий признак н.д. — нет данных

Лабораторная диагностика столбняка

Столбняк — остропотекающая инфекционная болезнь животных и человека, характеризующаяся судорожными сокращениями мускулатуры в результате воздействия токсина возбудителя. Возбудитель болезни — *C. tetani*.

Лабораторный диагноз устанавливают на основании обнаружения в исследуемом: материале токсина возбудителя, а также выделения культуры возбудителя и выявления у нее токсигенных

свойств. С учетом характерных клинических признаков болезни, нередко ограничиваются при постановке диагноза изучением клиники и анамнестических данных.

Бактериологическое для исследования

Прижизненно для исследования направляют раневой секрет, фрагменты тканей из глубоких слоев мест поражения; посмертно — ткани из мест поражения, кусочки печени, селезенку, кровь.

Микроскопическое исследование исходного материала. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. В положительных случаях находят тонкие грам-положительные палочковидные клетки размером 0,4-0,6x4-8 мкм, с характерными терминально расположенными спорами («барабанная палочка»), которые в 2-3 раза толще клетки; капсулы нет. Результаты микроскопического исследования имеют ориентировочное значение, так как с возбудителем морфологически сходны *S. tetanoides* и *S. tetanomorphum*.

Обнаружение токсина, выделение и идентификация культуры *S. tetani*

Обнаружение токсина в исследуемом материале. Исследуемый материал растирают со стерильным песком в ступе с физиологическим раствором (1:2). Половину взвеси экстрагируют при комнатной температуре в течение часа, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Фильтратом заражают подкожно в заднюю лапку 2 белых мышей (масса 16-18 г) в дозе 0,5-1 мл. Второй группе мышей вводят 0,5 мл фильтрата и 500 ЕД столбнячного антитоксина. Животным третьей группы вводят фильтрат, прогретый при 100° С в течение 30 минут. Положительный результат: у мышей 2 и 3-й групп изменения должны отсутствовать, у мышей 1-й группы через 2-4 суток в положительных случаях появляются признаки тетанического сокращения мышц. Животные погибают с вытянутыми лапками, искривлением позвоночника в сторону лапки, в которую был введен исследуемый материал. За животными наблюдают в течение 10 суток. При выявлении токсина в материале работу по выделению культуры прекращают. В соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике столбняка» предусмот-

рено заражение мышей фильтратом подкожно в заднюю лапку в дозе 0,5-1 мл или двух морских свинок массой 300-350 г в дозе 3-5 мл без предварительного прогревания фильтрата и без введения столбнячного антитоксина. Срок наблюдения за клиническим состоянием животных — 10 суток.

Выделение культуры *C. tetani*. Возбудитель — строгий анаэроб, температурный оптимум — 37-38° С, рН 7,2 -7,4. Вторую половину исследуемой взвеси (см. выше) прогревают в течение 20 минут при 80° С, затем засевают в среду Кита-Тароцци с 0,5% глюкозы, печеночный, мартеновский бульон со слоем вазелинового масла. Можно делать посев непрогретого материала в два культуральных сосуда, один из которых затем прогревают при 80° С в течение 20 минут. Параллельно прогретый материал высевают с целью получения изолированных колоний на кровяной агар с 1,5% и 3% агара в чашки Петри. Посевы культивируют в анаэроостате с разрежением воздуха до 4 -5 мм ртутного столба или с заменой воздуха смесью Н₂ и СО₂ при 37 -38° С в течение 2-5 суток.

Через 2-4 дня просматривают посевы на плотных и жидких средах. На среде Кита-Тароцци рост возбудителя сопровождается ее интенсивным помутнением с небольшим газообразованием, позднее (2-3 суток) выпадает осадок, среда просветляется, культура имеет запах жженого рога.

На 3%-ном агаре Цейсслера *C. tetani* формирует круглые, бесцветные или серые колонии с неровными краями (ризоидные), на 1,5%-ном агаре (влажном) наблюдают характерный расползающийся, роящийся рост возбудителя. Может наблюдаться узкая зона β-гемолиза.

Из жидких питательных сред и подозрительных колоний делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. В положительных случаях находят в мазках тонкие грамположительные палочки с терминальными спорами, с возрастом клетки становятся грамвариабельными, вплоть до грамотрицательных. Если первичный посев производили только в жидкую питательную среду, то производят посев бульонной культуры на кровяной агар с целью получения изолированных колоний.

При обнаружении в жидких питательных средах бактериальных клеток, характерных для *C. tetani*, на 4-6-е сутки инкубирования определяют наличие в культуре токсина путем ее введения белым мышам, как было указано выше.

Основным направлением лабораторного исследования является обнаружение токсина, к идентификации выделенной культуры прибегают редко. Для *C. tetani* характерно отсутствие лецитиназы, липазы, казеиназы, возбудитель не образует кислоты из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы, гидролизует желатину, индол образует не постоянно. Для целей идентификации удобно использовать тест-системы для анаэробов.

Питательные среды

Среда Кита-Тароци. Мясо или печень крупного рогатого скота нарезают мелкими кусочками, заливают трехкратным объемом МПБ или бульона Хоттингера (рН 7,4-7,6) и 30 минут кипятят. Затем среду фильтруют, печень (мясо) промывают водопроводной водой, подсушивают фильтровальной бумагой. По 3-4 кусочка мяса (печени) помещают в пробирку, наливают 7-8 мл бульона, покрывают слоем вазелинового масла и стерилизуют при 120° С 20 минут. Перед использованием среду регенерируют (кипятят с последующим охлаждением).

Кровяной агар с глюкозой. К 3%-ному МПА (рН 7,2-7,4), расплавленному и охлажденному до 50° С, добавляют до 1-2% стерильного раствора глюкозы, 15-20% свежей дефибрированной крови барана или лошади. Разливают по чашкам Петри, подсушивают в термостате.

Полужидкий агар для строгих анаэробов (Тароци). В бульон Мартена (рН 7,2-7,4) с 0,3-0,5% глюкозы добавляют 0,1% агара. Среду разливают по 9 мл в стерильные пробирки с кусочками вареного мяса, печени или фарша, стерилизуют при 120° С 30 минут. Среду можно использовать, не заливая поверхность вазелиновым маслом.

Мозговая среда (МС). Свежий мозг (не позже чем через 18 часов после убоя животного) очищают от пленок и пропускают через мясорубку. Мозговой фарш заливают водопроводной водой (1 часть мозгового фарша на 1 часть воды) и протирают через сито. Реакция протертой массы должна быть нейтральной или слабо-

щелочной. Стерилизуют текучим паром в течение 2 часов. Затем раскладывают по пробиркам высоким столбиком и стерилизуют в течение 2 часов при 110° С. Для более быстрого почернения мозговой среды при культивировании анаэробов рекомендуется добавить 0,05% сернокислого железа.

Агар для трубок Виньял-Вейона. В бульоне Мартена (рН 7,4) растворяют 2% агара, 0,1% глюкозы. Среду разливают в узкие тонкостенные пробирки и стерилизуют дробно, текучим паром в течение 3 дней.

Бульон Вейнберга для анаэробов. 1 кг бычьего сердца пропускают через мясорубку, добавляют к фаршу 1 л воды, нагревают до кипения, охлаждают, снимают жир. Смешивают 400 г печени, 400 г свиных желудков, 40 г соляной кислоты, 4 л воды, подогретой до 50° С, и выдерживают при этой температуре 18-24 ч. Затем подогревают до 100° С, жидкость сливают, фильтруют, добавляют 0,2% двуосновного фосфорнокислого натрия и устанавливают рН 7,4, смешивают 1 л мясной воды из сердца быка и 2 л полученного пептона, устанавливают рН 7,8-8,2 и стерилизуют при 120° С 30 минут. Бульон разливают по пробиркам с кусочками вареной печени, наливают стерильное вазелиновое масло слоем 0,5 см и вновь стерилизуют при 120° С 30 минут. Перед посевом к бульону добавляют стерильный раствор глюкозы до 0,5%.

Среда Виллиса и Хоббс. Смешивают 400 мл бульона Хоттингера, 4,8 г агара, 4,8 глюкозы, 1,3 мл 1%-ного раствора нейтрального красного. Стерилизуют при 115° С 15 минут, охлаждают до 50° С и добавляют 15 мл стерильной желточной суспензии (смешивают поровну куриный желток, физиологический раствор и 60 мл стерильного обезжиренного молока).

Железосульфитный агар (Вильсон - Блер). К 100 мл 3%-ного МПА (рН 7,4) с 1% глюкозы при температуре 60° С добавляют 10 мл 20%-ного раствора сернокислого натрия (Na_2SO_4) и 1 мл 8%-ного раствора хлористого железа (FeCl_3), приготовленного на стерильной дистиллированной воде. Раствор Na_2SO_4 предварительно стерилизуют 1 ч текучим паром. Затем среду, не стерилизуя, разливают по чашкам Петри. Сернокислый натрий можно заменить серноватисто-кислым натрием ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_4$), а хлористое железо — сернокислым (FeSO_4). Сульфат натрия соединяется с хлорным железом, и образуется черный осадок сернистого железа (FeS). Этой способностью обладают анаэробы и некоторые аэробные бактерии, вследст-

вие чего колонии таких микроорганизмов окрашиваются в черный цвет. *C. perfringens*, обладающий большой скоростью роста, изменяет цвет среды через 1-2 ч культивирования. Другие анаэробы формируют зеленовато-черные колонии через 6-7 ч.

Молочные среды. Молоко отстаивают и удаляют верхний жировой слой. Обезжиренное молоко разливают высоким столбиком в пробирки, в которые предварительно укладывают кусочки вареной печени, и стерилизуют 3 дня при температуре 100° С по 20 минут.

Железо-сульфитное молоко. К 100 мл обезжиренного молока добавляют 10 мл 20%-ного раствора сернистокислового натрия и 1 мл 8%-ного хлористого железа. Среду готовят непосредственно перед использованием и разливают по пробиркам. На данной среде *C. perfringens* можно обнаружить в смеси со стрептококками, которые на других средах способны заметно тормозить его рост.

Бензидино-кровяной агар. К 3%-ному МПА (рН 6,4) с 1% глюкозы, подогретому до температуры 50° С, добавляют бензидин до концентрации 9% и 10% стерильной дефибринированной крови барана. Компоненты перемешивают до приобретения средой шоколадного оттенка, разливают по чашкам Петри и подсушивают 4-5 ч в термостате. Засеянные чашки выдерживают в анаэробных условиях в термостате 12-24 ч, а затем переносят в аэробные условия. Колонии *C. novyi* окрашиваются в черный цвет за 15-30 мин. Раствор бензидина готовят следующим образом: к 50 мл дистиллированной воды добавляют 0,25 г основного бензидина, 0,3 мл 1% НС1 и нагревают до растворения. Раствор пригоден для употребления в течение 2 недель

Желточно-кровяной агар Шапина — Вегина. К 2,5%-ному МПА добавляют 10% дефибринированной крови барана, 10% желточной взвеси. Среда предназначена для выявления *C. novyi*. Через 16 ч выращивания колонии окружены непрозрачной зоной гемолиза с наличием на поверхности среды вокруг колоний непрозрачной пленки с жемчужным блеском. Другие бактерии (аэробы, анаэробы), как правило, не дают одновременно перламутрового слоя и зоны редукции.

Полусинтетическая среда. Используют для культивирования и быстрой селекции анаэробных бактерий. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 15 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 2,5 г натрия хлорида, 1,3 г агар-агара и подщелачивают. Смесь автоклавируют при 120° С в течение 15 минут, фильтруют, добавляют 5,5 г

глюкозы, 0,5 г гидросульфита натрия, предварительно растворенных в небольшом количестве воды, устанавливают рН 7,1. Добавляют 0,001 г резазурина и встряхивают смесь в течение нескольких минут. Среду разливают в пробирки по 15 мл, стерилизуют при 110° С 30 минут, охлаждают под холодной водой. При росте анаэробов среда окрашивается в нижней части пробирки, факультативных анаэробов — весь столбик среды. Среду используют 3 недели при хранении в условиях комнатной температуры.

Перфрингенс-агар (O.P.SJP.-agar, пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 15 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г соевого пептона, 7 г печеночного экстракта, 1 г железа аммонийно-цитратного, 1 г натрия метабисульфита, 1,5 г трисбуфера, 10 г агара, устанавливают рН 7,3. Стерилизуют автоклавированием при 121° С 15 минут, затем охлаждают до 50° С, вносят добавки (стерильно), обеспечивающие среде селективные свойства, и разливают по чашкам Петри. Добавка «А» содержит 100 мг натрия сульфадиазиана, добавка «В» — 0,5 г олеандомицина фосфата и 10 ЕД полимиксина В сульфата. Среда содержит из 100 мкг/мл натрия сульфадиазина, 0,5 мкг/мл олеандомицина фосфата и 10 ЕД полимиксина В сульфата. Данный состав обеспечивает селективные свойства, оптимальные для изоляции *S. perfringens*. Натрия метабисульфат и аммонийно-цитратное железо являются индикаторами редукции сульфита, что влияет на формирование колоний возбудителя черного цвета диаметром 2-4 мм. Рост других сульфитредуцирующих бактерий (сальмонеллы, протей, цитробактер, стафилококки, бациллы) ингибируется. На среде могут расти энтерококки, но их колонии по внешнему виду отличаются от колоний *S. perfringens*.

Анаэробный агар Шедлера (пропись фирмы «Дифко», 1982). В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптического соевого бульона, 5 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г декстрозы, 0,4 г цистеина гидрохлорида, 0,01 г гемина, 0,75 г трисбуфера, 13,5 г агара. Устанавливают рН 7,6, стерилизуют автоклавированием при 121° С 15 минут. С селективными добавками среду используют для выделения клостридий, бактериоидов, флавобактерий, лактобацилл, стрептококков (анаэробных) из проб фекалий и кишечного тракта. Для изоляции клостридий и бактериоидов в 1000 мл основного анаэробного агара добавляют 10 г порошка плаценты и 0,002 г неомицина. С целью выделения флавобактерий в 1000 мл

вносят 7 мл 0,5%-ного тиротрицина в этаноле. Для анаэробных лактобацилл и стрептококков в 1000 мл вносят 10 г натрия хлорида и 0,002 г неомицина. Посевы инкубируют при 37° С в анаэробных условиях.

Основной перфрингенс-агар (пропись фирмы «Дифко», 1982). Среду используют для изготовления TSC- или SFP-агара при предварительной идентификации и подсчете *C. perfringens*. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют триптозы — 15 г, соевого пептона — 5 г, мясного экстракта (сухого) — 5 г, дрожжевого экстракта — 5 г, натрия метабисульфита — 1 г, железа аммонийно-цитратного — 1 г, агара — 14 г. Устанавливают рН 7,6, стерилизуют при 121° С 10 минут. Затем среду охлаждают до 50° С и вносят соответствующие селективные добавки.

Триптозо-сульфитный циклосериновый агар (TSC-агар). В основной перфрингенс-агар вносят D-циклосерин из расчета 400 мг/л и 50 мл/л желточной эмульсии. Компоненты перемешивают и готовую среду разливают в чашки Петри.

Перфрингенс-агар Шахиди-Фергусона (SFP-агар). В основной перфрингенс-агар вносят следующие антибиотики: 12 мг/л канамицин-сульфат, 30000 ЕД/л полимиксин В сульфата и 50 мл/л желточной эмульсии. Готовую среду разливают в чашки Петри. На обеих указанных средах вокруг черных колоний *C. perfringens* образуется опалесцирующая зона, указывающая на лецитиназную активность микроорганизма.

Анаэробный бульон Шедлера. По составу среда аналогична анаэробному агару Шедлера, но из нее исключен агар. Используют для выращивания патогенных анаэробов, для определения антибиотикоустойчивости анаэробов методом разведения с выражением результата в виде МИК.

Тиогликолятный бульон. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 0,5 г L-цистина, 2,5 г NaCl, 5,5 г декстрозы, 5 г дрожжевого экстракта, 15 г панкреатического перевара казеина, 0,5 г натрия тиогликолята. Устанавливают рН 7,1, разливают по емкостям и стерилизуют при 121° С 15 минут. Перед использованием среду кипятят и охлаждают. Рекомендуется для контроля контаминации различных материалов анаэробными бактериями.

Анаэробный агар Уилкинса - Чангрена. В 1000 мл дистиллированной воды растворяют 10 г триптона, 10 г желатинового пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 1 г декстрозы, 5 г NaCl, 1 г L-

аргинина, 1 г натрия пирувата, 0,0005 г менадиона, 0,005 г гемина, 10 г агара. Устанавливают рН 7,1, стерилизуют при 121° С 15 минут. Среда рекомендуется для изоляции анаэробных микроорганизмов из клинических материалов, является стандартной для определения антибиотикочувствительности анаэробных бактерий. При исключении агара среда может быть использована как питательный бульон.

Обогащенный клостридиальный агар (RCM-agar). В 1000 йл дистиллированной воды растворяют 3 г дрожжевого экстракта, 10 г мясного экстракта, 10 г пептона, 5 г декстрозы, 1 г растворимого крахмала, 5 г натрия хлорида, 3 г натрия ацетата, 0,5 г цистеина гидрохлорида, 15 г агара. Устанавливают рН 6,8, стерилизуют при 121° С 15 минут. Среда рекомендуется для исследования кишечной микрофлоры. С добавками крови она пригодна для обнаружения в фецес животных и людей лактобацилл, с добавками крови и неомидина — бактериоидов.

Кровяной агар для *Clostridium chauvoei*. Состав: питательный бульон — 94 мл; печеночный экстракт (Oxoid) — 3,2 г; глюкоза — 1,0 г; агар — 1,6 г; дефибрирированная кровь овцы — 5,0 мл. Приготовление: бульон, печеночный экстракт, глюкозу и агар смешивают и автоклавируют при 115° С в течение 10 минут. К остуженной среде (50° С) добавляют кровь и среду разливают в чашки Петри.

Полужидкий агар для определения ферментативной активности анаэробов. Для устранения углеводов, которые могут быть в мясе, среда должна быть приготовлена на сброженной мясной воде. Сброженная мясная вода: 500 г мясного фарша заливают 1 л теплой (37° С) водопроводной воды, добавляют 5-7 г обычных пекарских дрожжей, перемешивают и ставят в термостат на 18 часов. Мясо отжимают через полотно, полученную жидкость кипятят, фильтруют, разливают в колбы (по 500 мл) и стерилизуют при температуре 115-120° С в течение 15-20 минут. Сброженную мясную воду можно заготавливать впрок и употреблять по мере необходимости.

Картофельный бульон Нечаевской и Старобинец. Тщательно вымытый и мелко нарезанный картофель заливают водой из расчета на 1 кг картофеля 2 л воды, стерилизуют при 2 атмосферах в течение 10 минут, затем фильтруют через вату или марлю в горячем виде. К фильтрату добавляют 1% сухого пептона и 0,5% поваренной соли,

устанавливают рН 7,2-7,4 и вновь фильтруют. Полученную светло-желтую прозрачную жидкость разливают по пробиркам или флаконам, в которые помещают кусочки вареного картофеля и наслаивают вазелиновое масло; стерилизуют 20 минут при 1 атмосфере. Для приготовления твердой среды к бульону добавляют 2-3% агара и стерилизуют.

На картофельных средах все анаэробы не теряют своих патогенных и токсигенных свойств и хорошо растут.

Полужидкий агар с углеводами и индикатором. В 500 мл сброженной мясной воды добавляют 2% пептона и 0,5% хлористого натрия, устанавливают рН 7,4 и кипятят до растворения пептона. Отливают 100 мл пептонной мясной воды и растворяют 3,5 г сухого кристаллического лакмуса, предварительно проведенного через спирт. К оставшимся 400 мл мясной пептонной воды добавляют 0,25% агара (на 500 мл) и расплавляют в автоклаве.

К горячему агару добавляют 100 мл мясо-пептонной воды с лакмусом. Для улучшения буферности среды добавляют 0,2% дву-металлического фосфорнокислого натрия.

Агар с лакмусом разливают по колбам из расчета количества имеющихся в лаборатории испытуемых Сахаров. В каждую колбу вносят 2% испытуемого сахара. После растворения сахара агар разливают по пробиркам высоким столбиком и дробно стерилизуют текучим паром 3 дня по 15 минут. Посев производят в расплавленный и остуженный до 40° С полужидкий агар. Лакмус можно заменить индикатором Андраде (5 мл). Приготовление индикатора Андраде: 0,5 г кислого фуксина растворяют в 100 мл дистиллированной воды и прибавляют 16 мл нормального раствора едкого натра. Фуксин довольно быстро обесцвечивается.

При определении ферментативной активности анаэробов методом посева в полужидкий агар необходимо учитывать, что в глубине пробирки среда чаще всего имеет цвет бульона, а не индикатора, и только в верхнем слое, куда легко диффундирует кислород воздуха, отмечается покраснение в случае разложения данного сахара с образованием кислоты или посинение при отсутствии его ферментации. В глубине среды благодаря отсутствию кислорода лакмус переходит в свою бесцветную фазу. Чтобы установить изменение среды, необходимо убедиться в наличии роста; в противном случае нельзя судить об отношении микроба к данному углеводу.

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

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

Учебное пособие «Диагностика клостридиозов животных».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13