

Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины

**Кафедра эпизоотологии
и инфекционных болезней животных**

ЛИСТЕРИОЗ

Учебно-методическое пособие для студентов факультета ветеринарной
медицины по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» и
слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям

Витебск
ВГАВМ
2021

УДК 619:616.98:579.869.1

ББК 48.731.222

Л63

Рекомендовано к изданию методической комиссией биотехнологического факультета УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» от 30 марта 2021 г. (протокол № 18)

Авторы:

доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор *П. А. Красочко*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Н. В. Синица*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Я. П. Яромчик*; доктор биологических наук, доцент *П. П. Красочко*; доктор ветеринарных наук, профессор *И. А. Красочко*; кандидат ветеринарных наук, доцент *А. В. Бублов*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Г. Э. Дремач*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Д. Д. Морозов*; ассистент *А. М. Мисник*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, доцент *И. Н. Громов*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *Д. С. Борисовец*

Л63 **Листерииоз** : учеб.–метод. пособие для студентов факультета ветеринарной медицины по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» и слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям / П. А. Красочко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2021. – 48 с.

В пособии освещены вопросы этиологии возбудителя листериоза, свойств листерий, представлена информация о клиническом течении, патологоанатомических признаках, диагностике и профилактике листериоза сельскохозяйственных животных. Учебно-методическое пособие предназначено для студентов факультетов ветеринарной медицины, слушателей факультетов повышения квалификации, практических ветеринарных специалистов, специалистов государственных ветеринарных служб, предприятий комбикормовой промышленности.

УДК 619:616.98:579.869.1

ББК 48.731.222

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2021

Оглавление

1. План проведения лабораторно-практического занятия по эпизоотологии и инфекционным болезням со студентами	4
2. Описание болезни, отбор и доставка проб для лабораторных исследований, диагностика, мероприятия по профилактике и ликвидации	6
Список рекомендуемой литературы	34
Приложение 1. Методы обнаружения Л-форм листерий	36
Приложение 2. Рецепты и способы приготовления индикаторных и элективных сред. Индикаторные среды для культивирования листерий	43
Приложение 3. Методика выделения листерий из силоса	45
Приложение 4. Схема бактериологического исследования материала на листериоз	46

ПЛАН

проведения лабораторно-практического занятия по эпизоотологии и инфекционным болезням со студентами

1. **Тема:** Методы диагностики и мероприятия при листериозе сельскохозяйственных животных.

2. **Время:** 2 часа.

3. **Место занятий** – практикум кафедры.

4. **Цель занятия:** изучить методы диагностики, мероприятия по профилактике и ликвидации листериоза.

5. **Материальная обеспеченность занятий:**

5.1. **Таблицы:** Этиология; методы диагностики листериоза; мероприятия по борьбе с листериозом.

5.2. **Рисунки** (симптомы болезни у разных видов животных)

5.3. **Биопрепараты:** Сухая живая вакцина из штамма АУФ против листериоза животных, наборы для лабораторной диагностики в РА и РСК.

5.4. Ветеринарное законодательство - том 3.

6. **Методика проведения занятия и регламент**

Преподаватель в течение 2-3 минут проверяет присутствующих студентов и определяет цель и задачу занятия.

В порядке беседы и опроса студентов выясняются следующие вопросы (42-43 мин).

1. **Определение болезни, распространение и ущерб** (акцентировать внимание на особую опасность заболевания для человека).

2. **Этиология** (обратить внимание на способность размножения возбудителя в силосе, расте при низкой температуре).

3. **Эпизоотологический метод диагностики** (источники возбудителя инфекции, восприимчивость различных видов животных, пути распространения болезни, листерионосительство у домашних животных и мышевидных грызунов как фактор, ведущий к стационарности заболевания, сезонность и т. д.).

4. **Клинический метод диагностики** (инкубационный период, клинические признаки при нервной и септической формах болезни, особенности проявления листериоза у разных видов животных).

5. **Патологоанатомический метод** диагностики (изменения, обнаруживаемые при вскрытии трупов в зависимости от формы болезни и длительности течения, гистологическое исследование головного мозга).

6. **Бактериологический метод диагностики** (микроскопия мазков-отпечатков, рост на питательных средах, выделение чистой культуры, ее идентификация).

Биологический метод диагностики (заражение лабораторных животных, в том числе – конъюнктивальная проба на морских свинках).

7. **Дифференциальный диагноз.** Дифференцировать листериоз у крупного рогатого скота необходимо от злокачественной катаральной горячки, бруцеллеза, кампилобактериоза, трихомоноза; у свиней – от болезни Ауески,

отечной болезни, рожи, болезни Тешена; у овец – от ценуроза; у всех животных – от бешенства, кормовых отравлений).

8. **Лечение и специфическая профилактика.** При нервной форме болезни животных не лечат, при других формах – лечение малоэффективно.

9. **Мероприятия по ликвидации.** Выявление и изоляция больных животных, вынужденная вакцинация клинически здоровых.

В конце занятия преподаватель подводит итоги, отвечает на заданные вопросы и дает задание на дом по следующей теме.

В итоге проведенного занятия студенты должны уметь:

1. Поставить диагноз на листериоз.
2. Организовать мероприятия по ликвидации листериоза в хозяйстве.

Для углубленного изучения студентами данной темы и освещения запланированных вопросов при проведении лабораторно-практического занятия ниже приводятся краткие теоретические и практические сведения и основные положения нормативных документов Международного Эпизоотического Бюро и Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь.

ЛИСТЕРИОЗ

Листериоз – (лат., англ.– *Listeriosis*; синонимы: листереллез, болезнь реки Тигра, «силосная» болезнь) – инфекционная зооантропонозная болезнь животных, протекающая с признаками поражения центральной нервной системы, явлениями сепсиса, абортами и маститами. У людей болезнь проявляется полиморфизмом клинических признаков, поражением практически всех органов, систем и тканей организма и высокой летальностью у новорожденных. Болезнь у животных и людей может протекать в форме бессимптомного носительства.

Статус инфекционной болезни по МЭБ:

В соответствии с Кодексом здоровья о наземных животных Международного эпизоотического бюро (МЭБ) 2019 года (<http://www.oie.int>) с 1 января в список МЭБ на основании решения Всемирной Ассамблеи Делегатов в категорию «болезни, инфекции и инфестации нескольких видов животных» включены 23 нозологические единицы инфекционных и инвазионных болезней, в том числе – листериоз.

Историческая справка. История изучения листериоза связана с XX веком, однако отдельные исследования были проведены в конце XIX столетия.

В 1892 Lucet описал септическую болезнь кроликов, протекающую с поражением дыхательных путей, отеком легких и сильным увеличением селезенки. При этом автор выделил маленькую подвижную грамположительную бактерию, которую назвал *Bact. septicaemia cuniculi*.

После работ Э. Маррея, Э. Уэбба и П. Суэна началось систематическое изучение этой болезни. Выделенному микроорганизму они дали название *Bact. monocytogenes*.

В 1940 году Ж. Пири предложил именовать возбудителя болезни *Listeriamonocytogenes* в честь выдающегося микробиолога Листера, что и было утверждено Международной классификационной комиссией.



Рисунок 1 – Джозеф Листер (1827-1912)

(https://mypresentation.ru/presentation/prezentaciya_na_temu_quotlisteriozquot)

В бывшем СССР в 1934 году на ряде биофабрик выделили от подсвинков-продуцентов вируса классической чумы свиней так называемые X-палочки, которые впоследствии были определены как листерии.

Листерииоз в СССР впервые был диагностирован профессором Т. П. Слабоспицким, который в 1936 году наблюдал эту болезнь у поросят в пригородном хозяйстве г. Харькова.

Изучением проблемы листериоза занимались Ю. А. Малахов, И. А. Бакулов, В. И. Попов и другие исследователи.

Распространение. Листерииоз распространен по всему земному шару. Зарегистрирован в более чем 50 странах мира и во всех странах СНГ. В Республике Беларусь ежегодно выявляется от 2 до 5 неблагополучных пунктов по листериозу животных.

Экономический ущерб может быть значительный и складывается из летальности животных до 40%, снижения продуктивности, аборт, а также затрат на лечебно-профилактические мероприятия. Из-за восприимчивости человека к листериозу болезнь имеет и социальную значимость. Летальность у людей при листериозе может достигать 60%, в т.ч. у детей до 1 мес. возраста от 21,1% до 75,1%.

Этиология. Возбудитель листериоза – *Listeria monocytogenes* (патогенна для животных и человека) и *L. Ivanovii* – 2 (патогенна для животных и реже – для человека) относится к роду *Listeria*. К этому роду относятся еще четыре вида бактерий, непатогенных для человека и животных (*grayi*, *seeligeri*, *innocua*, *welsimeri*). Представители этого рода палочки с закругленными концами иногда принимают форму кокков, вибрионов, нитей. Изменение формы листерии происходит чаще при культивировании их при температуре ниже оптимальной (ниже +30-37 °С). Располагается возбудитель одиночно или парами под углом в виде буквы V. Длина микроба – 0,5–2 мкм, ширина – 0,3–0,5 мкм. Он грамположителен, спор и капсул не образует, в молодых 6-18- часовых культурах имеет жгутики. В старых культурах утрачивает подвижность и становится грамотрицательным. У листерий сложная антигенная структура, они имеют 15 соматических и 5 жгутиковых антигенов. Возбудитель растет хорошо в аэробных условиях на обычном МПБ и МПА, но лучше на средах, приготовленных на мартеновском бульоне и на печеночных средах с добавлением 1% глюкозы и 2–3% глицерина. Имеются L-формы листерий.

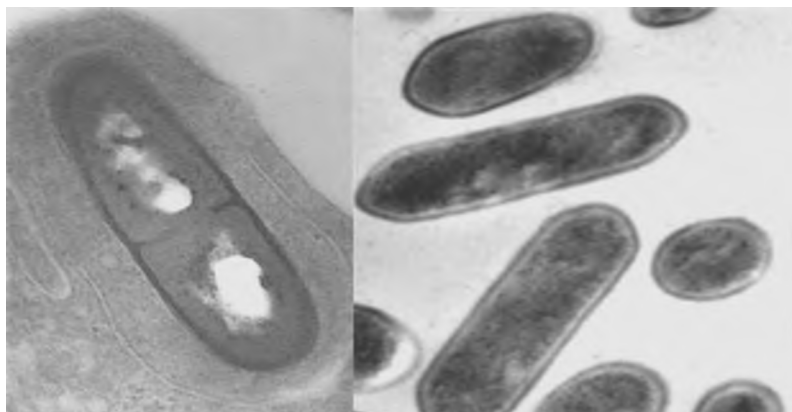


Рисунок 2 –Электронная микроскопия листерий
(<https://www.pinterest.com/pin/170503535872471994/>)

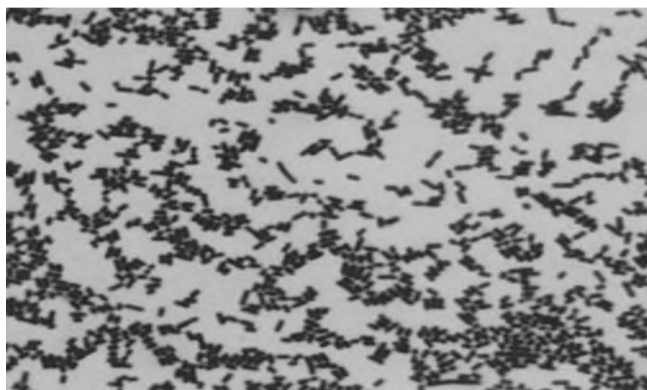
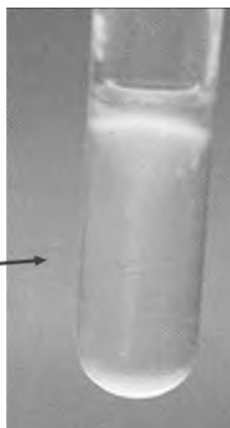


Рисунок 3 – Вид листерий в поле зрения светового микроскопа
(<https://ppt-online.org/242627>)

Обильный рост
наблюдают на печёночных
средах с глюкозой и
глицерином.

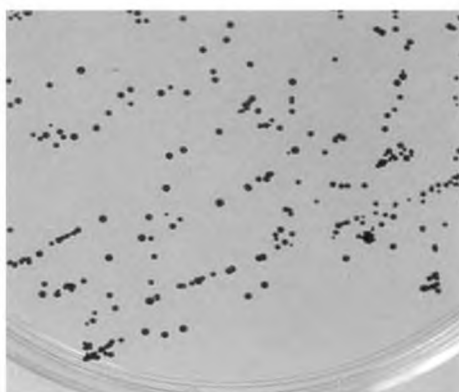
МПБ в первые сутки слегка
мутнеет.



На МПА
образуются
мелкие
прозрачные
колонии,
напоминающие
капельки
росы на
стекле.



При
добавлении к
питательной
среде
раствора
теллурита
калия,
вырастают
колонии
чёрного
цвета.



Рисунки 4-7 – Рост листерий на питательных средах
(<https://bigslide.ru/nachalnaya-shkola/51382-listerioz.html>)

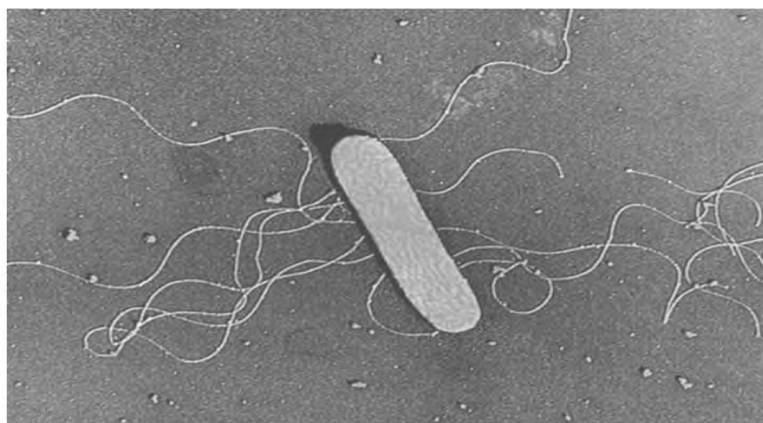


Рисунок 8– Вид листерий под электронным микроскопом (3D)
(<https://ppt-online.org/242627>)

На МПБ в первые сутки возбудитель образует легкое помутнение бульона, а в последующие 5-7 суток – слизистый осадок, который при встряхивании поднимается в виде косички.

На плотных средах (МПА) листерии растут с образованием нежных прозрачных колоний с голубоватым оттенком, диаметром 1-1,5 мм, напоминающих капельки росы (в последующем колонии мутнеют).

В организме животных листерии индуцируют образование агглютининов и комплементсвязывающих антител.

Для постановки биопробы используют белых мышей или (реже) морских свинок.

Возбудитель листериоза морфологически и по характеру роста на питательных средах очень схож с возбудителем рожи.

Устойчивость листерий значительная. Они длительно сохраняются во внешней среде: в почве – от 1 до 4 мес.; в воде – до 20 мес.; в животноводческих помещениях – около 1 мес., в овсе – до 10 мес.; в силосе и мясокостной муке – до 4 мес. При низких температурах листерии могут сохраняться длительное время не только в почве и воде, но и в силосе. Поэтому листериоз рассматривают как «сапроноз», болезнь часто называют «силосной болезнью». В объектах внешней среды листерии могут не только длительно сохраняться, но и размножаться. При этом листерии растут в широком интервале температур (от +3⁰С до +42⁰С) и рН среды (от 5,5 до 9,5), хорошо переносят охлаждение и могут размножаться при +4 +6⁰ С в почве, воде, на растениях, органах трупов. В пищевых продуктах (колбасные изделия, сыры, молоко, мясо и др.) размножаются при температуре бытового холодильника.

Возбудитель листериоза относится к первой группе устойчивости микроорганизмов (малоустойчивых) к дезинфицирующим химическим средствам.

Листерии чувствительны к тетрациклинам, пенициллинам, аминогликозидам, фторхинолонам нового поколения, устойчивы к цефалоспорином.

Эпизоотологические данные. К листериозу *восприимчивы* все виды домашних (чаще болеют овцы, реже – крупный рогатый скот, свиньи, лошади) и многие виды диких животных, грызуны, домашняя (куры, гуси, утки) и дикая птица.

Наиболее восприимчивы молодые и беременные животные. Поросята в большинстве случаев заболевают в отъемном периоде, телята – в возрасте от 2 дней до 12 месяцев, ягнята – в 3-6-месячном возрасте. Жеребята и взрослые лошади заболевают в возрасте от 3 месяцев до 5 лет. Из диких животных восприимчивы волки, лисы, белки, зайцы, норки, песцы, дикие свиньи, ежи (всего около 92 видов). Описаны случаи заболевания листериозом рыб, лягушек, кошек, обезьян и собак. Из лабораторных животных восприимчивы белые мыши, кролики и морские свинки. Восприимчив к листериозу и человек.

Источником возбудителя инфекции являются больные животные, выделяющие возбудителя во внешнюю среду с истечениями из носовой полости, половых органов (при абортах), с калом, мочой, молоком (при листериозных маститах), а также животные – листерионосители. У животных в неблагополучных по этой болезни хозяйствах листерионосительство может достигать 21%, и до 9% из них могут быть листериовыделителями.

Листериионосительство может иметь место среди здоровых животных благополучных хозяйств. Широкое листерионосительство установлено также у грызунов, диких животных (волков, песцов и др.), многих видов птиц, рыб, блох, клещей, вшей, лягушек и многих других животных, в том числе у диких свиней. Все это дает основание отнести листериоз к *природноочаговым* болезням.

Заражение происходит алиментарным путем, а также через слизистые оболочки глаз, носовой полости и поврежденную кожу. Возможно внутриутробное заражение животных.

Факторами передачи являются контаминированные возбудителем почва, вода, корма, предметы ухода и т.д.

Важную роль в передаче возбудителя принадлежит вшам и клещам, в организме которых он сохраняется соответственно до 18 и 500 дней.

Ряд исследователей, особенно зарубежных, связывает заболевание листериозом со скармливанием животным силоса. Некоторые из них называют листериоз силосной болезнью и объясняют это явление однообразным кормлением животных силосом, особенно без добавок минеральных веществ, что снижает резистентность их организма к возбудителю листериоза и способность листерий размножаться и накапливаться в силосе даже при низких температурах. Особую опасность в связи с этим представляет верхний слой силоса, сильно загрязненный и подмороженный.

Для листериоза свойственна зимне-весенняя *сезонность*. Хотя возможно возникновение болезни в любое время года, особенно у свиней.

Высокая устойчивость возбудителя во внешней среде, носительство листерий грызунами, домашними и дикими животными, птицей, клещами, вшами обуславливает *стационарность* этой болезни.



Рисунки 9-10 – Переносчики листерий

(https://mypresentation.ru/presentation/prezentaciya_na_temu_quotlisteriozquot_skachat_prezentacii_po_biologii)

(<https://ppt-online.org/242627>)



Рисунок – 11 – Схема эпизоотического процесса при листериозе
 (<https://ppt-online.org/242627>)

Листериоз регистрируется в виде *спорадических* случаев и *энзоотии*, реже в виде *эпизоотии*. *Летальность* достигает 40% – 80%.

Патогенез. Попадание возбудителя в организм животных происходит через слизистые оболочки носовой и ротовой полостей, конъюнктиву, пищеварительный тракт, дыхательные пути и поврежденную кожу. Из мест первичного проникновения возбудитель лимфогенным и гематогенным путем разносится по всему организму. Если вирулентность возбудителя невысокая, а резистентность макроорганизма, наоборот, значительная, листерии фагоцитируются макрофагами, лимфатических узлов, печени, селезенки, почек, костного мозга. В этих случаях интенсивность инфекционного процесса невысокая и имеет место листерионосительство. Если же вирулентность листерии высокая, а резистентность организма низкая, имеет место воздействие различных стрессовых факторов внешней среды, болезнь протекает в виде сепсиса. В этих случаях возбудитель через гематоэнцефалический барьер или периневральным путем проникает в центральную нервную систему и вызывает развитие гнойного энцефаломиелимита и менингита.

У беременных животных возбудитель проникает в плод, вызывает его сепсис, смерть и аборт.

Важную роль в патогенезе листериоза играют экзо- и эндотоксины. Под их действием повышается проницаемость кровеносных сосудов, возникают дистрофия и воспалительные процессы в тканях и различных органах, увеличивается количество моноцитов.

Увеличение количества моноцитов в крови больных листериозом животных рассматривается как результат активизации фагоцитов или наличием у возбудителя листериоза вещества, стимулирующего моноцитоз.

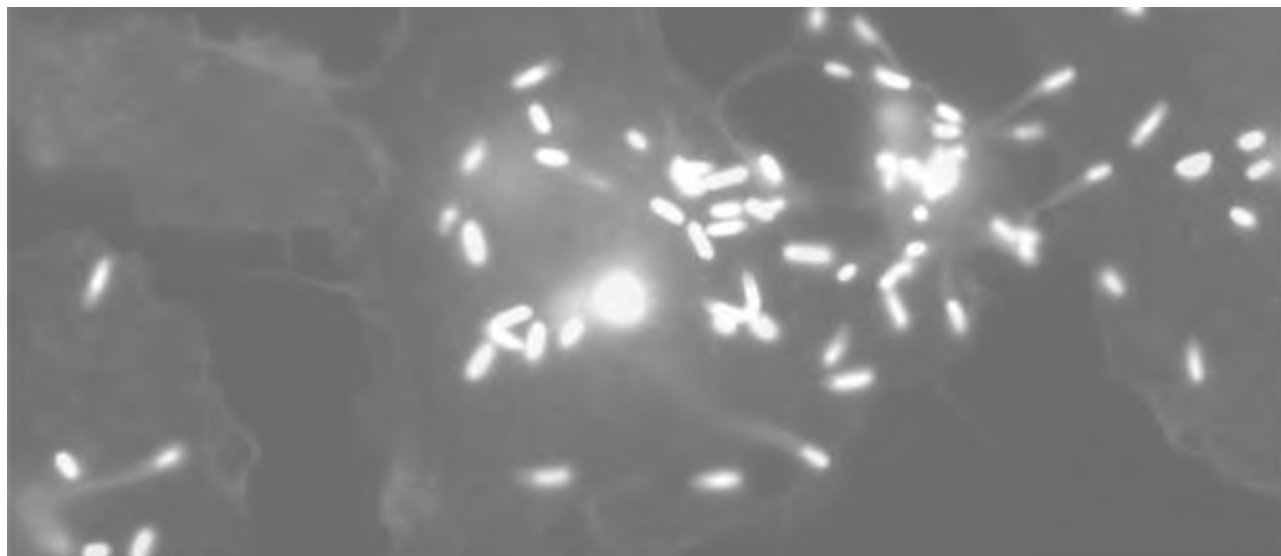


Рисунок 12 – Листерии в макрофагах
(<http://reasonfelt.live/camp-test-listerien/>)

По современным представлениям, листерии в организме животных размножаются преимущественно внутри макрофагов. Последним (свободным и фиксированным) отводится важная роль в распространении и сохранении листерий в организме. Незавершенность фагоцитоза при листериозе, продолжительное сохранение фагоцитов с листериями в организме животных (до 2 лет) обуславливает длительное листерионосительство.

Течение и симптомы болезни. У свиней инкубационный период продолжается от 7 до 30 дней. Болезнь протекает остро (у поросят-отъемышей), подостро и хронически (у других половозрастных групп свиней).

Различают нервную и септическую формы болезни. Наиболее типично болезнь протекает у поросят (чаще заболевают отъемыши). У этой возрастной группы листериоз протекает преимущественно остро, как правило, с признаками поражения центральной нервной системы.

При *нервной форме* в начале болезни незначительно повышается температура тела, затем происходит ее снижение до нормы. Болезнь проявляется нервным синдромом: расстройством координации движений, своеобразной ходульной походкой, манежными движениями, мышечной дрожью, приступами судорог, возбуждением. К концу болезни у многих поросят развивается полупаралич задних, а в дальнейшем и передних конечностей. При нервной форме болезнь длится до 3 дней. Летальность – до 40%.

При *септической форме* у поросят повышается температура тела, наблюдается угнетение, слабость, отказ от корма, посинение кожи в области ушей и живота, затрудненное дыхание, реже – признаки энтерита. Летальность при септической форме может достигать 60%. Часто у поросят отмечают симптомы септицемии. В этих случаях летальность достигает 100%.

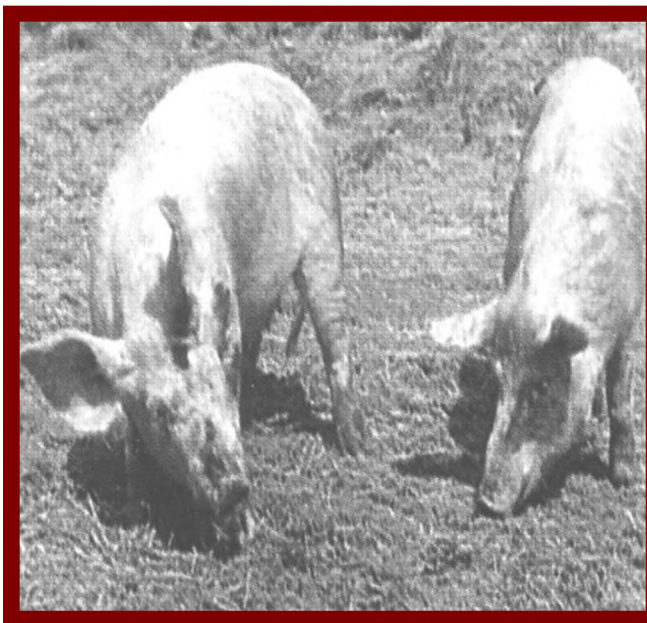


Рисунок 13 – Клинические признаки листериоза у свиней

(<https://ppt-online.org/242627>)



Рисунок 14 – Абортированные плоды

У взрослых свиней заболевание протекает подостро и хронически, нервные явления бывают редко. Отмечают субнормальную температуру тела, исхудание, анемию, снижение аппетита, нарушения координации движений, вялость, мышечную дрожь.

В ряде случаев обнаруживают множественные абсцессы в различных частях тела. У свиноматок отмечают маститы и аборты.

Для листериоза свиней характерен моноцитоз. Количество моноцитов в крови свиноматок увеличивается до 20-50%, ниже этот показатель у других возрастных групп свиней.

У крупного рогатого скота листериоз протекает в нервной и генитальной формах. Инкубационный период – от 7 до 30 дней.

При нервной форме заболевание начинается угнетением, вялостью, снижением аппетита. Через 3-7 дней появляются признаки поражения центральной нервной системы: парезы нижней челюсти, ушей и губ, глаза выпучены, движения не координированы, наблюдается запрокидывание головы на спину, слюнотечение.

У отдельных животных можно наблюдать приступы буйства, тяжелые нервные расстройства, напоминающие бешенство, однако, без агрессивности. Во время приступов отмечают судорожные сокращения шейных и затылочных мышц, иногда нарушается зрение, при этом развивается конъюнктивит.

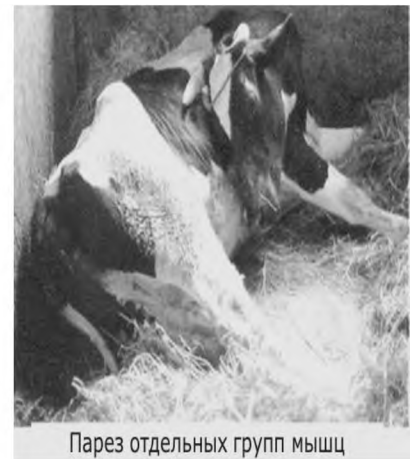
Температура тела животных в норме или повышена, могут развиваться стоматиты, сыпь на коже. Больные животные погибают в состоянии прострации в течение 3-4 дней с момента появления признаков поражения ЦНС.



Парез нижней челюсти



Некоординируемые движения



Парез отдельных групп мышц

Рисунки 15–17 – Клинические признаки листериоза у крупного рогатого скота при нервной форме

(<https://svoimi-rykami.ru/y chastok/borba-s-vreditelyami-i-boleznyami/listerioz-u-zhivotnyx.html>)



Рисунки 18–19 – Клинические признаки листериоза у крупного рогатого скота при генитальной форме

(<https://svoimi-rykami.ru/y chastok/borba-s-vreditelyami-i-boleznyami/listerioz-u-zhivotnyx.html>)

Генитальная форма болезни у крупного рогатого скота протекает с поражением половой системы (аборт, задержание последа, эндометриты, маститы).

У *телят* листериоз протекает в виде септицемии, в отдельных случаях сопровождается поражением ЦНС. Отмечают угнетение, круговые движения, судороги, конъюнктивиты и повышение температура тела.

Течение и симптомы у *овец и коз* напоминают таковые у крупного рогатого скота. Чаще регистрируется *нервная форма* болезни. Начальный ее период характеризуется необычным поведением животного, понижением аппетита, сонливостью, связанностью движений, конъюнктивитами и ринитами. Через 1-2 дня с момента появления первых клинических признаков обнаруживаются признаки поражения ЦНС. У овец отмечают: круговые движения, потерю равновесия, оглумоподобное состояние, искривление шеи, признаки судорог,

расширение зрачков, потерю зрения. Температура тела в пределах нормы или ниже нормы. Овцы могут стоять, упершись в стенку. У некоторых животных отмечается неудержимое стремление вперед, чрезмерная пугливость. Часто обнаруживают горизонтальное покачивание головой, дрожание глазного яблока (нистагм) и ушей. Иногда наблюдают односторонний паралич уха, отвисание ушей. Исход, как правило, летальный. Гибель овец происходит в период от 1 до 14 дней.



Нервные симптомы у овцы, оглуомоподобное состояние.



Нервные симптомы у овцы, судороги.



**Рисунки 20-25 – Клинические признаки листериоза у овец
(искривление шеи)**

(<https://svoimi-rykami.ru/y chastok/borba-s-vreditel'nyami-i-boleznyami/listerioz-u-zhivotnyx.html>)

При *генитальной форме* листериоза у овец возможны массовые аборты, поражения вымени (маститы). У ягнят чаще регистрируют *септическую форму* (поносы, лихорадка).

У птиц листериоз протекает в виде септицемии. Заболевают цыплята и молодые куры. При этом они теряют аппетит, становятся малоподвижными, наблюдаются конъюнктивиты, дыхание учащается, наступает прогрессирующая слабость, судороги, параличи. Смерть наступает обычно через 3-5 дней.

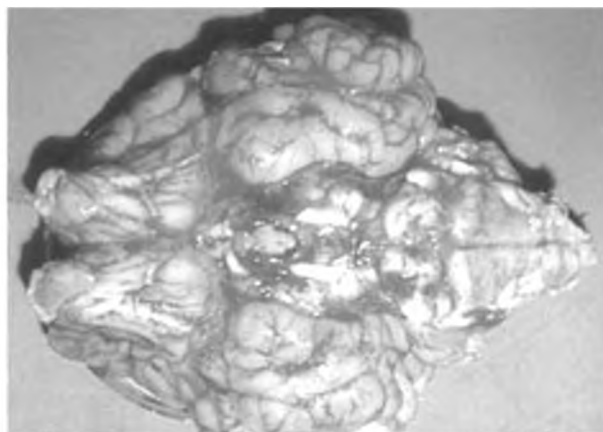
У лошадей листериоз протекает, как правило, в виде энцефалита. Отмечается неудержимое стремление вперед, беспокойство, парезы конечностей, конъюнктивит, желтушность. Выздоровление наступает очень редко.

У собак, как и у лошадей, развиваются явления энцефалита, снижается зрение.

Патологоанатомические изменения: кровоизлияния под эпи- и эндокардом, в плевре, слизистой оболочке трахеи и бронхов; увеличение селезенки и милиарные некрозы в ней; серозное воспаление брыжеечных лимфоузлов; зернистая дистрофия печени и милиарные некрозы в ней; острый катаральный гастроэнтерит; острый трахеит и бронхит; острая венозная гиперемия и отек легких. При гистоисследовании устанавливают гнойный энцефаломиелит (стволовая часть головного и шейная часть спинного мозга).



Множественные некротические очаги в печени КРС при листериозе



Инъекция сосудов и отек мозга, кровоизлияния в мозговой ткани.

Рисунки 26-27 – Патологоанатомические изменения при листериозе

(<https://ppt-online.org/242627>)

Диагностика листериоза базируется:

1) с учетом эпизоотологических данных (диагностируется в Республике Беларусь), клинических признаков, патологоанатомических и патологогистологических изменений, а также результатов лабораторных исследований.

Эпизоотологические данные: учитывают восприимчивость к листериозу многих видов домашних и диких животных, болеет также и человек, учитывают природную очаговость, стационарность, преимущественную спорадичность или энзоотичность болезни, в том числе и в сельскохозяйственных организациях Республики Беларусь, высокую летальность (до 40% – 80%) среди молодняка.

При постановке предположительного диагноза следует учитывать, что болеют преимущественно молодые животные, у которых заболевание может

протекать с признаками нервного синдрома и септицемии. У взрослых животных обнаруживают снижение аппетита, приводящее к исхуданию, нарушение координации движений, анемию, кашель, абсцессы в различных органах и тканях, у беременных животных — маститы и аборты.

Также учитывают специфические патологоанатомические изменения (сепсис с милиарными некрозами в печени и селезенке), результаты гистологического исследования головного мозга (гнойный энцефаломиелит в стволовой части головного и шейной части спинного мозга).

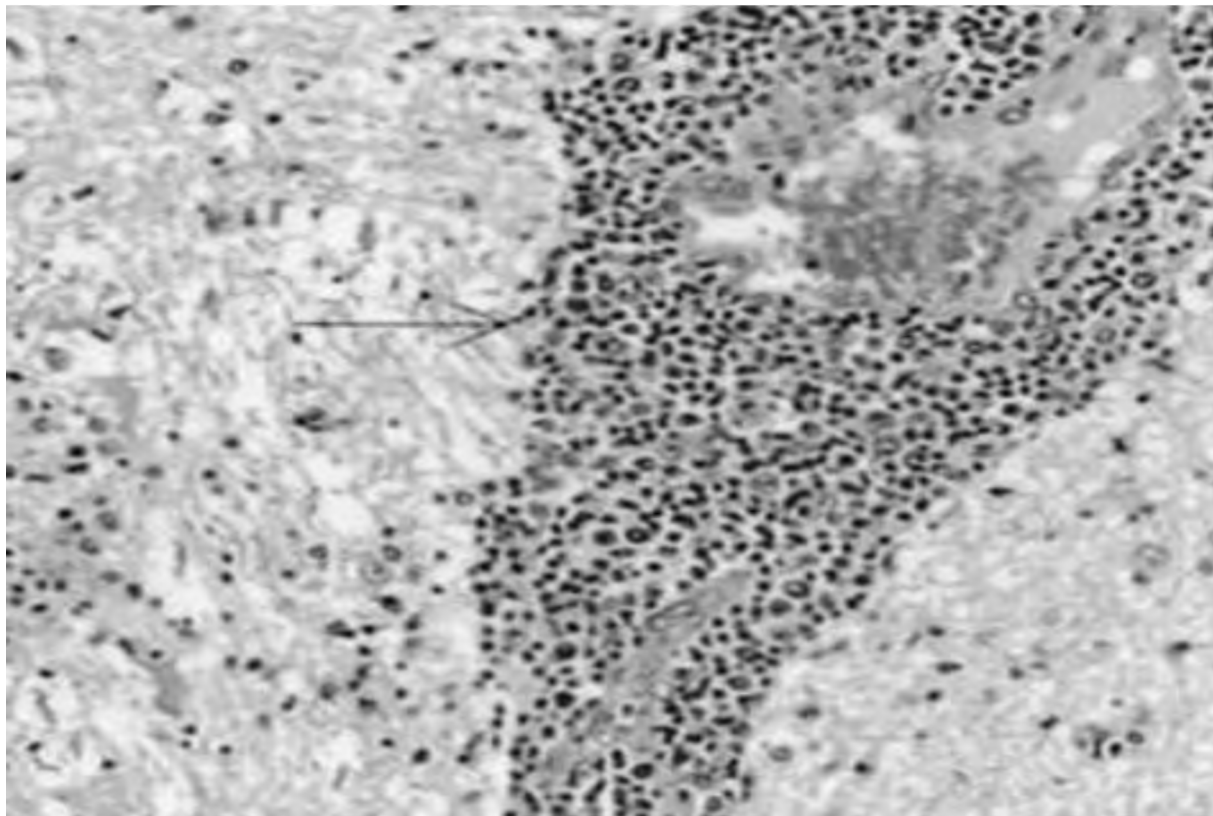


Рисунок28 – Гнойный энцефалит при листериозе

(https://mypresentation.ru/presentation/prezentaciya_na_temu_quotlisteriozquot__skachat_prezentacii_po_biologii)

Решающее значение в диагностике листериоза принадлежит бактериологическому исследованию – выделению культуры листерии. Бактериологическая диагностика включает микроскопическое исследование исходного материала, посевы на питательные среды, идентификацию выделенных культур по культурально–биохимическим, тинкториальным и серологическим свойствам, постановку биологической пробы на лабораторных животных.

Отбор и пересылка материала для исследования

Для бактериологического исследования в лабораторию направляют трупы мелких животных или голову (головной мозг), паренхиматозные органы (часть печени, селезенку, почку, пораженные участки легких), абортированный плод или его оболочки.

Для прижизненной диагностики в лабораторию направляют истечения из половых органов абортировавших самок, молоко из пораженных долей вымени при наличии мастита — для бактериологического исследования.

От павших и вынужденно убитых животных в диагностическую ветеринарную лабораторию направляют печень, селезенку, лимфоузлы, головной и продолговатый мозг, а также органы, имеющие изменения.

Гистологическое исследование.

Материал для исследования в свежем или консервированном (в 30%-ном водном растворе глицерина) виде упаковывают в полиэтиленовые пакеты, помещают в ящик или контейнер, опечатывают и вместе с сопроводительным документом направляют в лабораторию. Предпочтительно материал направлять в замороженном виде.

В сопроводительном документе указывают наименование и адрес отправителя, опись проб патологического материала, эпизоотологические данные.

Бактериологическая диагностика

Бактериологическая диагностика включает микроскопическое исследование исходного материала, посеvy на питательные среды, идентификацию выделенных культур по культуральным, биохимическим, тинкториальным и серологическим свойствам, а также постановку биологической пробы на лабораторных животных.

Учитывая возможность существования нетипичных вариантов листерий, бактериологическое подтверждение считается обязательным для определения наличия возбудителя и распространения листериозной инфекции.

Микроскопическое исследование.

Микроскопическому исследованию подвергают мазки-отпечатки из головного мозга, внутренних органов и тканей. При приготовлении мазков-отпечатков чистым предметным стеклом 3-4 раза прикасаются к поверхности среза органа. Мазки готовят непосредственно из патологического материала, а также после подращивания его проб при 37°C в течение 4-6 часов.

Мазки окрашивают по Граму, а также методами флюоресцирующих антител.

Возбудитель листериоза – *Listeria monocytogenes* – грамположительная подвижная неспорообразующая полиморфная, чаще палочковидная бактерия длиной 0,5-2,0 мкм. Располагается возбудитель одиночно или парами под углом в виде буквы V.

Бактериологическое исследование.

Из органов и обязательно головного мозга проводят обильные множественные посеvy или предварительно готовят суспензию из головного мозга и паренхиматозных органов на физиологическом растворе в соотношении 1:5 и из нее делают посеvy. Для культивирования листерий используют обычные среды с добавлением 1% глюкозы и 2-3% глицерина или печеночный агар и бульон (рН среды 7,2-7,4), а также кровяной агар и элективные среды (приложение 2).

В качестве дополнительного метода при отрицательном результате первичного посева рекомендуется часть исследуемого материала поместить в

холодильник и хранить в течение 30 дней для проведения повторных исследований через каждые 10 дней. При хранении в холодильнике при +4°C патологического материала, помещенного в глицерин, происходит размножение и накопление листерий. Рекомендуется хранение суспензии исследуемого материала в холодильнике в физиологическом растворе или мясопептонном бульоне (МПБ) с добавлением полимиксина 15-25 ЕД/мл для задержки роста контаминантов.

При исследовании абортированных плодов посевы делают из содержимого желудка и внутренних органов.

При исследовании истечений из половых органов, молока, а также из силоса (приложение 3) посевы проводят на печеночный агар в чашках и МПБ с 10% хлорида натрия, из которого потом делают пересевы на твердые среды.

Посевы инкубируют в термостате при 37°C с ежедневным просмотром в первые 3-4 дня. При отсутствии роста наблюдение за посевами проводят в течение двух недель.

Характерным для возбудителя листериоза является легкое помутнение бульона и появление мелких росинчатых колоний на агаре, наличие β-гемолиза на кровяном агаре. Колонии листерий в проходящем свете имеют голубую окраску с зеленоватым оттенком и мелкозернистую структуру.

Из выделенной культуры делают мазки, окрашивая их по Граму, а также для люминесцентной микроскопии с применением прямого и непрямого метода флюоресцирующих антител.

При получении смешанной культуры ее очищают общепринятыми методами (отсев отдельных характерных колоний, дробный рассев на 2%-ный мясопептонный агар (МПА) в чашках), а также путем заражения молодых мышей.

Биологическое исследование

Биологическое исследование проводят на 2-3 белых мышах массой 14-16 г. Животных заражают под кожу или внутрибрюшинно суспензией из головного мозга и внутренних органов или культурой в дозе 0,3-0,5 мл. При положительной биопробе животные погибают через 2-6 суток после заражения. При вскрытии павших мышей отмечают множественные некротические очажки в печени, селезенке, почках. В отдельных случаях этих поражений может не быть. При наблюдении более 10 дней рекомендуется дополнительно делать посев из головного мозга. Очень чувствительны к подкожному заражению 5-6-дневные мыши-сосуны, которые гибнут через 18-36 часов.

Для повышения эффективности биопробы белым мышам за 3-4 часа до заражения суспензией патологического материала или культурой листерии инъецируют внутримышечно кортизон в дозе 5 мг.

К заражению листериями восприимчивы и кролики. Показательно внутривенное заражение кроликов культурой листерии в дозе 0,5-1 млрд микробных тел (по стандарту мутности), при этом количество моноцитов в крови зараженных животных увеличивается в несколько раз.

Из внутренних органов (печень, селезенка, почки, сердце) павших животных делают мазки-отпечатки и высевы на питательные среды.

Срок наблюдения за подопытными животными – 14 суток.

Идентификация возбудителя

Определение подвижности проводят методом висячей или раздавленной капли, а также посевом методом укола в полужидкий МПА. На подвижность исследуют 6-18-часовую бульонную культуру, выращенную при комнатной температуре (22°C). Листерии, выращенные при данной температуре, обладают активной подвижностью.

Для определения ферментативных свойств чистую бульонную культуру пересевают на пестрый ряд (глюкоза, мальтоза, маннит, салицин, трегалоза, дульцит, инулин, раффиноза), который выдерживают при 37°C в течение 10 дней. Листерии разлагают с образованием кислоты (без газа) глюкозу, мальтозу, трегалозу, салицин и не разлагают дульцит, инулин, раффинозу, маннит.

Проба на каталазу. К суточной бульонной культуре добавляют равный объем свежеприготовленной 5%-ной перекиси водорода, при исследовании агаровой культуры в пробирку вносят несколько капель перекиси водорода. При наличии фермента каталазы перекись водорода разлагается с образованием пузырьков газа (пена).

Способность выделять фермент каталазу является характерным признаком листерии при дифференциации от возбудителя рожи свиней.

Определение чувствительности листерии к бактериофагам.

Диагностический набор лиофилизированных листериозных бактериофагов включает два монофага – L2A и L4A. Набор бактериофагов позволяет идентифицировать более 85% культур листерии, однако могут быть выделены штаммы листерии, которые не лизируются данными фагами.

Перед применением содержимое ампул растворяют бульоном Мартена или МПБ в объеме, указанном на этикетке ампулы, и переносят в пробирки с соблюдением правил асептики. Растворенные бактериофаги не пригодны к использованию при наличии осадка, хлопьев или помутнения.

Неиспользованные в день исследования растворенные бактериофаги могут быть применены в дальнейшей работе в течение 5-10 суток при хранении в холодильнике (+2°C–+6°C) после предварительной проверки на отсутствие бактериального загрязнения.

Ампулы, пробирки и пипетки из-под бактериофага, а также выбракованный бактериофаг обезвреживают кипячением (не менее 30 минут).

Исследование проводят в бактериологических чашках, содержащих 2%-ный агар Мартена или МПА с глюкозой (0,5%), разлитый накануне или в день исследования. Перед нанесением испытуемой культуры поверхность агара необходимо подсушить. При подсушивании чашки открывают и переворачивают вверх дном. Агар, разлитый накануне, подсушивают 20-30 минут при комнатной температуре, а разлитый в день исследования – 1-1,5 часа при 37°C.

Для идентификации используют 16-18-часовую агаровую культуру, выращенную при 37°C. Ее засевают в бульон Мартена или МПБ с глюкозой (0,5%). Количество посевного материала должно быть таким, чтобы после встряхивания в пробирке с бульоном образовалась легкая опалесценция. Культуры подращивают в термостате (37°C) 4 часа. После этого бактериальную

взвесь наносят газоном на поверхность подсушенного 2%-ного агара в бактериологических чашках. Каждую культуру подвергают не менее чем 2–3 параллельным исследованиям.

В одной чашке можно одновременно проводить испытания 2-х культур. Для этого поверхность агара делят пополам и на каждую из половин наносят по 0,1 мл исследуемых культур, которые распределяют равномерно отдельным шпателем по отмеченному участку агаровой пластинки. Чашки с засеянными культурами выдерживают в термостате (37°C) 1-1,5 часа при слегка приоткрытой крышке.

Для исследования действия бактериофага на культуру листерий с целью ее идентификации на газон испытуемой культуры тонко оттянутой пастеровской пипеткой или бактериологической петлей наносят по одной капле бактериофагов и отдельно каплю стерильного бульона (контроль).

Место нанесения каждой капли отмечают карандашом по стеклу с наружной стороны чашки. Расстояние между наносимыми каплями должно быть не менее одного сантиметра. Чашки после нанесения фага и бульона оставляют при комнатной температуре (22-23°C) в затемненном месте.

Учет результатов проводят через 16-24 часа. Культуру признают листериями, если в месте нанесения одного из бактериофагов образуется прозрачная зона лизиса или полусливной лизис (в виде губки). Допускается наличие единичных колоний или сплошного нежного роста вторичной культуры в зоне лизиса при интенсивном бактериальном росте на остальной поверхности агара. В месте нанесения капли стерильного бульона зона лизиса отсутствует.

Если лизис культуры выражен нечетко (едва заметно место нанесения капли бактериофага) или полностью отсутствует литическая реакция, культуры идентифицируют.

Методика постановки реакции нарастания титрафага для обнаружения возбудителя листериоза в организме животных, кормах и объектах внешней среды.

Реакция нарастания титра фага (РНФ) – быстрый специфический метод обнаружения листерий, обеспечивающий выявление возбудителя в исследуемом материале без выделения его культуры.

РНФ основана на свойстве так называемого индикаторного бактериофага строго специфично размножаться только в клетках гомологичного микроба. Размножение бактериофага сопровождается увеличением количества его частиц и повышением титра.

РНФ рекомендуется использовать в качестве основного метода для обнаружения листерий в кормах и объектах внешней среды, а также при диагностике листериоза.

Для исследования используют органы животных и людей, корма и объекты внешней среды.

В реакции применяют листериозные бактериофаги L2A и L4A. Штаммы листерий I (9-127) и II (9-72) серогруппы. Питательные среды, содержащие 0,5% глюкозы: мясопептонный бульон, 1,5%-ный и 0,7%-ный мясопептонный агар.

При постановке РНФ с пробами внутренних органов, кормов и почвы отвешивают 3 г исследуемого материала, измельчают, помещают в колбу емкостью 50-100 мл и добавляют 30 мл МПБ. Смесь в течение 5-10 минут встряхивают, затем 9 мл переносят в опытную бактериологическую пробирку №1.

Для исследования воды ее наливают в количестве 8 мл в опытную пробирку №1, в эту же пробирку добавляют 1 мл МПБ.

Бактериофаги используют в рабочем разведении (10000 фаговых корпускул в мл). Для этого их растворяют МПБ до исходного объема, указанного на этикетке ампулы, а затем на МПБ отдельными пипетками делают пять последовательных десятикратных разведений (в последнем разведении титр бактериофага составит $1 \cdot 10^4$).

Смесь фагов готовят путем смешивания равных объемов фага L2A и L4A в рабочем разведении.

Для контроля титра бактериофага, который ставят один на группу анализов, проводимых одновременно, в контроль-пробирку №2 вносят 9 мл МПБ.

В пробирки № 1 и 2 вносят по 1 мл смеси фагов в рабочем разведении и выдерживают их в течение 16-24 часов при комнатной температуре, после чего в пробирки добавляют по 1 мл хлороформа. Содержимое тщательно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30-40 минут. Хлороформ оседает на дно, надосадочную жидкость подвергают дальнейшим исследованиям.

При использовании смеси фагов из опытной и контрольной пробирок (№ 1 и 2) берут по 0,2 мл и переносят по 0,1 мл в две пробирки, содержащие по 0,9 мл МПБ (один ряд для обнаружения фага L2A, а другой –L4A), а затем из каждой пробирки готовят еще одно десятикратное разведение.

Готовят 1-миллиардную взвесь штаммов I и II серогруппы по стандарту мутности путем разведения суточной агаровой культуры в физиологическом растворе. Во все пробирки с разведенным материалом добавляют по 0,1 мл взвеси штамма I серогруппы для выявления фага L2A или штамма II серогруппы для обнаружения фага L4A.

Содержимое пробирок засевают методом агаровых слоев по Грациа. Для чего накануне дня исследования в бактериологические чашки Петри разливают по 10 мл 1,5%-ного МПА; МПА можно разлить в чашки Петри и в день исследования, но в этом случае поверхность агара необходимо предварительно выдержать в течение 40-50 минут при 37°C или 2 часов при комнатной температуре. Для второго слоя используют расплавленный до 48-50°C 0,7%-ный МПА, который следует использовать в течение часа, так как позже он приобретает гелеобразную консистенцию и не пригоден для исследования.

Затем в пробирки пипеткой вносят по 2,5-3 мл расплавленного и охлажденного до 48-50°C 0,7%-ного МПА. Содержимое быстро и тщательно перемешивают и выливают в чашку Петри. Смесь легким покачиванием чашки равномерно распределяют вторым слоем на поверхности 1,5%-ного МПА. Чашки оставляют на ровном месте на 20-30 минут (до застывания 0,7%-ного МПА), затем переворачивают и инкубируют при комнатной температуре.

Учет реакции проводят через 16-24 часа инкубирования посевов.

В опытных пробах и контроле титра фага подсчитывают число негативных колоний во всех чашках. Негативные колонии – округлые, хорошо заметные на фоне бактериального роста, прозрачные участки, образующиеся в результате лизиса бактерий.

При учете результатов сравнивают количество негативных колоний на чашках соответствующих разведений.

Результаты реакции оценивают по увеличению титра бактериофага (количества негативных колоний):

- увеличение количества негативных колоний в опытной пробе по отношению к контролю в 5 и более раз (хотя бы по одному из разведений) оценивается как положительный результат, менее чем в 5 раз — отрицательный;

- сплошной лизис или лизис с островками оценивается как положительный результат.

При получении положительного результата РНФ дают заключение, что в исследуемом материале (пробе) обнаружен возбудитель листериоза.

При получении отрицательного результата РНФ для окончательной постановки диагноза необходимо провести бактериологическое исследование материала.

Метод флюоресцирующих антител.

Люминесцентно-серологическое исследование проводят с использованием прямого (ПМФА) и непрямого методов флюоресцирующих антител (НМФА). С помощью этих методов можно идентифицировать возбудителя в культурах, обнаружить листерий в органах и тканях, а также определить их серогрупповую принадлежность.

Окраска по прямому методу флюоресцирующих антител.

Для проведения исследования необходимо иметь:

- флюоресцирующие сыворотки против листерий серовариантов 1, 4а, 4в;
- нефлюоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель;
- глицерин с фосфатным буфером рН 8,0 (1 часть глицерина нейтрального и 9 частей фосфатного буфера);
- физиологический раствор хлорида натрия с фосфатным буфером рН 7,4, приготовленный следующим образом: на аналитических весах отвешивают 9,078 г химически чистого однозамещенного фосфата калия, помещают его в мерную колбу и доводят дистиллированной водой до 1 л; затем отвешивают 11,876 г двузамещенного фосфата натрия и в другой мерной колбе доводят дистиллированной водой до объема 1 л. При использовании двузамещенного фосфата натрия, содержащего 12 молекул воды, для получения 1 л раствора берут навеску 23,752 г, а безводного препарата – 9,476 г. Для получения буфера с рН 7,4 смешивают 4 части раствора двузамещенного фосфата натрия и 1 часть раствора однозамещенного фосфата калия. Полученный буфер добавляют к физиологическому раствору (8,750 г хлорида натрия на 1 л дистиллированной воды) в соотношении 1:50. Если при смешении растворов фосфатов 4:1 не получают нужный рН, то, изменяя соотношение растворов, достигают необходимой величины рН (при повышенной кислотности добавляют

двузамещенный фосфат натрия, а при щелочном рН добавляют однозамещенный фосфат калия). Если при добавлении буфера в соотношении 1:50 к физиологическому раствору, последний будет иметь рН ниже 7,4, то, увеличением количества добавляемого буфера добиваются нужной реакции физиологического раствора;

- спирт этиловый 96%-ный;
- покровные стекла толщиной не более 0,2 мм;
- предметные стекла, нелюминесцирующие и хорошо обезжиренные.

Перед применением флюоресцирующие сыворотки разводят дистиллированной водой до рабочего разведения. Сыворотки в рабочем разведении могут храниться при температуре 2-4°C в течение 2-х недель.

Определение возбудителя в культуре. Для исследования используют 18-24-часовые чистые или смешанные культуры, из которых готовят по два мазка на отдельных предметных стеклах для обработки листериозными люминесцирующими сыворотками.

Густые мазки для исследования не пригодны, так как микробы в них могут светиться менее интенсивно. Мазки готовят средней густоты (несколько десятков микробов в поле зрения микроскопа) размером не более 1 см².

Место нанесения культуры очерчивают карандашом по стеклу с обратной стороны, подсушивают мазки на воздухе, маркируют и фиксируют этиловым спиртом в течение 15 минут; мазки для фиксации погружают в вертикальном положении в стеклянный сосуд со спиртом. Каждое стекло отделяют металлической проволокой или стеклянной палочкой.

После фиксации и испарения спирта мазки ополаскивают физиологическим раствором хлорида натрия с фосфатным буфером рН – 7,4.

На слегка подсушенный мазок наносят 1-2 капли соответствующей люминесцирующей сыворотки в рабочем разведении. Мазки с сывороткой помещают во влажную камеру (в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой на дне) и выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 30 минут. Затем сыворотку отмывают, погружая мазки в кювету, содержащую физиологический раствор с фосфатным буфером рН – 7,4 на 20 минут. Раствор в кювете периодически помешивают и меняют через 10 минут.

Отмытые мазки ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Для быстроты высушивания можно использовать настольный вентилятор.

На поверхность мазка наносят небольшую каплю глицерина с буфером рН 8,0, накрывают покровным стеклом, излишек глицерина удаляют.

На покровное стекло наносят нефлюоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель и производят люминесцентную микроскопию. Люминесцентный микроскоп рекомендуется устанавливать в хорошо вентилируемой комнате с частично затемненным окном или в затемненной части комнаты.

Диагностическая оценка интенсивности свечения возбудителя листериоза.

Степень свечения оценивается по следующим показателям:

++++ – ярко выраженное золотисто-зеленоватое свечение, четко заметны морфологические особенности бактерий, хорошо видна темная центральная зона клетки;

+++ – яркое свечение, хорошо заметны цвет и морфологические особенности клетки;

++ – выраженное свечение, но меньшей интенсивности;

+ – заметное, но слабое свечение, цвет неясен, морфологические особенности различаются плохо;

- – свечение не обнаруживается.

Свечение бактериальных клеток на 4 и 3 креста расценивается как положительный результат.

Обнаружение возбудителя в патологическом материале.

Материал для исследования должен быть свежим.

Для люминесцентной микроскопии из паренхиматозных органов готовят суспензию на физиологическом растворе в соотношении 1:5. После осаждения крупных частиц в суспензии из разных участков ее поверхности готовят по 2-3 мазка.

Мазки из головного и костного мозга готовят отдельно и после фиксации спиртом дополнительно обезжиривают ацетоном в течение 5 минут, меняя его 2-3 раза.

При обнаружении возбудителя с типичной морфологией, специфическим свечением и интенсивностью не ниже чем на три креста, ставят положительный люминесцентно-серологический диагноз.

Окраска по непрямому методу флюоресцирующих антител.

Для постановки реакции необходимо иметь:

– материал для исследований (антиген) в виде микробной бульонной или агаровой культуры (500 млн микробных тел/мл), выращенной при 22-37°C в течение 16 часов или мазков-отпечатков из органов и тканей павшего (убитого) животного;

– гипериммунные кроличьи сыворотки: листериозные – серо-групповые и поливалентную;

– флюоресцирующую сыворотку против глобулинов кролика;

– метиловый или этиловый спирт 96%-ный;

– глицерин на забуференном физиологическом растворе 1:10 (рН 7,2-7,4);

– дистиллированную воду;

– нефлюоресцирующее иммерсионное масло;

– тонкие, обезжиренные предметные стекла.

Для приготовления рабочего разведения сухую флюоресцирующую сыворотку против глобулинов кролика растворяют в указанном на этикетке ампулы объеме дистиллированной воды. После растворения сыворотку центрифугируют при 3000-6000 об/мин в течение 30 минут для удаления крупных конгломератов.

Разведенную сыворотку хранят в пробирке с резиновой пробкой или в запаянной ампуле при температуре +4°C в течение 2 недель. Перед нанесением на препарат флюоресцирующую сыворотку необходимо развести физиологическим раствором (рН 7,2-7,4) в соответствии с указанным на

этикетке ампулы рабочим разведением в нужном для работы объеме. Разведенная до рабочего разведения сыворотка используется в тот же день.

Методика приготовления препаратов для люминесцентной микроскопии:

– мазок из бактериальной культуры или тонкий мазок-отпечаток из органов высушивают на воздухе в течение 1 минуты и фиксируют этиловым или метиловым спиртом также в течение 1 минуты;

– наносят каплю гипериммунной листериозной кроличьей сыворотки, покрывают (разрезанным на 4 части 1x1 см) покровным стеклом на 5 минут при температуре 20°C. Затем покровное стекло снимают и в течение 20-30 секунд препарат промывают дистиллированной водой. После этого препарат высушивают в сушильном шкафу при температуре 60-70°C в течение 2 минут;

– наносят одну каплю флюоресцирующей сыворотки против глобулинов кролика, покрывают покровным стеклом (разрезанным на 4 части 1x1 см) – экспозиция 5 минут при температуре 20°C. Снимают покровное стекло и под сильной струей водопроводной воды промывают препарат 5-10 минут;

– препарат высушивают в сушильном шкафу при температуре 60-70°C в течение 2 минут.

Затем на препарат наносят каплю жидкости (одна часть нейтрального глицерина и 9 частей физиологического раствора, забуференного фосфатным буфером рН 7,2-7,4), накрывают покровным стеклом, на которое наносят одну каплю нефлюоресцирующего иммерсионного масла, и исследуют под люминесцентным микроскопом (объектив 90, окуляр 5, 7, 10) с системой светофильтров (ФС-1-4, БС-8-2).

Для обнаружения листерий в органах и тканях мазки обрабатывают поливалентной сывороткой, а для серологической типизации листерий готовят несколько мазков, половину которых обрабатывают сывороткой первой серогруппы, а другую половину – сывороткой второй серогруппы.

При исследовании материала необходимо ставить контроли с нормальной сывороткой, проверенной на отсутствие листериозных антител, и с заведомо известной листериозной культурой.

Обязательным контролем следует считать препарат с листериями, обработанный только люминесцирующей антивидовой сывороткой.

Клетки листерий, обработанные гомологичной листериозной сывороткой, обладают свечением, в то время как бактерии, обработанные гетерологичной листериозной сывороткой, не светятся при исследовании в люминесцентном микроскопе. Бактерии других видов, обработанные листериозной сывороткой, также не светятся.

При использовании метода флюоресцирующих антител для контрастирования фона препарат можно одновременно с флюоресцирующей сывороткой окрашивать бычьим альбумином, меченным родамином. Совместное применение флюоресцирующей сыворотки и альбумина значительно повышает чувствительность и надежность иммунофлюоресцентного анализа – меченый альбумин снижает неспецифическое свечение фона, придавая посторонним бактериям и тканям, а также прочим органическим частицам, содержащимся в препаратах, оранжево-

красное неспецифическое свечение, на фоне которого листерии выделяются сияющим зеленоватым цветом.

Для дифференциации листерии от возбудителя рожи свиней можно использовать индикаторные среды; метод основан на редукции и оксидации красок в средах при выращивании листерии.

Исследуемую бульонную культуру или смыв агаровой культуры засевают в объеме 2-4 капель не менее, чем на две из пяти следующих индикаторных сред: с лакмусом, нейтральротом в смеси с метиленовой синью, метилротом, конгоротом, амидочерным (приложение 2). Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37-38°C вместе с контрольными (незасеянными) средами. Результат учитывают через 3-6, 24, 48 часов.

Возбудитель листериоза через 3-6 часов обесцвечивает среду с лакмусом и среду с нейтральротом в смеси с метиленовой синью до цвета бульона, лишь у поверхности на границе с воздухом остается окрашенный ободок. При встряхивании цвет частично восстанавливается, поэтому посеvy просматривают, не встряхивая пробирки.

Среда с метилротом обесцвечивается через 3-6 часов, но восстановление цвета среды не происходит.

Обесцвечивание сред с конгоротом и с амидочерным происходит в более поздние сроки: через 6-48 часов, при этом исходный цвет среды после обесцвечивания не восстанавливается.

Возбудитель рожи свиней не обесцвечивает ни одну из вышеуказанных сред.

Серологическая идентификация культур листерий

Поливалентная листериозная агглютинирующая сыворотка представляет собой смесь кроличьих листериозных агглютинирующих сывороток и содержит факторы (антитела) H-AB и O-II, V, VI, VII, IX. Поливалентная сыворотка в капельной реакции агглютинации на стекле агглютинирует все известные серовары листерии. Серогрупповые сыворотки агглютинируют культуры листерии соответствующих серогрупп. Сыворотка 1-го серовара (1-я серогруппа) содержит O-фактор II, а сыворотка 4-го «в» серовара (2-я серогруппа) – O-факторы V, VI.

Предназначенную для идентификации чистую 24-часовую бульонную культуру, выращенную при 37°C, платиновой петлей засевают частым штрихом на 2 пробирки обычного МПА так, чтобы получить рост по всей поверхности агара, и выращивают в темном месте при комнатной температуре (18-26°C) в течение 24-30 часов. Затем агаровую культуру смывают небольшим количеством физиологического раствора, чтобы получить густую взвесь (10-15 млрд микробных клеток в 1 мл).

Реакцию агглютинации ставят на чистых обезжиренных предметных стеклах согласно Методическим рекомендациям по постановке серологических реакций при диагностике инфекционных болезней животных, утвержденных ГУВ МСХ и ПРБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/129).

Учет результатов РА проводят в течение 3-х минут. Реакция считается положительной при появлении четкой агглютинации (образование хлопьев) в

капле с сывороткой при ее отсутствии в контроле. Запоздалые реакции не учитывают.

Исследуемую культуру признают листериями при получении положительной реакции с поливалентной сывороткой и отсутствии агглютинации в контроле с физиологическим раствором, а также наличии характерных морфологических, культуральных и биохимических свойств.

При наличии самоагглютинации РА ставят повторно, но при посеве на МПА в качестве посевного материала используют суточную бульонную культуру, выращенную при комнатной температуре, что предотвращает самоагглютинацию.

С помощью сероваровых («серогрупповых») сывороток определяют серовар («серогруппу») идентифицированных культур листерий. С этой целью чистую бульонную 24-часовую культуру листерий засевают на 1-2 пробирки МПА и выращивают при 37°C 18-24 часа. Смыв с агаровой культуры делают так же, как и для РА с поливалентной сывороткой, и исследуют в РА одновременно с сыворотками 1-го и 4-го «в» сероваров.

Положительная РА с сывороткой 1-го серовара свидетельствует о принадлежности культуры к 1-му серовару (1-я серогруппа), а положительная РА с сывороткой 4-го «в» серовара указывает на принадлежность ее к 4-ому «в» серовару (2-я серогруппа) листерий. В случае отрицательных или сомнительных показаний РА с сыворотками обоих сероваров, что возможно в результате изменчивости (диссоциации) культуры, для определения ее сероваровой (серогрупповой) принадлежности ставят пробу роста.

Для постановки пробы роста используют обычный МПБ в пробирках по 4-5 мл с добавлением 1%-1,25% стерильной сероваровой сыворотки, проверенной на стерильность путем экспозиции в термостате в течение 24 часов.

Для постановки пробы роста выращенную при 37°C суточную бульонную культуру листерий пересевают бактериологической петлей на две пробирки МПБ – одну пробирку с сывороткой 1-го и одну пробирку с сывороткой 4-го «в» серовара, которые инкубируют при температуре 37°C в течение 24-48 часов.

Если культура является смесью двух сероваров (серогрупп), то из верхнего слоя бульона каждой пробирки производят посев на МПА с целью получения изолированных колоний. Полученную из изолированной колонии каждой пробирки культуру снова испытывают по описанной выше методике в РА с сероваровыми сыворотками. При этом из пробирки с сывороткой 1-го серовара выделяют культуру 4-го «в» серовара («2-я серогруппа»), а из пробирки с сывороткой 4-го «в» серовара – культуру 1-го серовара (1-я серогруппа). Таким образом, с помощью пробы роста удастся разделить смесь культур листерий двух серогрупп.

Специфические свойства листерий проверяют также конъюнктивальной пробой на морских свинках или дермонекротической пробой на морских свинках или кроликах.

Конъюнктивальная проба. На конъюнктиву глаза морской свинки наносят 2 капли испытуемой бульонной культуры с последующим легким массажем век

ватным тампоном. Вирулентные штаммы листерий на 2-4-день вызывают у морской свинки гнойный кератоконъюнктивит. Пробу с каждым штаммом желательно ставить не менее чем на двух морских свинках.

Дермoneкротическая проба. В тщательно выстриженный участок кожи бока морской свинки или кролика внутрикожно вводят 0,3-0,5 мл бульонной культуры. Через 24-48 часов возникает воспаление с последующим некрозом и образованием струпа.

На одной морской свинке можно ставить конъюнктивальную и дермoneкротическую пробу при изучении свойств одного штамма. При необходимости испытания нескольких культур в выстриженный участок кожи на правом и левом боку кролика можно инъецировать по 3 культуры с каждой стороны.

Для дифференциации возбудителя листериоза от возбудителя рожи свиней пользуются таблицей 1.

Таблица 1 – Дифференциация возбудителя листериоза от возбудителя рожи свиней

Признаки	Возбудитель листериоза	Возбудитель рожи
Подвижность	Подвижен в 6-18-часовой культуре, выращенной при комнатной температуре	Неподвижен
Лизис листериозным бактериофагом	Лизируется	Не лизируется
Салицин	Разлагает	Не разлагает
Проба на каталазу	Положительная	Отрицательная
Индикаторные среды	Обесцвечивает	Не обесцвечивает
РА с позитивной листериозной сывороткой	Положительная	Отрицательная
Конъюнктивальная проба на морских свинках	Положительная	Отрицательная
Дермoneкротическая проба	Положительная	Отрицательная

Молекулярно-генетическая диагностика

Для молекулярно-генетической диагностики листериоза используют современные методы, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование.

Перечень и правила отбора материала для молекулярно-генетических исследований аналогичен бактериологическому исследованию. При этом допускается однократное замораживание материала и доставка в лабораторию в замороженном состоянии.

В настоящее время имеется широкий спектр коммерческих диагностических наборов для выявления генома листерий в патологическом материале и объектах внешней среды с использованием как «рутинной» ПЦР с гелеэлектрофоретической детекцией продуктов амплификации, так и ПЦР в режиме «реального времени». Как правило, в данном методе используется выявление фрагмента *hly*-гена, который является специфичным *L.monocytogenes*.

Идентификация листерий может быть проведена с использованием секвенирования 16SкДНК или *iap* генов. После выделения ДНК с помощью коммерческих наборов проводят амплификацию 16SкДНК или *iap* генов. Продукты амплификации очищают и секвенируют в лаборатории. Полученные данные сравнивают с доступными базами данных нуклеотидных последовательностей.

Диагноз на листериоз считается установленным:

- при получении положительного результата РНФ;
- обнаружении листерий в патматериале иммуофлюоресцентным методом;
- при выделении грамположительной полиморфной подвижной палочки, образующей каталазу и разлагающей с образованием кислоты глюкозу, мальтозу, трегалозу и салицин;
- при выделении культуры, вызывающей (вирулентные штаммы) положительные конъюнктивальную и дермонекротическую пробы у морских свинок и кроликов;
- при выделении культуры, дающей положительную РА с листериозной сывороткой;
- при выделении культуры, лизирующейся листериозным бактериофагом;
- при выделении культуры, обладающей патогенностью для лабораторных животных (вирулентные штаммы);
- при положительном результате ПЦР.

С целью выявления листерионосительства сыворотки крови от животных исследуют в РА, РСК и РНГА. Дифференциацией листериозных 19д-, 7д- антител удается отличить свежий инфекционный процесс от скрытого бактерионосительства и хронических бессимптомных форм болезни. При исследовании парных проб сывороток нарастание титра антител в 2-4 и более раза подтверждает диагноз на листериоз.

Срок исследования на листериоз животных – 14 дней.

Дифференциальная диагностика. У всех видов животных листериоз стоит дифференцировать от бешенства и отравлений ртутью, свинцом, ФОС и ХОС, атропинсодержащими растениями; у крупного рогатого скота – от бруцеллеза, кампилобактериоза, злокачественной катаральной горячки, губкообразной энцефалопатии; у овец - от скрепи; у свиней - от классической чумы, болезни Ауески, болезни Тешена и отечной болезни.

Дифференциальная диагностика при листериозе должна учитывать возможное ассоциативное течение листериоза с другими болезнями.

Лечение при листериозе слабо эффективно. Больных листериозом животных, имеющих признаки поражения центральной нервной системы, направляют на убой. Низкая лечебная эффективность при листериозе объясняется внутриклеточным паразитизмом возбудителя этой болезни в клетках макрофагальной системы. Лечение подвергают только подозреваемых в заболевании животных. Для этого используют хлортетрациклин, тетрациклин или ампициллин и другие антибиотики согласно наставлениям по их применению.

Лучший лечебный эффект достигается при использовании солей ампициллина или его сочетания с гентамицином. Одновременно проводят симптоматическое лечение: назначают сердечные средства, а также препараты, улуч-

шающие деятельность желудочно-кишечного тракта — дезинфицирующие, вяжущие.

Специфическая профилактика. Наиболее широкое применение в странах СНГ и в Республике Беларусь получила *сухая вакцина против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ»*. Она изготавливается из штамма «А», выделенного в 1965 году из мозга овцы совхоза «Суховский» Омской области. С целью снижения вирулентности выделенного штамма его облучали ультрафиолетовыми лучами.

Она предназначена для иммунизации крупного рогатого скота, овец, коз, свиней и кроликов в хозяйствах, неблагополучных по листериозу. Перед применением вакцину растворяют стерильным изотоническим раствором до концентрации 15 млрд листерий в 1 мл. Вакцину применяют внутримышечно двукратно с интервалом между инъекциями 10 дней.

Иммунитет у животных формируется через 10-14 дней после вакцинации и сохраняется до 12 месяцев. При проведении прививок запрещается применение антибиотиков за 10 суток до и после иммунизации.

Профилактика и ликвидация болезни. В целях профилактики листериоза необходимо проводить мероприятия общего характера, направленные на предупреждение заноса возбудителя в хозяйство: комплектование ферм проводить животными из благополучных хозяйств; выдерживать вновь поступающих животных в 30-дневном карантине; соблюдать принцип «все свободно - все занято»; проводить плановые дератизацию и дезинфекции; серологически исследовать на листериоз племенных животных; проводить санитарно-просветительную работу др.

Хозяйство (ферма, комплекс, отделение, и т.д.), в которых выявлено заболевание животных листериозом, в установленном порядке объявляют неблагополучным по этому заболеванию и вводят *ограничения*, по условиям которых запрещается:

- вывод из сельскохозяйственной организации (фермы) животных, за исключением вывоза животных для убоя;
- трупы животных, абортированные плоды подлежат немедленному уничтожению;
- проводить перегруппировку животных внутри сельскохозяйственной организации без согласования со специалистами в области ветеринарии данной сельскохозяйственной организации;
- вывоз мяса от вынужденного убоя больных листериозом животных в сыром виде, за исключением его вывоза для переработки в организации, осуществляющие деятельность по переработке мяса;
- продажа населению животных для выращивания и откорма;
- совместный выпас, водопой и иной контакт животных из неблагополучных по листериозу стад со здоровыми животными, а также перегон и перевоз животных из неблагополучных по листериозу стад на отгонные пастбища.

В неблагополучных по листериозу стадах проводят:

– клинический осмотр животных с выборочным измерением температуры тела; больных животных, имеющих признаки поражения центральной нервной системы, направляют на убой;

– клинически здоровых животных иммунизируют и подвергают лечению антибиотиками согласно инструкции по применению.

С целью выявления животных–листерионосителей подвергают серологическим исследованиям. Животных с положительной реакцией изолируют и подвергают лечению антибиотиками или направляют на убой.

Молоко, полученное от животных, больных листериозом, кипятят в течение 15 мин., после чего допускается его использование для скармливания животным этой сельскохозяйственной организации или перерабатывают на топленое масло.

Навоз укладывают в бурты и подвергают биотермическому обеззараживанию в течение 2–3 месяцев, затем разрешается его вывоз на поля.

В помещениях для содержания животных и на прилегающей территории проводят дезинфекцию и дезинсекцию. Дезинфекцию помещений проводят после каждого случая выявления больных животных, а затем через каждые 14 дней в течение всего периода заболевания.

Помещения для содержания животных и прилегающая территория и другие зараженные возбудителем листериоза участки или территории после ликвидации заболевания очищают от мусора, навоза. В помещениях, в которых содержатся животные и на прилегающих к ним территориях, проводят дератизацию. Трупы грызунов (мышей, крыс) подлежат уничтожению путем сжигания. Дератизационные мероприятия проводят также на пастбищах, где регистрируются стационарные очаги листериоза.

Полученное от больных листериозом животных кожевенно-меховое сырье обеззараживают.

Для дезинфекции помещений и предметов ухода за животными применяют один из следующих растворов:

- 3%-ный горячий раствор натрия гидроокиси при экспозиции 3 часа;
- 5%-ную горячую эмульсию ксилонафта при экспозиции 5 часов;
- 6%-ную горячую эмульсию дезинфекционного креолина при экспозиции 6 часов; осветленный раствор хлорной извести, содержащий не менее 2%-ного активного хлора, при экспозиции 4 часа или другие эффективные при листериозе дезинфицирующие средства, согласно инструкции по их применению.

Для получения аэрозолей применяют 20 %-ный раствор формальдегида из расчета 20 мл на 1 м³ помещения при экспозиции 4 часа; формалин-креолиновую (ксилонафтовую) смесь, состоящую из 3 частей продажного формалина и 1 части 50%-ной водной эмульсии креолина или ксилонафта, из расчета 15 мл смеси на 1 куб. м помещения при экспозиции – 3 часа или другими эффективными при листериозе дезинфицирующими средствами согласно инструкции по применению.

Хозяйство (комплекс, ферму) объявляют *благополучным* по листериозу через два месяца после последнего случая выделения клинически больных животных и получения отрицательных результатов по РСК (РА, РНГА) при дву-

кратном исследовании сывороток крови с интервалом 14-20 дней, а также проведения заключительной дезинфекции помещений и территории фермы.

Люди, работающие по уходу за больными животными или при разделке туш таких животных, а также лабораторные работники, исследующие патматериал от больных или подозрительных по заболеванию листериозом животных, должны строго соблюдать общие меры личной профилактики.

Список рекомендуемой литературы

1. Болезни крупного рогатого скота и овец / П. А. Красочко [и др.]. – Махачкала, 2007. – 657 с.
2. Ветеринарная энциклопедия : в 2 т. Т. 1. А – К / С. С. Абрамов [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Минск : Беларуская Энцыклапедыя імя Петруся Броўкі, 2013. – 463 с.
3. Ветеринарная энциклопедия : в 2 т. Т. 2. К – Я / С. С. Абрамов [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Минск : Беларуская Энцыклапедыя імя Петруся Броўкі, 2013. – 597 с.
4. Ветеринарные и технологические мероприятия при содержании крупного рогатого скота : монография / П. А. Красочко [и др.] ; под общ. ред. П. А. Красочко. – Смоленск : Универсум, 2016. – 508 с.
5. Отбор образцов для лабораторной диагностики бактериальных и вирусных болезней животных : учебно-методическое пособие / И. Н. Громов [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 64 с.
6. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: бактериальные заболевания : монография / А. А. Шевченко [и др.]. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – 701 с.
7. Дифференциальная диагностика болезней животных : практическое пособие / А. И. Ятусевич [и др.]. – Минск : Техноперспектива, 2010. – 449 с.
8. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с желудочно-кишечными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии (рекомендации) / Н. В. Сеница [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2019. – 68 с.
9. Диагностика, профилактика и терапия болезней свиней / А. Р. Камошенков [и др.]. – Смоленск : Смоленская ГСХА, 2010. – 200 с.
10. Дифференциальная диагностика болезней животных : практическое пособие / А. И. Ятусевич [и др.]. – Минск : Техноперспектива, 2010. – 449 с.
11. Заразные болезни, общие для животных и человека : справочное пособие / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2011. – 480 с.
12. Инфекционная патология животных : в 2 т. / под. ред. А. Я. Самуйленко. – М. : Академкнига, 2006. – Т. 1. – 1911 с.
13. Инфекционные болезни животных / А. А. Сидорчук [и др.]. – М. : Колос С, 2007. – С. 271–281.
14. Красочко, П. А. Современные подходы к классификации иммуномодуляторов / П. А. Красочко // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2006. – № 2. – С. 35–40.
15. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных бактериальной этиологии : учебно-методическое пособие / В. С. Прудников [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2000. – 23 с.
16. Молодняк крупного рогатого скота: кормление, диагностика, лечение и профилактика болезней : монография / Н. И. Гавриченко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – 288 с.
17. МЭБдокументы/Access online%20 OIE - World Organisation for Animal Health диагностика.htm

18. Новые и возвращающиеся болезни животных : монография / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 400 с.
19. Оценка эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Витебской области / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 2 (9). – С. 35–39.
20. Профилактика и мероприятия по ликвидации листериоза / А. А. Шевченко [и др.]. – Краснодар : КубГАУ, 2013. – 12 с.
21. Специфическая профилактика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных и птиц в Республике Беларусь [Электронный ресурс] / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка : материалы Международной научно-практической конференции, г. Витебск, 30 октября – 2 ноября 2019 г. / ред. Н. И. Гавриченко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – С. 56–61.
22. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практическое пособие / П. А. Красочко [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с.
23. Логвинов, О. Л. Листериоз животных: диагностика и профилактика (обзор) / О. Л. Логвинов // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2017. – № 1. – С. 43–47.
24. Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве : монография : в 2 ч. Ч. 2 / Ф. И. Фурдуй [и др.] / под ред. П. А. Красочко. – Горки : БГСХА, 2013. – 492 с.
25. Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве : монография : в 2 ч. Ч. 1 / Ф. И. Фурдуй [и др.] / под ред. П. А. Красочко. – Горки : БГСХА, 2013. – 564 с.
26. Частная эпизоотология : учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В. В. Максимович [и др.] ; под ред. В. В. Максимовича. – Минск : ИВЦ Минфина, 2010. – С. 191–197.
27. Эпизоотология и инфекционные болезни : учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В. В. Максимович [и др.] ; под ред. В. В. Максимовича. – 2 изд. перераб. и доп. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 824 с.
28. Ветеринарно-санитарные правила профилактики, диагностики и ликвидации листериоза животных : утв. Постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 09.02.2018, № 12.

Методы обнаружения Л-форм листерий (дополнительное исследование)

Листерии существуют как в классической бактериальной форме, так и в виде Л-форм.

Процесс Л-трансформации бактерий представляет собой широко распространенную биологическую закономерность. Возникают Л-формы под влиянием различных неблагоприятных воздействий и в дальнейшем проявляют высокую устойчивость к факторам, вызвавшим их появление. Частично или полностью утрачивая фрагменты клеточной стенки, Л-формы могут сохранять свою жизнеспособность в условиях, при которых невозможно существование классических бактериальных форм. В результате Л-трансформации в значительной степени изменяются биологические свойства микроорганизмов, что в свою очередь отражается на клиническом течении болезней, затрудняет их диагностику, а в ряде случаев может изменить характер эпидемического и эпизоотического процессов.

Листерии трансформируются в Л-форму под влиянием антибиотиков пенициллинового ряда, тетрациклина, факторов специфической и неспецифической резистентности организма (иммунной сыворотки, комплемента, глицина, лизоцима) и т.д. Трансформация происходит, когда перечисленные агенты не оказывают достаточного бактериостатического или бактерицидного эффекта. Л-формы, сохранившие фрагменты клеточной стенки, относятся к сферопластному типу. Л-формы, лишенные полностью клеточной стенки, принадлежат к протопластному типу.

При исключении фактора, вызывающего Л-трансформацию, Л-формы могут реверсировать в бактериальную культуру. Реверсирующие Л-формы называются нестабильными, а нереверсирующие — стабильными. Чаще реверсируют Л-формы листерий сферопластного типа.

1. Биологические свойства Л-форм листерий

1.1. Морфология. Л-формы листерий имеют существенные морфологические различия с бактериальной формой возбудителя. Они состоят из разнообразных морфологических структур: шаровидных тел и тел неправильной конфигурации, вакуолизированных, гранулярных, зернистых форм и субмикроскопических (фильтрующихся) элементов. Все структуры связаны между собой цепью определенных взаимопревращений и способны к репродукции, размеры их варьируют от 5-8 до 0,15-0,2 мкм, что обуславливает возможность прохождения Л-форм через бактериальные фильтры. Л-формы листерий не отличаются по морфологии от Л-форм других бактерий, что исключает возможность использования этого теста в качестве дифференциального.

1.2. Культуральные свойства. Л-формы листерий растут на полутвердых (1,3%), полужидких (0,3%) и жидких питательных средах. Для поддержания их жизнедеятельности и активной репродукции в среды добавляют 2-2,5% хлорида натрия и 2-5% нормальной лошадиной сыворотки без консерванта. При

культивировании нестабильных Л-форм (в отличие от стабильных) в среды дополнительно вносят антибиотики или другие Л-трансформирующие агенты, дозы которых избирательно подбираются в каждом конкретном случае. Оптимальная температура выращивания Л-форм листерий - 30°C, но они также хорошо растут при 20-37°C. На 1,3%-ном агаре Л-формы формируют типичные Л-колонии с оптически плотным гомогенным центром и ажурной периферией. В бульоне они растут в виде изолированных колоний или вызывают равномерное помутнение среды.

1.3. Биохимическая активность. Несмотря на то, что морфология (данные светооптического исследования) и питательные потребности нестабильных и стабильных Л-форм листерий одинаковы, их биохимическая активность различна. Нестабильные Л-формы обычно ферментируют те же дифференциально-диагностические среды, что и бактериальные формы, но кислотообразование у них замедленное. Ферментативная активность стабильных Л-культур может в значительной степени снижаться, вплоть до полной ее утраты в отношении некоторых сахаров и спиртов. Сахаролитическая активность Л-форм листерий, подверженная значительным вариациям, не имеет решающего значения при их идентификации. Однако другие биохимические тесты, такие как каталазная активность и использование глюкозы по гексозомонофосфатному пути, постоянно присущи Л-формам листерий, независимо от степени их стабилизации, и могут быть использованы при идентификации любых форм возбудителя листериоза.

1.4. Антигенность и иммуногенность. Антигенность и иммуногенность Л-форм листерий обусловлены наличием или отсутствием у них фрагментов клеточной стенки.

В антигенном отношении Л-формы сферопластного типа более близки бактериальным формам, чем Л-формы протопластного типа. Чем выше степень сохранности фрагментов клеточной стенки у Л-форм сферопластного типа, тем больше выражено их антигенное родство с бактериальными формами. В этих случаях они могут взаимодействовать с антибактериальной сывороткой в непрямом методе флюоресцирующих антител (НМФА) и в непрямом методе пероксидазных антител (НМПА), окрашиваясь на 3 и 4 креста.

Если степень сохранности фрагментов клеточной стенки у Л-форм сферопластного типа незначительна, то результаты НМФА и НМПА с антибактериальной сывороткой будут отрицательными или сомнительными.

Л-формы листерий протопластного типа не выявляются антибактериальной сывороткой в НМФА и НМПА. Несмотря на значительные изменения антигенных свойств листерий в процессе Л-трансформации, между бактериальными формами и их Л-формами сохраняется определенная общность антигенного строения.

1.5. Патогенность. Нереверсирующие Л-формы сферопластного типа в условиях эксперимента вызывают в организме чувствительных животных изменения, характерные для инфицирования бактериальными культурами листерии.

Л-формы листерий протопластного типа, не дающие реверсии в условиях организма, не вызывают гибели куриных эмбрионов и конъюнктивальной

реакции у морских свинок, однако при внутрикожном введении развивается некроз на месте инъекции. Мыши не являются чувствительной моделью для выявления вирулентных свойств стабильных Л-форм листерий протопластного типа.

2. Методы обнаружения Л-форм листерий

Методы обнаружения Л-форм листерий включают посевы патологического материала на питательные среды и идентификацию выделенных культур иммунофлюоресцентным или иммунопероксидазным методами.

2.1. Микробиологическое исследование. Из органов и тканей делают посевы на среды, обычно используемые для выделения бактериальных форм листерий (мясопептонный или мясопептонно-печеночный агар (МПА, МППА) или бульон (МПБ, МППБ) с добавлением 1% глюкозы и 2-3% глицерина, рН 7,2-7,4) и на полутвердые и жидкие Л-среды для культивирования Л-форм листерий в условиях лаборатории — 1,3%-ный МПА (МППА) и бульон, содержащие 2% хлорида натрия и 2% нормальной лошадиной сыворотки без консерванта.

При отрицательном результате первичного посева рекомендуется сохранять патологический материал в холодильнике при 4°C в течение 30 дней и проводить повторные исследования через каждые 10 дней.

Посевы инкубируют в течение 3-4 суток при 30°C или 37°C. При отсутствии роста срок наблюдения увеличивают до 1-1,5 месяцев, но посевы при этом выдерживают при комнатной температуре (20-22°C).

Л-формы листерий при первичном посеве из организма могут вырастать не только на Л-среде, но и на обычных бактериальных средах, однако дальнейшие пересевы их, как правило, не удаются.

Выросшие на агаре Л-колонии листерий при визуальном просмотре похожи на бактериальные колонии этого возбудителя и в проходящем свете также имеют голубую окраску с зеленоватым оттенком. Однако при просмотре в микроскопе (объектив x10) колонии Л-форм имеют не мелкозернистую, характерную для бактериальных колоний, а кружевную структуру. Нередко Л-формы листерий формируют классические Л-колонии, для которых типичен уплотненный, растающий в агар центр и более светлая ажурная периферия. Величина колоний варьирует от 0,1 до 1-2 мм в диаметре. В жидкой среде Л-формы также могут расти в виде изолированных колоний.

Л-формы листерий обладают каталазной активностью. Выделенные культуры изучают в фазово-контрастном микроскопе, окрашивают по Граму и исследуют иммунофлюоресцентным или иммунопероксидазным методами.

Для окраски по Граму культуру Л-форм наносят на хорошо обезжиренные предметные стекла, подсушивают на воздухе и фиксируют на пламени. Окрашивать по Граму можно изолированные колонии агаровой культуры Л-форм, либо бульонную культуру, если в жидкую среду пересевали колонии с агара. Нельзя окрашивать по Граму бульонную культуру (если в среду заседали суспензию органов) и мазки-отпечатки органов, так как при этом возможны артефакты.

При окраске по Граму большинство структур Л-форм листерий грамположительны, но могут встречаться и единичные грамотрицательные структуры. Иногда при посеве в бульон изолированных бактериальных колоний листерий происходит спонтанная трансформация их в Л-форму и при окраске по Граму в мазке выявляются различной величины нередко вакуолизированные шаровидные структуры.

По чувствительности выявления Л-формы листерий в мазках-отпечатках органов и мазках культур Л-форм иммунофлюоресцентный и иммунопероксидазный методы практически равноценны. Различия их состоят в том, что в одном случае в качестве маркера антител применяют изотиоционат флюоресцеина (ФИТЦ), а в другом случае — фермент пероксидазу, который выявляют с помощью 3,3-диаминобензидина тетрахлорида, при этом комплекс антиген-антитело окрашивается в темно-коричневый цвет.

Преимуществами иммунопероксидазного метода является слабое фоновое окрашивание препаратов, возможность их исследования в световом микроскопе и возможность хранения в течение длительного времени, а также возможность одновременного исследования препаратов морфологическими и иммунологическими методами.

Для выявления Л-форм листерий сферопластного типа с хорошо выраженной клеточной стенкой можно использовать сыворотку против бактериальных форм листерий, поэтому постановка реакции осуществляется в условиях любой бактериологической лаборатории. Л-формы листерий протопластного типа не выявляются антибактериальной сывороткой.

2.2. Окраска по непрямому методу флюоресцирующих антител (НМФА). Для постановки реакции необходимы:

- поливалентная антибактериальная (против листерий 1-й и 2-й серогрупп) сыворотка кролика (для выявления бактериальных форм и Л-форм сферопластного типа) и глобулиновая фракция гипериммунной сыворотки кролика против Л-форм листерий протопластного типа (для выявления Л-форм протопластного типа);

- антитела диагностические против Jg кролика, меченные ФИТЦ;

- химически чистый ацетон;

- забуференный физиологический раствор рН 7,2-7,4;

- глицерин на забуференном физиологическом растворе рН 7,2-7,4 (1 часть глицерина нейтрального и 9 частей забуференного физиологического раствора);

- дистиллированная вода;

- дефлюоресцирующее иммерсионное масло или химически чистый диметилфталат;

- тонкие, обезжиренные предметные стекла.

Мазки-отпечатки из органов высушивают на воздухе и фиксируют в течение 30 минут в химически чистом ацетоне. Мазки из культуры Л-форм фиксируют на пламени. После фиксации мазки делят на две группы — на 1 этапе на одни мазки наносят поливалентную антибактериальную сыворотку кролика (в рабочем разведении), на другие наносят немеченый глобулин

сыворотки кролика против Л-форм протопластного типа листерий в разведении 1:4 (глобулины разводят забуференным физраствором с рН 7,2-7,4);

- инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 1 часа;

- препараты трижды промывают в забуференном физиологическом растворе (каждое промывание - по 10 минут), ополаскивают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе;

- наносят антикроличью сыворотку, меченую ФИТЦ, в рабочем (не ниже 1:16) разведении (II этап);

- инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 30 минут;

- препараты в течение 30 минут трижды промывают в забуференном физрастворе, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе;

- на окрашенные препараты наносят глицерин на забуференном физиологическом растворе, накрывают покровным стеклом, на которое наносят нефлюоресцирующее иммерсионное масло и исследуют в люминесцентном микроскопе.

При исследовании материала необходимо ставить контроли, указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Контроли, необходимые при постановке НМФА и НМПА

№ пп	Антиген	Реагент 1 этапа	Реагент 2 этапа	Результат
1	Гомологичный: а) бактериальная форма	Гомологичные антитела поливалентная антибактериальная сыворотка кролика	Меченые антитела против глобулинов кролика	Положительный
2	б) Л-формы протопластного типа	глобулин сыворотки кролика против Л-форм протопластного типа	Меченые антитела против глобулинов кролика	Положительный
3	Гомологичный	Забуференный физиологический раствор	Меченые антитела против глобулинов кролика	Отрицательный
4	Гомологичный	Гомологичные антитела	Забуференный физиологический раствор	Отрицательный
5	Гомологичный	Нормальные антитела (глобулины) кролика	Меченые антитела против глобулинов кролика	Отрицательный
6	Гетерологичный: а) возбудитель рожи свиней	Поливалентная листериозная антибактериальная сыворотка кролика	Меченые антитела против глобулинов кролика	Отрицательный
7	б) стабильные Л-формы стрептококка или стафилококка	Глобулин сыворотки крови против Л-форм листерий протопластного типа	Меченые антитела против глобулинов кролика	Отрицательный

Препараты-отпечатки органов для уменьшения неспецифического свечения ткани следует окрашивать методом контрастирования. С этой целью на мазки наносят смесь люминесцирующей сыворотки и бычьего альбумина, меченного родамином.

Целесообразно сочетать просмотр препаратов одного и того же поля зрения одновременно в люминесцентном микроскопе (освещение сверху) и в фазово-контрастном устройстве (освещение снизу).

Для оценки интенсивности свечения используется четырехкрестовая система:

++++ - яркая, изумрудно-зеленая люминесценция бактерий или различных по морфологии и величине структур Л-форм, часто свечение по периферии более интенсивное;

+++ - отчетливо выраженная, достаточно яркая зеленая люминесценция, периферический ободок хорошо выражен;

++ - недостаточно яркая желтовато-зеленоватая люминесценция, периферический ободок еле заметен;

+ - люминесценция слабая, желтая.

Положительным результатом считается люминесценция клеток на 4 и 3 креста при наличии в каждом поле зрения не менее 2-5 специфически светящихся бактерий или полиморфных структур Л-форм различной величины.

Окраска по непрямому методу пероксидазных антител (НМПА).

Для постановки реакции необходимы:

- поливалентная антибактериальная (против листерий 1-й и 2-й серогрупп) сыворотка кролика и глобулиновая фракция гипериммунной сыворотки кролика против Л-форм листерий протопластного типа;

- антитела диагностические против Jg кролика, меченные пероксидазой;

- химически чистый ацетон;

- 0,5%-ный раствор перекиси водорода в метаноле;

- забуференный физиологический раствор pH 7,2-7,4;

- сыворотка крупного рогатого скота, разведенная физиологическим раствором 1:5;

- 0,05%-ный свежеприготовленный раствор 3,3-диаминобензида тетрагидрохлорида (ДАБ), содержащий 0,3% перекиси водорода. Приготовление раствора ДАБ: 5 мг 3,3-диаминобензида тетрагидрохлорида растворяют в 10 мл забуференного физиологического раствора и добавляют 0,3% перекиси водорода в конечном разведении.

Для иммунопероксидазного исследования патологического материала из паренхиматозных органов и головного мозга готовят мазки-отпечатки. После высушивания на воздухе их фиксируют в течение 30 минут в химически чистом ацетоне. Мазки культур Л-форм фиксируют на пламени. После фиксации для инактивирования эндогенной пероксидазы препараты обрабатывают свежеприготовленным 0,5%-ным раствором перекиси водорода в метаноле в течение 30 минут;

- промывают в забуференном физиологическом растворе в течение 15 минут;

- обрабатывают в течение 10 минут сывороткой крупного рогатого скота, разведенной 1:5 (блокируют неспецифическое фоновое окрашивание ткани), высушивают фильтровальной бумагой.

Мазки делят на две группы — на 1 этапе на одни мазки наносят поливалентную антибактериальную сыворотку кролика (в рабочем разведении), на другие — немеченый глобулин антисыворотки кролика против Л-форм листерий протопластного типа в разведении 1:4 (разводят глобулины забуференным физиологическим раствором рН 7,2-7,4);

- инкубируют во влажной камере при 37°С в течение 1 часа;

- препараты трижды промывают в забуференном физрастворе (каждое промывание по 10 минут), ополаскивают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе;

- наносят в рабочем разведении антисыворотку к Jg кролика, меченную пероксидазой (II этап);

- инкубируют во влажной камере при 37°С в течение 30 минут;

- промывают забуференным физраствором и окрашивают в течение 10 минут 0,05%-ным свежеприготовленным, содержащим 0,3% перекиси водорода, раствором ДАБ;

- препараты в течение 30 минут промывают в проточной воде, заключают в бальзам и просматривают в световом микроскопе.

Контроли, необходимые при постановке реакции, указаны в таблице 2.

При положительном результате на желтоватом фоне бактериальные формы и структуры Л-форм окрашиваются в коричневый или темно-коричневый цвет. Предварительный диагноз ставят на основании комплекса эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических и гистологических изменений, а также при наличии возбудителя в мазках-отпечатках органов.

Окончательный диагноз на листериоз устанавливают в случае выделения возбудителя (бактериальной формы, нестабильной или стабильной Л-формы). Стабильные Л-формы листерий, не давшие реверсии, должны быть идентифицированы иммунофлюоресцентным или иммунопероксидазным методами.

**Рецепты и способы приготовления индикаторных и элективных сред
Индикаторные среды для культивирования листерий**

Для приготовления индикаторных сред необходимо иметь:

а — мясопептонный бульон или бульон Хоттингера рН 7,3-5;

б — индикаторы:

- настойка лакмуса — 5 г сухого лакмуса растирают в порошок, смешивают с 50 мл спирта-ректификата и ставят в термостат при температуре 37°С на 3 дня; каждый день спирт меняют. На четвертые сутки спирт сливают, порошок высушивают в чашке Петри и заливают десятикратным количеством дистиллированной воды; раствор фильтруют;

- метиленовую синь, нейтральрот, метилрот, конгорот и амидочерный готовят в виде 0,1%-ных растворов на дистиллированной воде и стерилизуют отдельно от питательной среды при 1 атм. 30 минут.

Приготовление индикаторных сред

Среда с лакмусом: к 100 мл МПБ или бульона Хоттингера добавляют 1 мл настойки лакмуса. Цвет среды сиреневый.

Среда с нейтральротом в смеси с метиленовой синью: к 100 мл МПБ или бульона Хоттингера добавляют по 1 мл 0,1%-ных растворов нейтральрота и метиленовой сини. Цвет среды зеленовато-голубоватый или зеленый.

Среды с лакмусом и нейтральротом в смеси с метиленовой синью разливают по пробиркам с ватными пробками и стерилизуют при 1 атм. 30 минут.

Среда с метилротом: в пробирку с 10 мл стерильного МПБ или бульона Хоттингера добавляют 0,3 мл стерильного 0,1%-ного водного раствора метилрота, цвет среды лимонно-желтый.

Среда с конгоротом: в пробирку с 10 мл стерильного МПБ или бульона Хоттингера добавляют 0,3 мл стерильного 0,1%-ного водного раствора конгорота, цвет среды красный.

Среда с амидочерным: к 10 мл стерильного МПБ или бульона Хоттингера добавляют 0,3 мл стерильного 0,1%-ного водного раствора амидочерного, цвет среды черный с фиолетовым оттенком.

В практических условиях 0,1%-ные стерильные растворы метилрота, конгорота, амидочерного можно добавлять в пробирки со стерильным МПБ или бульоном Хоттингера стерильной пастеровской пипеткой из расчета по 1 капле раствора индикатора на 1 мл бульона.

Элективные среды

Среда с теллуридом калия. К 1 л расплавленного МПА (рН 7,2-7,4) перед разливом в бактериологические чашки добавляют 10 мл 2%-ного водно-глицеринового раствора теллурида калия.

Добавление к указанной среде 5-10% сыворотки крови крупного рогатого скота улучшает рост листерий.

Среда с теллуридом калия и флоримицином или полимиксином. К 1 л расплавленного МПА (рН 7,2-7,4) перед разливом добавляют 10 мл 2%-ного

водно-глицеринового раствора телурита калия и 0,3-0,5 мл раствора флоримицина или полимиксина (500 тыс. ед. препарата разводят в 10 мл физиологического раствора).

Цвет колоний на среде с теллуридом калия черный, в связи с восстановлением теллурида калия до металлического теллура.

Готовая среда L-PALCAM-агар (L-PALCAM-Listeria Selective Agar).

Состав среды (г/л): пептон – 23,0 г; крахмал – 1,0 г; хлорид натрия – 5,0 г; эскулин – 0,8 г; хлорид лития – 15,0 г; цитрат аммонийного железа – 0,5 г; глюкоза – 0,5 г; маннит – 10,0 г; феноловый красный – 0,08 г; агар-агар – 13,0 г. рН 7,0±0,2. На 1 л среды добавить: акриф-лавина – 5 мг, полимиксина В – 10 мг, цефтацидина – 20 мг в 10 мл стерильной дистиллированной воды.

Методика выделения листерий из силоса

Силос плохого качества (рН свыше 5,5) является благоприятной средой для размножения листерий, особенно в его поверхностных слоях. При необходимости проводят бактериологическое исследование силоса.

Для исследования из разных участков берут 5-10 проб силоса массой около 100 граммов каждая. Из них отбирают среднюю пробу, из которой получают сок. Оставшуюся часть силоса хранят при +4⁰С. Определяют рН сока; при рН 5,4 и ниже исследование проводить нецелесообразно.

Затем по 0,2 мл сока засевают в 9 пробирок МПБ с 10% хлорида натрия. Посевы делят на 3 части (по 3 пробирки) и выращивают:

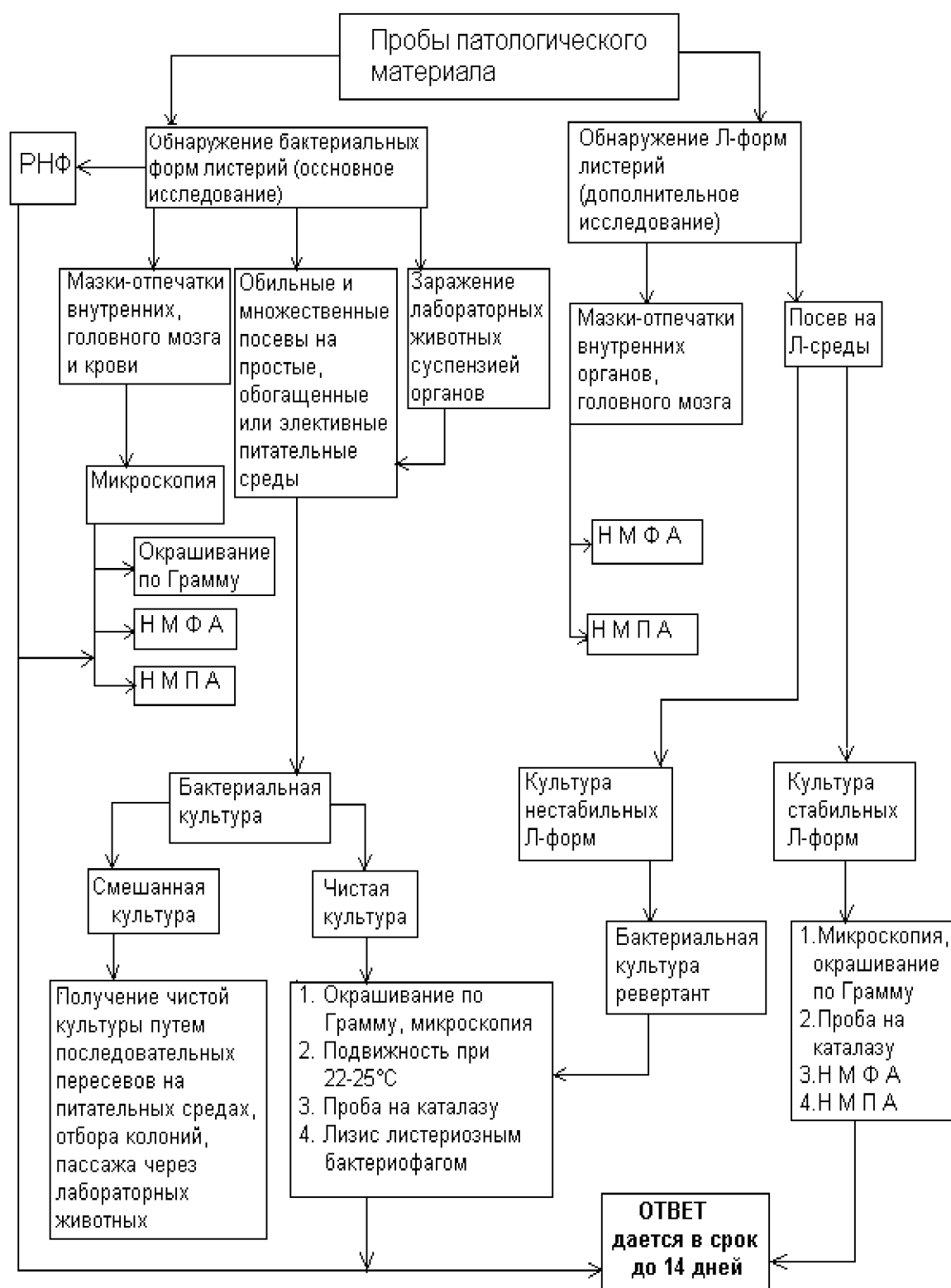
- при +37⁰С — 48 часов,
- при +22⁰С — 5 дней,
- при +4⁰С — 10 дней.

После истечения срока выращивания из бульонов делают пересев на элективные среды в чашках, готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Независимо от результатов микроскопии заражают 2-х белых мышей (масса 14-16 г) подкожно в дозе 0,2-0,3 мл.

В случае гибели зараженных животных из их органов делают мазки и посевы на питательные среды. Полученные культуры идентифицируют согласно п. 5 настоящих Методических указаний.

При отрицательном результате повторные исследования проб силоса, хранившихся при +4⁰С, проводят через 10 дней в течение месяца.

Схема бактериологического исследования материала на листериоз



УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины является старейшим учебным заведением в Республике Беларусь, ведущим подготовку врачей ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарных врачей, провизоров ветеринарной медицины и зооинженеров.

Вуз представляет собой академический городок, расположенный в центре города на 17 гектарах земли, включающий в себя единый архитектурный комплекс учебных корпусов, клиник, научных лабораторий, библиотеки, студенческих общежитий, спортивного комплекса, Дома культуры, столовой и кафе, профилактория для оздоровления студентов. В составе академии 4 факультета: ветеринарной медицины; биотехнологический; повышения квалификации и переподготовки кадров агропромышленного комплекса; международных связей, профориентации и довузовской подготовки. В ее структуру также входят Аграрный колледж УО ВГАВМ (п. Лужесно, Витебский район), филиалы в г. Речице Гомельской области и в г. Пинске Брестской области, первый в системе аграрного образования НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии (НИИ ПВМ и Б).

В настоящее время в академии обучается более 4 тысяч студентов, как из Республики Беларусь, так и из стран ближнего и дальнего зарубежья. Учебный процесс обеспечивают 324 преподавателя. Среди них 180 кандидатов, 30 докторов наук и 21 профессор.

Помимо того, академия ведет подготовку научно-педагогических кадров высшей квалификации (кандидатов и докторов наук), переподготовку и повышение квалификации руководящих кадров и специалистов агропромышленного комплекса, преподавателей средних специальных сельскохозяйственных учебных заведений.

Научные изыскания и разработки выполняются учеными академии на базе Научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии. В его состав входит 2 отдела: научно-исследовательских экспертиз (с лабораторией биотехнологии и лабораторией контроля качества кормов); научно-консультативный.

Располагая современной исследовательской базой, научно-исследовательский институт выполняет широкий спектр фундаментальных и прикладных исследований, осуществляет анализ всех видов биологического материала и ветеринарных препаратов, кормов и кормовых добавок, что позволяет с помощью самых современных методов выполнять государственные тематики и заказы, а также на более высоком качественном уровне оказывать услуги предприятиям агропромышленного комплекса. Активное выполнение научных исследований позволило получить сертификат об аккредитации академии Национальной академией наук Беларуси и Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь в качестве научной организации. Для проведения данных исследований отдел научно-исследовательских экспертиз аккредитован в Национальной системе аккредитации в соответствии с требованиями стандарта СТБ ИСО/МЭК 17025.

Обладая большим интеллектуальным потенциалом, уникальной учебной и лабораторной базой, вуз готовит специалистов в соответствии с европейскими стандартами, является ведущим высшим учебным заведением в отрасли и имеет сертифицированную систему менеджмента качества, соответствующую требованиям ISO 9001 в национальной системе (СТБ ISO 9001 – 2015).

www.vsavm.by

210026, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11, факс (0212) 48-17-65, тел. 33-16-29 (факультет международных связей, профориентации и довузовской подготовки); 33-16-17 (НИИ ПВМ и Б); E-mail: vsavmpriem@mail.ru.

Учебное издание

Красочко Петр Альбинович,
Синица Николай Владимирович
Яромчик Ярослав Петрович и др.

ЛИСТЕРИОЗ

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск П. А. Красочко
Технический редактор О. В. Луговая
Компьютерный набор Я. П. Яромчик
Компьютерная верстка Т. А. Никитенко
Корректор Т. А. Никитенко

Подписано в печать 28.05.2021. Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Ризография.

Усл. печ. л. 3,0. Уч.-изд. л. 2,41. Тираж 100 экз. Заказ 2140.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.

ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.

Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.

Тел.: (0212) 48-17-82.

E-mail: rio_vsavm@tut.by

<http://www.vsavm.by>