

# **Возбудители некробактериоза и копытной гнили.**

Работу выполнила студентка  
532 группы Лазарева Л.С.

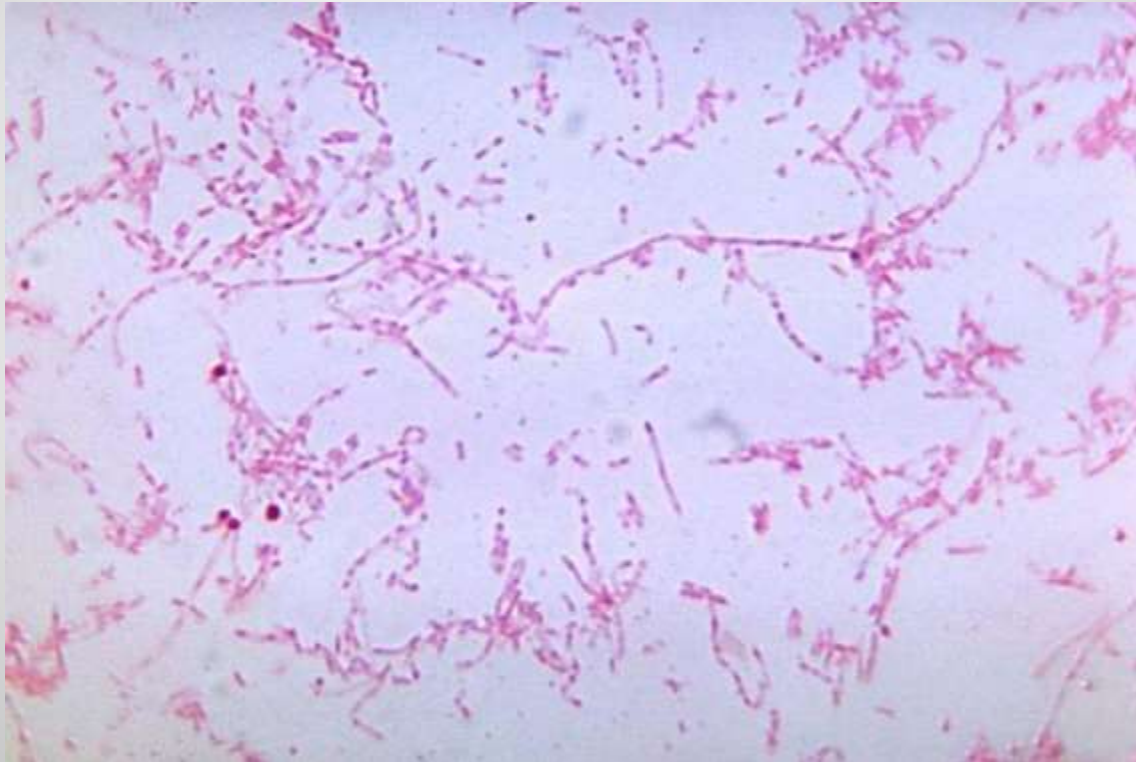
- Некробактериоз.
- Данная морфофизиологическая группа представлена семейством *Bacteroidaceae*, которое объединяет 13 родов. Зоопатогенные виды микроорганизмов входят в роды *Bacteroides*, *Fusobacterium*.



- **Некробактериоз** — инфекционная болезнь, характеризующаяся гнойно-некротическими поражениями, локализующимися на нижних частях конечностей, а в отдельных случаях — в ротовой полости, на вымени, половых органах, в печени, легких, мышцах и других тканях и органах.

- Пути передачи:
- Некробактериоз может передаваться от коровы к корове.
- Основные пути попадания инфекции в организм следующие:
- при контактах с больной особью;
- через подстилку от животного к животному;
- из внешней среды, например, при заезде транспорта на ферму.

- Возбудителем болезни является анаэробная грамотрицательная бактерия — *Fusobacterium necrophorum*.



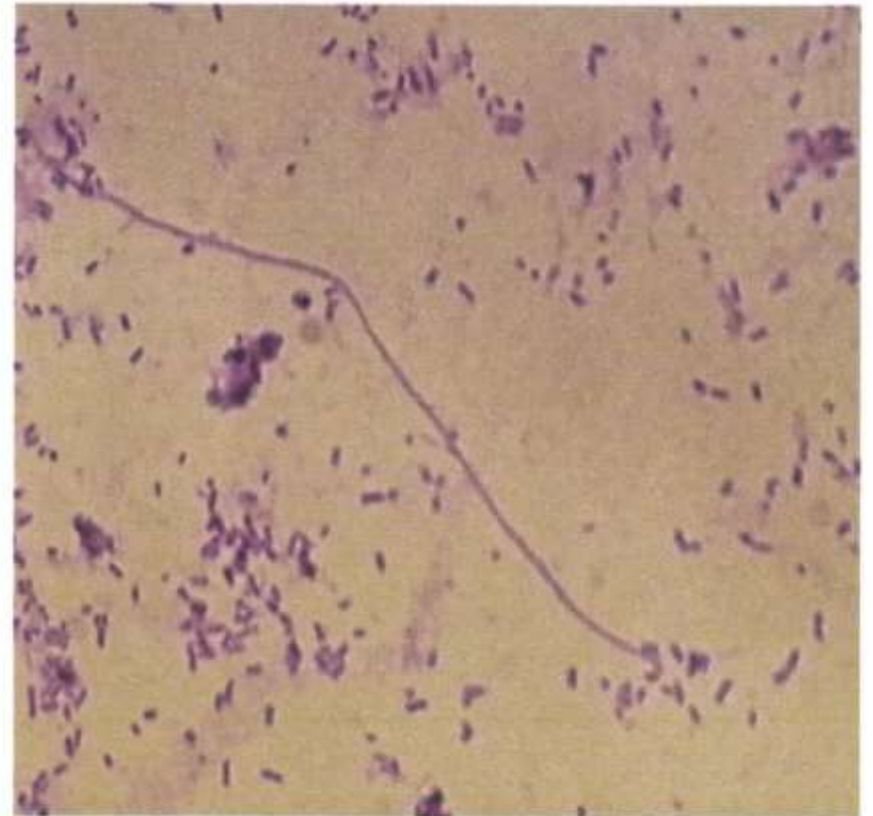
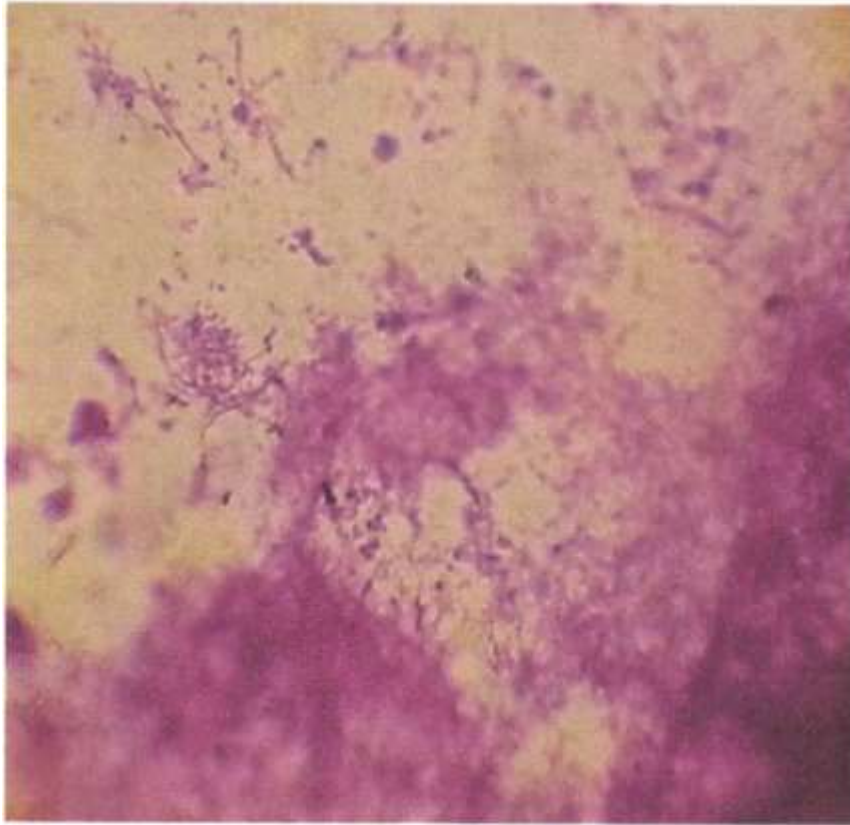
- *Fusobacterium necrophorum*.
- Это анаэробный, неподвижный, неспорообразующий, бескапсульный, чрезвычайно полиморфный микроорганизм.
- В мазках его можно видеть в виде нити, шаровидного вздутия, длинных или коротких палочек, биполярных овоидов, кокков. Длина нитей достигает 80—100 и даже 300 мкм, толщина 0,75—1 мкм.

- Лабораторная диагностика некробактериоза основана на результатах бактериологического исследования.
- Бактериологическое исследование Для исследования прижизненно берут соскобы на границе здоровой и некротизированной ткани из области венчика, межкопытной щели, ротовой полости, ноздрей и т.д. Трупы мелких животных доставляют в лабораторию целиком, от крупных животных — паренхиматозные органы и ткани с некротическими очагами. Материал лучше транспортировать и хранить при температуре выше температуры холодильника, так как при низких температурах кислород сорбируется сильнее.

- Микроскопическое исследование исходного материала. Мазки окрашивают по Граму, методу С.Н.Муромцева и Л.Новиковой (цит. по Львову В.М., 1960). В последнем случае препараты фиксируют спирт-формалином (4:1) в течение 10 минут и затем 30 секунд окрашивают раствором фуксин-синьки. Микроскопическая картина: фон — фиолетово-розовый, бактерии — синеголубые. Приготовление красителя: основной фуксин — 0,15 г, этанол 95° — 20 мл, фенол — 10 мл, метиленовый синий — 0,25 г, вода — 200 мл. Четкая микроскопическая картина получается при фиксации мазков спирт-эфиром и окрашивании в течение 2-3 секунд фуксином Циля. Может быть использована окраска по Романовскому Гимза.



- В мазках-отпечатках из исследуемого материала *F. necrophorum* имеет форму длинных, иногда переплетающихся, неравномерно окрашенных грамтрицательных нитей, длиной 10- 100 и более мкм, шириной 0,75-1,0 мкм. Длинные нити часто имеют утолщения. Кроме нитей обнаруживаются единично расположенные палочковидные клетки или цепочки из нескольких клеток, концы могут быть округлыми или заостренными. Нитевидные формы преобладают в пораженной ткани на границе со здоровой. Ближе к здоровой ткани количество нитей уменьшается. . В мазках, сделанных из центра некротического фокуса, возбудитель обычно обнаруживается в виде коротких палочек, нити встречаются реже. В мазках из плевральной и перикардальной жидкости возбудитель имеет преимущественно форму длинных нитей.



а) Через – 3 час. культивирования; б) Через – 36 час. культивирования  
после посева из патологического материала в аэробных условиях

Рис. 6

- Культивирование. Возбудитель — строгий анаэроб, оптимальное разрежение — 4 -10 мм ртутного столба, температурный оптимум 36-37° С, рН 7,4-7,6, лучше растет на средах с добавлением крови, сыворотки крови, глюкозы, лактозы, дрожжевого экстракта. Первичные посевы обычно производят на плотные питательные среды с последующей отливкой культур на жидкие среды. Из жидких сред посев материала проводят на среду Кита-Тароцци, мартеновский бульон, лучше с добавлением 10% стерильной крови барана или крупного рогатого скота, а также 0,4% глюкозы.

- Используют триглицеридный бульон с К-геминовой добавкой. Посев на жидкие среды целесообразно проводить при малом содержании возбудителя в исследуемом материале, с последующим высевом культуры на плотные среды. Для лучшего роста в жидкие питательные среды добавляют 0,4% глюкозы и витаминную К-геминовую добавку, сыворотку крови. Перед использованием среды обязательно выдерживают в течение 20-30 минут в кипящей водяной бане и охлаждают до 37-38° С. *F. necrophorum* растет в стерильной сыворотке крови. Из полужидких сред может быть использован ПЖА по Муромцеву с добавлением 5-10% сыворотки крови, 2% глюкозы, 0,2% цистина.

- В качестве плотных сред для первичной изоляции возбудителя применяют глюкозный (1%), сывороточный (10-20%) агар, глюкозо-кровоной агар. Агаровые среды готовят непосредственно перед посевом или выдерживают перед использованием в течение 6-24 часов в анаэробных сосудах. С целью стимуляции роста возбудителя рекомендуется добавлять дрожжевой экстракт, витамин К и гемин. Культивирование посевов проводят при 36-37° С в течение 5-7 суток, с ежедневным просмотром

- На сыворотно-глюкозном агаре через 48-72 часа инкубирования возбудитель формирует очень мелкие росинчатые колонии диаметром до 1 мм, которые через 4-5 суток достигают диаметра 2- 3 мм. Колонии округлые или продолговатые, с гладкой блестящей поверхностью, ровными или слегка зазубренными краями, в центре небольшое углубление, структура мелкозернистая, цвет сероватобелый или зеленоватый до желтоватого. При выращивании на кровяных агаровых средах (кровь кролика) гемолитическая активность варьирует, гемолиз типа  $\beta$  или  $\alpha$ . Колонии легко снимаются с поверхности среды и эмульгируются в физиологическом растворе.

- При культивировании на желточном агаре большинство штаммов проявляют липазную, но не лецитиназную активность. При посеве методом заливок в глубине глюкозного агара на 4-5-е сутки образуются небольшие чечевицеобразные серовато-белые колонии. Ве- 9 личина и форма колоний зависят от плотности агара. В сывороточном агаре через 2-3 суток формируются непрозрачные четко контурированные колонии с видимыми под малым увеличением микроскопа отходящими нитями.

- На полужидком печеночном агаре (0,15%) через 24-72 часа инкубирования возбудитель растет в виде облачка с интенсивным помутнением среды и заметным газообразованием. На мозговой среде возбудитель растет хорошо, после добавления к среде раствора сернокислого железа происходит ее почернение ввиду выделения возбудителем сероводорода.



- В среде Кита-Тароци рост наблюдается через 15-48 часов инкубирования в нижних слоях питательной среды, позднее — в верхних. Через 9-10 часов среда просветляется, на кусочках печени формируется ватообразный налет, разбивающийся при встряхивании в равномерную взвесь. Слабое газообразование отмечается только на ранней стадии роста культуры. Для улучшения роста возбудителя в среду добавляют 10% крови или сыворотки крови крупного рогатого скота или барана. В стерильной сыворотке крови *F. necrophorum* через 24-48 часов инкубирования растет в виде сероватых нитевидных хлопьев по всему столбику среды, с последующим формированием осадка.

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

- Для возбудителя некробактериоза характерно: отсутствие способности к гидролизу гиппурата, эскулина, образованию кислоты из галактозы, маннозы, целлобиозы, мелибиозы, сахарозы, трегалозы, раффинозы, салицина; возбудитель непостоянно расщепляет глюкозу, дает кислотообразование на среде с фруктозой, сахарозой, мальтозой. Отдельные штаммы могут ферментировать маннит, дульцит, глицерин; не расщепляет желатину и свернутую сыворотку, не редуцирует нитраты, образует индол и сероводород

Биопробу проводят с целью выделения чистой культуры возбудителя и проверки патогенных свойств. Выделение чистой культуры возбудителя, ввиду частой контаминации материала сопутствующей микрофлорой, путем посева на питательные среды не всегда успешно. Поэтому изоляция возбудителя с использованием биопробы имеет существенное диагностическое значение. Из лабораторных животных чувствительны кролики и белые мыши. Наиболее удобной лабораторной моделью является кролик.

- Биопробу проводят одновременно с посевом материала на питательные среды. Исследуемый материал растирают в физиологическом растворе (1:10) и вводят кроликам в дозе 0,5-1 мл подкожно в область средней трети наружной поверхности уха или внутрикожно в область живота. Белым мышам материал вводят в дозе 0,2-0,4 мл подкожно у основания хвоста. В случае необходимости аналогичным образом животных заражают выделенной культурой. Наблюдение за животными осуществляют в течение 10 суток. В положительных случаях на месте инъекции через 3-4 дня или позднее развивается воспалительный процесс с некрозом кожи.

- **УСТОЙЧИВОСТЬ**

- Возбудитель некробактериоза относительно нестойкий микроб, но может длительное время сохраняться в различных объектах внешней среды.
- В фекалиях сохраняет жизнеспособность до 50 суток, в моче — до 15 суток, на поверхности почвы, покрытой травой, — до 10 суток, в почве летом — 15 дней, зимой — не более 60 дней, в водопроводной и дистиллированной воде — до 15 суток, молоке — до 35 суток, в физрастворе — до 45 суток.
- При воздействии прямых солнечных лучей погибает через 12 ч.
- Культуры, высушенные при доступе воздуха, теряют жизнеспособность через 72 ч, лиофильно высушенные и помещенные в анаэробные условия сохраняют ее до 15 месяцев; в замороженном состоянии в культурах бактерии выживают 30...40 дней.

- **Токсигенность.**

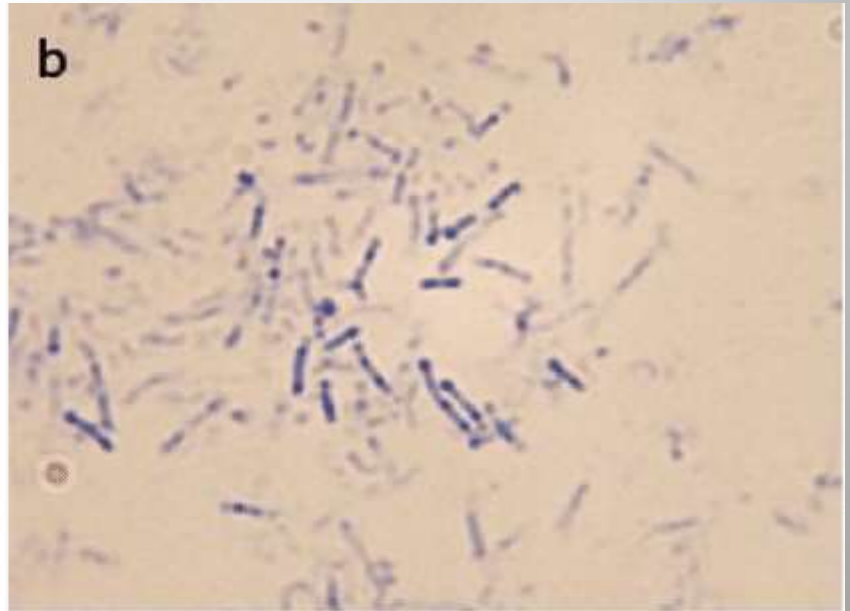
- Возбудитель некробактериоза продуцирует экзотоксин, эндотоксин и гемотоксин. Экзотоксин вырабатывается при культивировании микроба в жидких питательных средах, максимальная концентрация его достигается в 24...36- часовых культурах. Более интенсивно его синтезируют штаммы, выделенные от лошадей. Этот токсин нестоек и разрушается при 55 °С в течение 10 мин, при 100 °С — через 5 мин. Добавление к экзотоксину 0,3 % формалина переводит его в анатоксин.
- Гемотоксин интенсивно продуцируется на средах из свежего мяса с добавлением пептона, 0,5 % глюкозы, фосфата натрия и небольшого количества крови; обладает термолабильными свойствами и разрушается при 48 °С через 15 мин, при 56 °С полностью инактивируется, при 4 °С сохраняется 2 месяца. Лизирует эритроциты лошади, крупного рогатого скота, барана, свиньи, морской свинки, кролика и голубя.

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





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



- Лабораторная диагностика копытной гнили основана на результатах бактериологического исследования
- Для микроскопического исследования готовят мазки-отпечатки из свежепораженных участков основы кожи копытец и слизи, покрывающей кожу межпальцевых щелей. Для биопробы материал берут из различных участков копытец и используют для постановки биопробы.

- Для выделения культуры возбудителя и транспортировки жидкий материал отсасывают в стерильные шприцы, удаляют из них воздух, иглы сгибают. Посмертно отбирают кусочки свежепораженной ткани размером 2 см<sup>3</sup>. Материал можно также собирать стерильными тампонами, свободными от кислорода, стерилизованными во флаконах, заполненных азотом. Процедуру взятия материала такими тампонами проводят максимально быстро и затем тампон глубоко погружают в транспортную среду Cary-Blair. Кусочки тканей, шприцы с материалом помещают в специальные анаэробные контейнеры, пластиковые термостабильные контейнеры с газогенерирующим содержимым и индикатором анаэробных условий. Исследуемый материал хранят (транспортируют) при температуре выше 4-6° С. Все виды материалов необходимо исследовать в течение пяти часов

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

- Культивирование. *B.nodosus* —строгий анаэроб, температурный оптимум 37-38° С, рН 6,7-7,2. Анаэробные условия создают путем удаления из анаэроостата воздуха до разрежения 25 мм ртутного столба с последующим введением 5-10% CO<sub>2</sub>, 5-10%) H<sub>2</sub> или азота с 10% H<sub>2</sub>. Процедуру повторяют трехкратно. Для этой же цели могут быть использованы газ-пакеты. В обоих случаях используют в качестве индикатора анаэробноза раствор метиленового синего, который при рН 7,0 и Eh 71 мВ полностью окислен (окрашен), а при Eh 49 мВ — восстановлен (бесцветный).

- Посев и культивирование осуществляют в соответствии с принципами Хангейта для строгих анаэробов. Агаровые среды в чашках Петри выдерживают в анаэробных условиях до посева в течение 8-24 часов и сразу же после посева помещают в анаэробные условия. Если такой возможности нет, чашки помещают в сосуд, продуваемый CO<sub>2</sub> свободным от кислорода. Посевы проводят платиновыми или никелевыми, но не нихромовыми петлями. Пипетки, используемые для посева, предварительно заполняют стерильным газом. Манипуляции при посеве исследуемого материала на питательные среды осуществляют в потоке CO<sub>2</sub> свободного от кислорода.

- Первичные посе́вы производят на обогащенные плотные агаровые среды: кровяной (5%) агар на основе сердечно-мозгового, триптически-соевого агара, бруцелла-агара, плотной среды Бектемирова. К указанным средам в качестве стимулятора роста добавляют 15 лют витамин К, гемин и дрожжевой экстракт. В качестве питательной селективной среды, а также для определения пигментообразования применяют Brucella-агар с канамицином, который добавляют до автоклавирования, ванкомицином и 5% лаковой крови. Последнюю получают путем трехкратного замораживания и оттаивания.

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



- Посевы на плотных средах начинают просматривать через 48 часов инкубирования в потоке обескислороженного CO<sub>2</sub>. Обращают внимание на образование пигмента на среде с лаковой кровью. На плотных питательных средах *V. nodosus* может формировать колонии трех типов: В, М и С. Колонии В-типа сосочковидные или сферические, обычно формируют вирулентные штаммы, выделяемые от овец. Мукоидные колонии (М-тип) образуют менее вирулентные штаммы от овец и крупного рогатого скота. Колонии Стипа — гладкие, появляются в результате пассирования культур на питательных средах и характерны для штаммов, утративших вирулентность. Часто в поверхности среды под колониями, после их снятия, обнаруживаются углубления. Колонии обычно имеют серобелый цвет и через 3-7 дней инкубирования достигают диаметра 0,5-3,0 мм.

- Размер и форма колоний зависят в определенной степени от состава и консистенции питательной среды. На кровяном агаре с 1,5% агар-агара большинство штаммов образуют мелкие (до 1 мм), гладкие, плоские, прозрачные, с выпуклым центром и неровными краями колонии. На аналогичной среде с 3% агар-агара тот же ви- 16 рулентный штамм формирует более крупные (диаметр 1,5-2,0 мм) шероховатые колонии. Гемолитической активностью *V. nodosus* не обладает.

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

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

- Патогенность.
- К копытной гнили восприимчивы овцы и козы любого возраста, пола и породы, но ягнята до отъема обычно не заболевают. Первые вспышки болезни возникают вскоре после ввода в благополучные отары больных или переболевших животных. При недостаточной эффективности мер борьбы болезнь может принять стационарный характер.
- Устойчивость.
- Устойчивость во внешней среде незначительна. На пастбищах сохраняется не более двух недель, но в копытном роге жизнеспособен до трех лет. При 90°C погибает за 1 мин.

- Профилактика и меры борьбы
- Необходимо создать хорошие условия содержания животных и обеспечить полноценными кормами. Введенных в хозяйство овец, коз подвергают месячному карантину. Не реже одного раза в 2 мес. следует проводить ветеринарный осмотр и расчистку копыт у всех животных отары. Кроме того, не менее двух раз в год организуют профилактическую обработку копыт 10 %-ным раствором формалина или 5 %-ным параформом. Можно использовать ванны с раствором медного купороса (5 -30 %), раствором цинка сульфата (10-20 %). При появлении болезни ферму (отару) объявляют неблагополучной и вводят ограничения. Не реже одного раза в 10 дней осматривают всех овец и тщательно расчищают копытца с целью выявления животных в начальной стадии заболевания.
- Овец нужно содержать в сухих помещениях, днем их кормят в выгульных дворах с навесами. Необходимо следить за состоянием копыт у овец, систематически очищать и подрезать разросшийся копытный рог.

- **Спасибо за внимание!**