

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт»

МУСАЕВА А. К.

ЛИСТЕРИОЗ ЖИВОТНЫХ И МЕРЫ БОРЬБЫ

Одним из важнейших звеньев в системе противолистериезных мероприятий является диагностика, поскольку своевременная постановка диагноза позволяет в короткий срок изолировать больных животных – основных источников инфекции. В неблагополучных пунктах с неясной эпизоотической ситуацией необходимо проводить экспертизу патологического материала от больных и абортировавших животных на наличие возбудителя листериоза с дальнейшим проведением работ по идентификации, дифференциации выделенных культур, так как все последующие противолистериезные мероприятия должны базироваться на результатах диагностических исследований, полученных при комплексном изучении изолятов листерий.

В докладе приводятся данные, проведенные с 2009 в хозяйствах Алматинской области РК. Ежегодно в стационарно неблагополучных хозяйствах области проводили бактериологические исследования биоматериала от больных и патматериала от павших животных по обнаружению возбудителя листериоза. Диагностические исследования проводились с использованием бактериологических, биохимических, серологических исследований, постановкой биопробы. Из биологического и патологического материала от животных выделяется культура *Listeria monocytogenes* – возбудитель листериоза.

Листериоз - инфекционная болезнь человека и многих видов животных, которая чаще всего встречается у овец и свиней, реже у крупного рогатого скота и коз, промысловых животных, пушных зверей, кроликов, домашних и диких птиц, лошадей, лисиц, хорьков, кур. Листериоз протекает либо в септической форме (кролики, морские свинки, мыши, поросята), либо с явлениями нервного синдрома и значительным расстройством центральной нервной системы (свиньи, крупный рогатый скот, овцы, лисы). Листериоз может сопровождаться **абортами у крупного рогатого скота, овец и коз**. Листериозу свойственно природная очаговость и стационарность.

В естественных условиях листериозом поражаются все виды домашних и диких животных (все теплокровные животные и человек). Основным резервуаром возбудителя в природе являются некоторые виды диких животных, особенно грызуны.

При листериозе у различных видов животных, а также у человека отмечается значительное повышение числа моноцитов в крови (отсюда и название *Listeria monocytogenes*).

По данным Алматинского регионального филиала РГП (Республиканское государственное предприятие) «Республиканская ветеринарная лаборатория» в 2009 году из исследованных 3786 проб биоматериала от крупного рогатого скота возбудитель листериоза выявлен в 28 пробах; из 2384 проб от мелкого рогатого скота) – в 16 пробах.

В хозяйствах Алматинской области листериоз сельскохозяйственных животных встречается. С 2009г в хозяйствах Алматинской области (КРС-1.238.750; МРС-4.214.520; Св-55.950; Лош-393.756; Верб-7.935) проводили исследования по обнаружению возбудителя листериоза, представленные патматериал и биоматериал составляют примерно 1% разных видов животных.

По нашим данным, по Алматинской области в стационарно неблагополучных хозяйствах, имеющих крупный и мелкий рогатый скот, проводили бактериологические исследования биоматериала от больных и патматериала от павших животных по обнаружению возбудителя листериоза.

Листериоз обнаруживается у 10-30% исследованных животных.

Считаю, что магистранты должны уметь ставить Диагноз на листериоз классическим методом; знать методы профилактики посредством Вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, и есть Вакцина против листериоза животных Листекс (Производят Ставрополь и Армавир). Обе вакцины надо сказать очень хорошие, иммуногенность высокая, в свое время этой вакциной вакцинировали весь Советский Союз, позже СНГ, и Европа.

Бактериологическое исследование со всеми вытекающими из него методами уточнения диагноза, включая дифференциально-диагностические среды, являются основными исследованиями при проведении диагностики болезни - при определении причины заболевания или падежа животных.

При проведении мониторинговых исследований будущие магистры должны уметь отличать задачи диагностических исследований с использованием бактериологических исследований и мониторинговых исследований с использованием плановых исследований, преследующая цель – как можно раннее выявление превалентности (**число источников возбудителя инфекции**) болезни на основе изменения инцидентности (**число вновь возникших источников инфекции – скорость распротр бол**). Вот в мониторинговых исследованиях сыворотку крови больших групп животных и используется ИФА как современный метод постановки диагноза на листериоз. Набор диагностический на 184 определений стоит 200 тыс тенге, но определяет специфические антитела класса G к бактериям *Listeria monocytogenes* в сыворотке крови животных. Принцип метода заключается: Бактериальный антиген *Listeria monocytogenes*, адсорбированный в лунках планшета, связывается со специфическими антителами, присутствующими в сыворотке крови, в результате чего образуется комплекс антиген-антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется конъюгатом, фермент которого, после добавления субстрата, вызывает разложение субстрат – индикаторного раствора и образование растворимого окрашенного продукта. При этом интенсивность окраски раствора в лунке пропорциональна содержанию антител в исследуемом материале. Как видите, мониторинговые исследования с использованием иммуноферментного анализа устанавливает переболевших или вакцинированных животных, еще надо различать диагностический титр антител от поствакцинальных. Этот современный метод исследования, направленный на установление специфических противолистериезных антител, во-первых дорогостоящий, для единичных исследований с целью постановки диагноза на листериоз невозможно купить; во-вторых не связан с выделением и идентификацией возбудителя листериоза у животных - *Listeria monocytogenes*.

Поэтому, основным и надежным методом при постановке диагноза на листериоз является бактериологический с индикацией и идентификацией возбудителя болезни.

Для бактериологического исследования на листериоз отбирается: головной мозг, доля печени, почка.

В патологическом материале с подозрением на листериоз - в паренхиматозных органах павших животных характерные патологоанатомические изменения: меняется цвет паренхимы печени, мягкой глинистой консистенции, бывает разложившаяся; селезенка кровенаполнена, темного цвета; паренхима почки мягкой консистенции, цвет изменен. Предоставленные патологические материалы были отобраны от трупов животных, доставлялся и биоматериал: фекалий, носовой смыв, смыв из конъюнктивы глаз.

Бактериологические исследования проводили путем посева суспензии из головного мозга и паренхиматозных органов на физиологическом растворе в соотношении 1:5 на питательные среды МПБ (мясо-пептонный бульон), МПА (мясо-пептонный агар). При приготовлении сред для лучшего роста листерий добавляли 3% сыворотки крови КРС, 3% глюкозы и 2% глицерина. Через 24 ч культивирования посевов в термостате при 25°C в МПБ наблюдалось легкое равномерное помутнение бульона, на МПА выросли колонии мелкие, росинчатые, блестящие, вязкой консистенции, в проходящем свете наблюдали нежный рост колоний - мелкие выпуклые беловатые колоний. Из головного мозга и печени готовили мазки-отпечатки. Мазки из суточных культур листерий и мазки-отпечатки окрашивали по Граму.

В окрашенных по Граму препаратах бактерии рода листерия установлены в виде коротких палочек, располагающихся одиночно и попарно. Возбудитель листериоза представляет собой грамположительные с закругленными концами палочки, которые могут быть полиморфными. Характерной особенностью листерий является то, что отдельные 2 бактерий располагаются по отношению друг к другу в виде римской цифры V или летящей чайки (важный дифференцирующий признак). Суточная культура листерий, выделенная от теленка, представлена на рисунке 1-2.

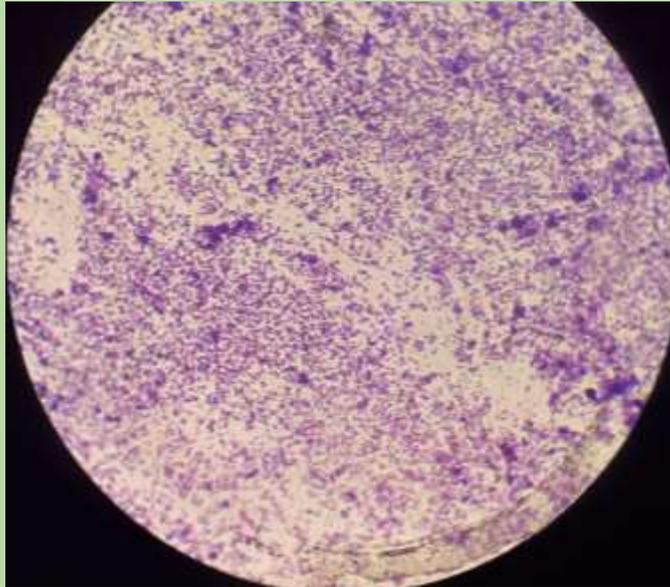


Рис 1- Культура листерий в мазке, окрашенном по Граму (густой мазок).

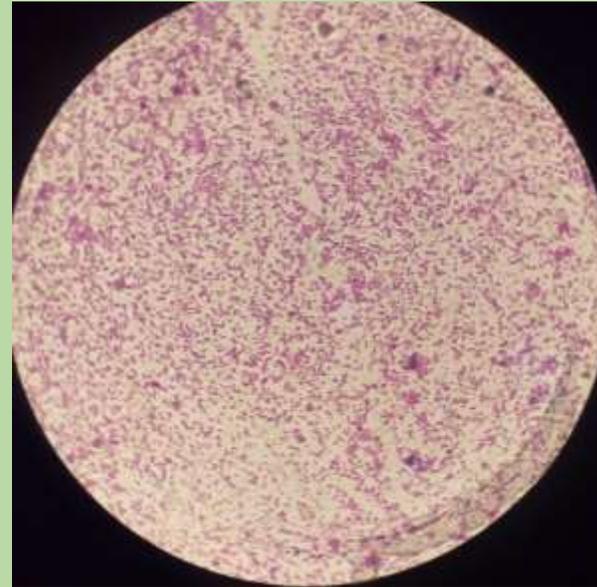


Рис 2- Культура листерий в мазке, окрашенном по Граму (редкий равномерный мазок).

Остановимся на Дифференциальной диагностике от *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Эризипелотрикс русиопате):

В связи со сходством культуральных и морфологических свойств листерий и рожистых бактерий,

их необходимо различать по следующим признакам. Дифференциальные признаки бактерий листерий и рожи свиней приведены в таблице 1.

Таблица 1-Дифференциальные признаки листерий и бактерий рожи свиней

	Окраска по Граму	Подвижность	Сбраживание салицина	Заражение морских свинок (конъюнктивальная проба)	Перекрестная агглютинация
Листерии	+	+	+	+	-
Бактерии рожи свиней	+	-	-	-	-

Учитывая указанные признаки в таблице 1, необходимо иметь в виду, что исследования на подвижность и окрашивание по Граму следует производить в культурах не позднее суточного возраста, в старых культурах теряется подвижность и появляются грамотрицательные клетки. Для установления подвижности листерии рекомендуют выращивать при комнатной температуре, так как при культивировании при 37°C термолабильные жгутики у листерий разрушаются и подвижность их прекращается.

Таким образом Эризипелотрикс: морфология сходна, но нет двух бактерий, располагающихся в виде

римской цифры V или летящей чайки;

на кровяном агаре не дает бетегемолиза; каталазонегативны; неподвижны;

не расщепляет ЭСКУЛИНА; медленно сбраживает декстрозу с небольшим кислотообразованием характерен рост в уколе в желатине при 22°C; Не агглютинирует с листериозными сыворотками.

Дальнейшую идентификацию возбудителя листериоза проводили путем определения подвижности методом висячей капли 12-часовой бульонной культуры, выращенной при комнатной температуре. Для установления подвижности листерий культуры выращивали на ПЖА при комнатной температуре, так как при культивировании при 37°C термолабильные жгутики у листерий разрушаются и подвижность их прекращается. На ПЖА отмечался характерный рост по линии укола в виде зонтика, в культуре листерий были подвижны.

При хранении патологического материала в холодильнике при +4°C происходит размножение и накопление листерий. Поэтому в качестве дополнительного диагностического метода использовали исследуемый материал в течение 30 дней для проведения повторных исследований через каждые 10 дней путем посева на МПБ и МПА. В трех повторностях посевов изолята выросли культуры листерий с характерными культурально-морфологическими признаками.

Изучением биохимических свойств установлено, что при посеве суточных культур на среды Гисса листерии ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, рамнозу, салицин, левулезу, несколько медленнее - сахарозу, растворимый крахмал и глицерин; не ферментировали арабинозу, дульцит, инулин, сорбит; не образовывали индола и сероводорода, не разжижали желатин, не восстанавливали нитраты в нитриты. При посеве суточных культур на среды Гисса листерии ферментировали с образованием кислоты без газа рамнозу, салицин, сахарозу. Биохимические свойства тоже подтверждают принадлежность изолятов к роду *Listeria*.

Сильное кислотообразование при расщеплении: Декстроза, Мальтоза, Левулеза, Салицин, Эскулин.

Для дальнейшей идентификации определяли каталазную активность листерий: к 1 мл суточной бульонной культуре и агаровой культуре добавляли 1 мл свежеприготовленной 5%-ной перекиси водорода. Вследствие присутствия фермента каталазы у выращиваемой культуры перекись водорода разлагается с образованием кислорода (пузырьков газа). В наших опытах в пробирочной и пластинчатой реакциях агглютинации наблюдалось газообразование (бурлило), поэтому выделенная культура предварительно идентифицирована как *Listeria*.

Определение каталазной активности листерий: к 1 мл суточной бульонной культуры и агаровой культуре добавляли 1 мл свежеприготовленной 5%-ной перекиси водорода. Вследствие присутствия фермента каталазы у выращиваемой культуры перекись водорода разлагается с образованием кислорода (пузырьков газа). В наших опытах в пробирочной и пластинчатой реакциях агглютинации наблюдалось газообразование (бурлило), поэтому выделенная культура предварительно идентифицирована как *Listeria*. Выделенный изолят отнесен к бактериям рода *Listeria*.

Для дальнейшей идентификации выделенных культур, выполняли посевы на селективную диагностическую среду Palkam для культивирования изолята, основными питательными веществами в составе которого являются пептический перевар животной ткани (пептон), дрожжевой экстракт, Д-маннит, хлорид натрия, хлорид лития, агар-агар с добавлением крахмала, водорода, железо-аммонийного цитрата, эскулин, А глюкоза и феноловый красный. Для идентификации листерий применялась среда Palkam (фирмы Himedia Laboratories Pvt. Marg. Munbai (Индия)). Перед изготовлением к среде добавляется два антибиотика (полимиксин-В, цефтазидим) и краситель (акрифлавин). Антибиотики ингибируют рост сопутствующей микрофлоры, обеспечивают селективный рост *Listeria monocytogenes*.

Таблица 2 Состав дифференциально-диагностической среды PALCAM:

№п п	Ингредиенты	Грамм/литр
1	Пептический перевар животной ткани	23,00
2	Крахмал	1,00
3	Натрия хлорид	5,00
4	Д-маннит	10,00
5	Железа аммонийного цитрат	0,50
6	Эскулин	0,80
7	АГлюкоза	0,50
8	Лития хлорид	15,00
9	Феноловый красный	0,08
10	Агар-агар	13,00
11	pH (при 25°C)	7,0±0,2

В составе дифференциально-диагностической среды из питательных веществ Пептический перевар животной ткани, крахмал и Агар-агар, все остальные компоненты направлены на то, чтобы избирательно удовлетворять потребности микробных клеток листерий, чтобы росли только клетки листерий.

В процессе приготовления питательной среды с Феноловым красным придает среде красный цвет, а в процессе роста бактерий разложение Железа аммонийного цитрата, Эскулина, Лития хлорида создает потемнение среды под колониями в темно-серый – черный цвет. Сами колонии прокрашиваются в серо-зелёный или оливково-зелёный цвет.

Для высева культур на селективную среду Palcam использовали колоний листерий на МПА. Характерные колонии листерий бактериологической петлей пересекали на селективную диагностическую среду Palcam. Через 24 часа инкубирования на селективной среде Palcam отмечался обильный рост мелких, серовато-зелёных или оливково-зелёных колоний с чёрным ореолом, диаметром 0,5-1,0 мм. Через 48 часов колонии диаметром 1,0-2,0 мм приобретали зеленую окраску с углубленными центрами, окруженными чёрным ореолом. Эскулин в составе среды образует комплекс с ионами железа оливково-зеленого или черного цвета, который окрашивает колонии *Listeria monocytogenes*. Рост *Listeria monocytogenes* на дифференциально-диагностической среде Palcam представлен на рисунке 3-5.



Рис 3 – рост изолированных колоний листерий на среде Palcam



Рис 4 - рост листерий (посев штрихом) на дифференциальной среде Palcam. Посев выполнен магистром Е. Шакибаевым.



Рис 5 - рост листерий на селективной среде Palcam. Фото чашки Петри с открытой крышкой, четко видна росинчатая форма колоний.

Для дальнейшей идентификации делали посев на селективную среду Listeria Selective Agar (Twin Pack) Part A и Part B – Селективный агар для листерий (двухкомпонентный) часть Ф и Часть В.

Рост культуры изолята листерий на селективном агаре представлен на рисунке 6-7.



Рис 6-7 – Рост культуры изолята листерий на питательной среде Селективный агар для листерий при сплошном посеве на МПА в чашке Петри и при посеве штрихом. Где отдельные колонии *Listeria monocytogenes*: круглые, выпуклые, росинчатые и зеленого цвета. А когда посев штрихом, не отрывая петлю от агара, рост листерий газоном, встречаются и отдельные колонии.

Видовую идентификацию проводили методом определения лецитиназной активности листерий. К среде ГРМ №1, содержащей 5% вытяжки желтка куриного яйца в 50% содержании питательного агара, добавляли порошкообразный активированный уголь до концентрации 0,5%. Для определения лецитиназной активности исследуемую культуру и контрольный штамм листерий пересевали штрихами в 2 чашки среды ГРМ №1 (без активированного угля) и 2 чашки с добавлением активированного угля. Инкубировали 48 ч при температуре 25°C, после чего чашки просматривали в проходящем свете и определяли наличие активности в присутствии активированного угля. Эталонный штамм *Listeria ivanovii* давала плотную зону помутнения независимо от присутствия активированного угля, *Listeria monocytogenes* образовывала аналогичную зону помутнения в присутствии активированного угля и не образовывала в отсутствие активированного угля. Это биохимическое свойство отличает *Listeria monocytogenes* от других видов рода *Listeria*.

Научно-исследовательские работы по определению лецитиназной активности листерий нами были проведены ранее, которые отражены в наших публикациях [1,2,3]. Представленные на рисунке 3-4 фотографии по определению лецитиназной активности листерий в мясе (баранина) выполнены научным сотрудником Казахского научно-исследовательского ветеринарного института, магистром ветмедицины Шакибаевым Ерденом.

Это биохимическое свойство отличает *Listeria monocytogenes* от других видов рода *Listeria*. Этот метод позволяет дифференцировать вид *Listeria monocytogenes* от другого вида листерий, например от эталонного штамма *Listeria ivanovii*.

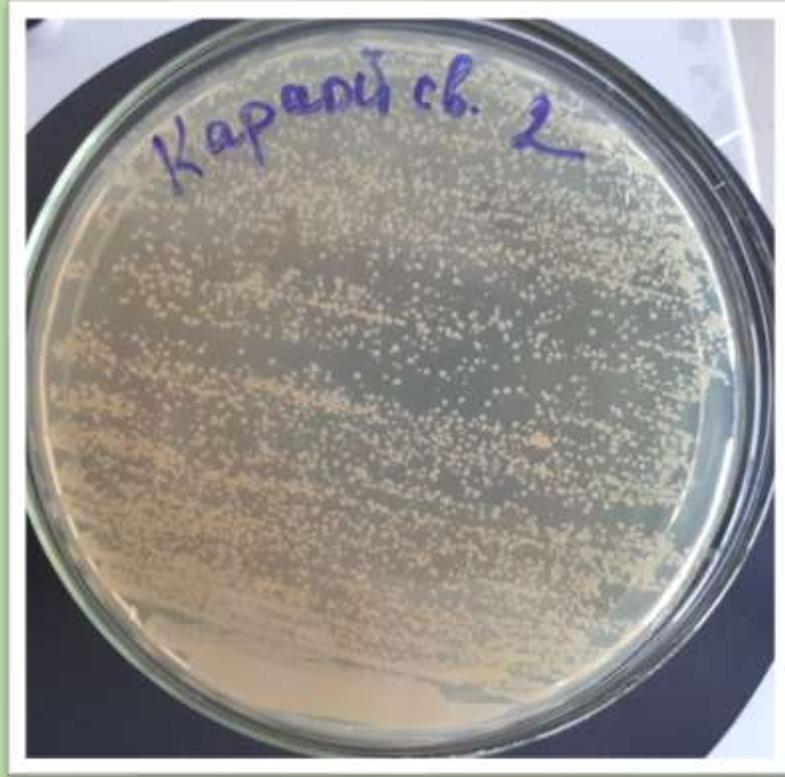


Рис 8 – культура из суспензии мяса в специальную среду для определения лецитиназной активности, где отсутствует *Listeria monocytogenes*



Рис 9 – культура из суспензии мяса в специальную среду для определения лецитиназной активности, где присутствует *Listeria monocytogenes*. Видны характерные помутнения по всему полю, где растут колонии листерий.

Серологическая идентификация листерий

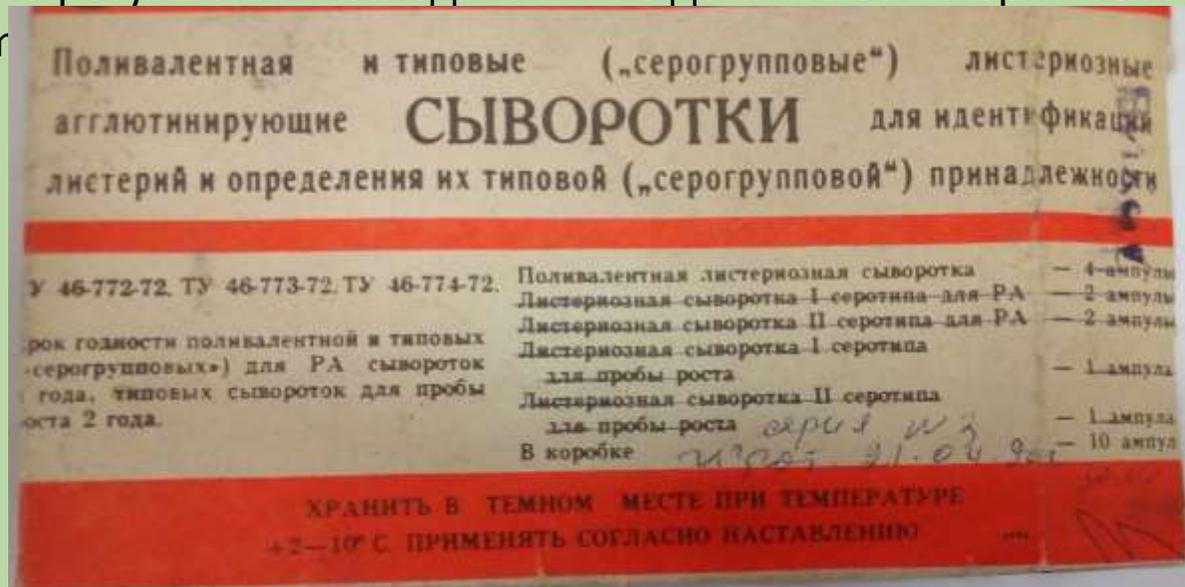
Предназначенные для идентификации 24 – часовые бульонные культуры, выращенные при 25°С, бактериологической петлей засеивали частым штрихом на 2 пробирки МПА, так, чтобы получить рост по всей поверхности агара, выращивали при комнатной температуре 24 – 30 часов. Затем агаровую культуру смывали небольшим количеством физраствора, чтобы получить густую взвесь (1 -1,5 млрд. м. к. (микробных клеток) в 1мл) для постановки РА – реакция агглютинации, пластинчатая реакция для серологической диагностики листериоза.

Для серологической идентификации выделенной культуры листерий использовали поливалентную листериозную агглютинирующую сыворотку, которая представляет собой смесь кроличьих листериозных агглютинирующих сывороток и содержит антитела Н-АВ и О-II, V, VI, VII, IX. Для проведения РА на чистое обезжиренное предметное стекло наносили две капли: каплю поливалентной сыворотки и каплю физиологического раствора (физраствора). К обеим каплям на стекле добавляли по одной капле смыва суточной культуры, смесь тщательно перемешивали бактериологической петлей, после чего стекла плавно покачивали круговыми движениями. Одновременно для контроля исследовали на стекле каплю сыворотки с добавлением капли физраствора.

Учет реакции агглютинации (РА) производили в течение 3 мин, засчитывали появление в испытуемой капле хлопьев и отсутствие их в контрольных. Поэтому у выделенной культуры идентифицирован род *Listeria*. С помощью типовых сывороток определяли серотип идентифицированных культур листерий.

С помощью типовых сывороток определяли серотип идентифицированных культур листерий. Для этого чистую бульонную 24-часовую культуру листерий заседали в 2 пробирки с МПА и выращивали при 37°C 22 ч, смыв с агаровой культуры произвели в 1 мл физраствора и ставили РА с типовыми сыворотками 1-го и 2-го серотипов. Культуры листерий агглютинировались в РА на стекле с поливалентной листериозной сывороткой. Затем выделенные культуры листерий исследовали в РА одновременно с типовыми листериозными сыворотками 1- и 2 –го серотипов (серологических типов) («серогрупп»). Сыворотка 1-го серотипа («серогруппы») содержит О – фактор II, а сыворотка 2-го серотипа («серогруппы») – О- факторы V, VI.

По результатам исследований выделенные листерий были отнесены к 1-му серотипу («серогруппе») - *Listeria m*



С использованием положительной листериозной сыворотки в **РА** определяется наличие или отсутствие возбудителя в биоматериале;

С использованием листериозного антигена (взвесь листерий в физ. р-ре, консервированная 0,7% фенолом) в **РА** определяется титр противолостериозных антител в биоматериале:

положительной в РА считается с разведением 1:100 для свиней, овец и коз, 1:50 - считается сомнительной; положительной для КРС считается 1:200, сомнительной – 1: 100.

Сомнительные результаты нужно уточнять: вакцинный титр или животное давно переболело или является листерияносителем.

Комплементсвязывающие антитела находятся короткое время, поэтому РСК не применяется.

Поэтому, основным и надежным методом при постановке диагноза на листериоз является бактериологический метод с индикацией и идентификацией возбудителя болезни.

Чувствительность выделенных культур к антибиотикам

Затем определяли чувствительность к антибиотикам выделенной культуры листерий. *Listeria monocytogenes* чувствительна к фторхинолонам: зона задержки роста бактерии наблюдается вокруг дисков офлоксацина и норфлоксацина.



Рисунок 10 – Чувствительность к антибиотикам выделенной культуры листерий: 2 – диск с офлоксацином, 6 – диск с норфлоксацином;

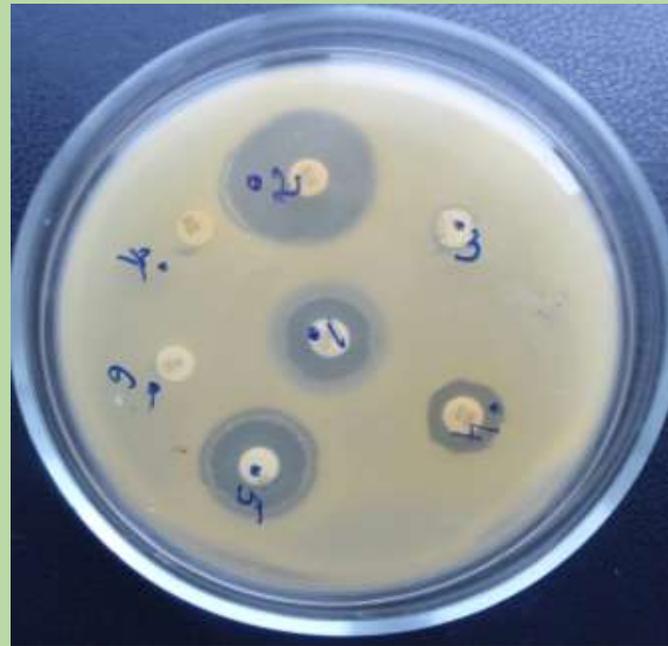


Рисунок 11 - Чувствительность к антибиотикам выделенной культуры листерий: 2 – диск с офлоксацином, 5 – диск с норфлоксацином.

Решающее значение для профилактики листериоза имеет вакцинация животных. Животных всех видов прививают вакциной сухой живой против листериоза животных из штамма «АУФ». Также необходимо комплектовать стадо животными из благополучных по листериозу хозяйствующих субъектов. Не допускать ввода вновь поступивших животных в общее стадо без предварительного изолированного содержания их в течение 30 дней.

Во время изолированного содержания, при формировании новых групп в хозяйствующих субъектах или населенных пунктах необходимо проводить клиническое обследование животных и при необходимости (при выявлении признаков поражения нервной системы, аборт, повышенной температуры тела) бактериологические и серологические исследования на листериоз.

Систематически проводить уничтожение грызунов, кровососущих насекомых и клещей. Вести строгий учет случаев абортов, мертворождения и падежа животных и направлять патологический материал на исследование в ветеринарную лабораторию.

Определение патогенности листерий

Биопробу ставили на 3 белых мышах массой 16-18 г, которым подкожно вводили по 0,2 мл суточной бульонной культуры *Listeria monocytogenes*. На 3 сутки опытные животные пали. При бактериологическом исследовании патматериала от павших белых мышей чистая культура листерий высевалась из печени, сердца.

Для диагностики листериоза ставили конъюнктивальную пробу на морских свинках. На 2 морских свинках ставили конъюнктивальную пробу введением в конъюнктивальный мешок по 0,05 мл суточной бульонной культуры *Listeria monocytogenes*. У морских свинок на 3 сутки развился конъюнктивит. Наблюдались истечения из глаза, веки опухали, развивалась светобоязнь. Через двое суток у морских свинок отмечался кератит. Конъюнктивальная проба является отличительным признаком листерий.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!