**МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минсельхозпрод России)**

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

107139, Москва, Орликов пер., 1/11.
Для телеграмм: Москва, 84
Минроссельхозпрод.
Телетайп: 417738 ЛЕН
Телефон:

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель начальника Департамента ветеринарии Минсельхозпрода России
В.М.Авилов
5 мая 1994г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

05.05.94г. № I9-7-2/83

На №

по лабораторной диагностике цитробактероза пчел

I. Общие положения

I.I. Цитробактероз - инфекционная болезнь взрослых пчел, вызываемая *Citrobacter sp.* Болезнь характеризуется наличием весной мало подвижных, ползающих пчел, неспособных к полету. Пораженные пчелы имеют мутную, беловатого цвета гемолимфу.

Citrobacter sp. - грамотрицательные палочки, необразующие спор и капсул, подвижные. Обладают основными характеристиками семейства *Enterobacteriaceae*, идентификацию *Citrobacter sp.* внутри указанного семейства проводят с помощью биохимических тестов (табл.).

I.2. Диагноз на цитробактероз ставят на основании клинических признаков болезни, результатов бактериологического исследования с учетом эпизоотологических данных.

I.3. Для исследования в ветеринарную лабораторию посылают по 50 живых пчел или трупов свежего подмора от каждой больной пчелиной семьи; при гибели пчелиных семей не менее 50 трупов пчел из верхнего слоя подмора. Пчел помещают в стеклянные банки, закрытые тремя слоями марли или консервируют в 50%-ном глицерине.

I.4. Для установления диагноза обязательно выделение чистой культуры возбудителя и определение его родовой принадлежности.

2. Лабораторное исследование

2.I. Отобранных для исследования живых пчел обездвиживают парами эфира, поверхность хитинового покрова протирают спиртом, берут гемолимфу тонким стеклянным капилляром, вводя его сбоку брюшка между сегментами, не допуская попадания в гемолимфу содержимого кишечника, и наносят ее на предметное стекло. Пчел, консервированных глицерином, отмывают стерильным физиологическим раствором (водой), обсушивают

gost.e-ecolog.ru

фильтровальной бумагой, вскрывают и отпрепарированными грудными мышцами делают мазки-отпечатки. Мазки фиксируют над пламенем в течение 1-3 с или раствором спирта-эфира (1:1) в течение 1-2 мин, окрашивают по Граму и исследуют под микроскопом.

2.2. Для выделения чистой культуры возбудителя гемолимфу или кусочки грудных мышц, отобранные как указано в п.2.1., распределяют по поверхности чашек со средой Эндо или Плоскирева и агаром Хоттингера с добавлением 5% сыворотки крови крупного рогатого скота или лошади.

2.3. Через 24-48 ч инкубирования при температуре 37°С посевы просматривают. На средах Эндо и Плоскирева цитробактер растет в виде бесцветных прозрачных колоний; более обильный рост в виде сероватого цвета колоний размером 1-2 мм шероховатых (R-формы) или слабо выпуклых гладких (S-формы) размером1 мм отмечается на средах с добавлением сыворотки.

2.4. По две типичные колонии с каждой чашки переносят на скошенный сывороточный агар Хоттингера. У выделенных культур изучают морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства с целью определения их родовой принадлежности.

Подвижность культур определяют по характеру роста в 0,2%-ном полужидком агаре Хоттингера с сывороткой крови крупного рогатого скота или лошади. Ферментативные свойства культур изучают с помощью набора питательных сред, куда входят среды Гисса с глюкозой, мальтозой, лактозой, сахарозой, маннитом, цитратно-аммонийная среда Симмонса, среда Кларка для постановки реакций с метил-ротом и Фогес-Проскауэра, мясо-пептонный бульон для определения индола, сахарный агар с сернокислым железом , среда для определения лизин-декарбоксилазы (Приложение). Для исследования биохимических свойств можно использовать пластины биохимические дифференцирующие энтеробактерий (ПБДЭ), согласно инструкции по их применению, утвержденной ГУКИ Минздрава СССР 10.10.87 г.

2.5. К *Citrobacter sp.* относят грамотрицательные, подвижные, необразующие спор и капсул палочки, утилизирующие цитрат, недезаминирующие лизин-декарбоксилазу, неферментарующие сахарозу, ферментирующие с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, маннит, необразующие ацетилметилкарбинол.

2.6. Диагноз на цитробактероз пчел считают установленным при выделении из патологического материала культур со свойствами, характерными для *Citrobacter sp.*

2.7. При необходимости определяют антибиотикоустойчивость *Citrobacter sp.* в соответствии и действующими методическими указаниями

Приложение I

к Методическим указаниям по лабораторной диагностике цитробактероза пчел

Готовят питательную среду следующего состава: гидролизат казеина–0,5 г, дрожжевой экстракт–0,3 мл, глюкоза–0,I г, L-лизин–0,5 дистиллированная вода–I00 мл. Добавляют 4,5 мл индикатора бромтимолового синего (0,I% раствора в 20% спирте); устанавливают pH среды 6,0 (среда имеет лимонную окраску). Среду разливают в пробирки по 3 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня или при 0,5 атм I5 мин. Поскольку pH среды значительно ниже оптимальной для роста культуры, необходимо при засеве брать полную петлю посевного материала. Через 20-22 ч инкубирования при наличии у культуры фермента лизиндекарбоксилазы происходит дезаминирование кислоты с образованием щелочного продукта амина, в результате чего подщелачивание среды приводит к изменению ее цвета в синий.

по данному вопросу.

2.8. Срок лабораторного исследования 4-6 сут.

Методические указания разработаны Всероссийским научно-исследовательским институтом экспериментальной ветеринарии им.Р.Я.Коваленко

Заместитель начальника отдела
Департамента ветеринарии Б.П.Антонов

Таблица

Дифференцирующие признаки встречающихся у пчел родов энтеропатогенных бактерий

№№ пп:	Citrobacter sp.	Escherichia	Salmonella	Hafnia	Enterobacter	Proteus
I. Использование цитрата	+	–	+	+	+	±
2. Тест на метил-рот	+	+	+	–	–	+
3. Реакция Фогес-Проскауэра	–	–	–	+	+	±
4. Образование индола	+	+	–	–	–	±
5. Образование сероводорода	–	–	+	–	–	±
6. Наличие лизин-декарбоксилазы	–	+	+	–	±	–
7. Глюкоза	+	+	+	–	+	+
8. Лактоза	+	+	–	+	±	–
9. Сахароза	–	±	–	–	+	+
I0. Маннит	+	±	+	+	+	–

gost.e-ecolog.ru