ГОСУДАРСТВЕННАЯ ИНСПЕКЦИЯ ПО ВЕТЕРИНАРИИ
МИНИСТЕРСТВА СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

МИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И КОРМОВ

МОСКВА — 1959

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ИНСПЕКЦИЯ ПО ВЕТЕРИНАРИИ
МИНИСТЕРСТВА СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ПРОВЕДЕНИЮ МИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И КОРМОВ

в ветеринарно-бактериологических лабораториях при диагностике микозов и микотоксикозов сельскохозяйственных животных

(Утверждены Государственной инспекцией по ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 24 июля 1959 года)

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МИНИСТЕРСТВА СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
МОСКВА — 1959

Разработаны Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии

1. Многие грибы наряду с болезнетворными бактериями и другими микроорганизмами вызывают заболевания сельскохозяйственных животных, грызунов, пушных и хищных зверей, полезных насекомых, рыб и человека.

Грибы могут быть возбудителями микозов, а также вызывать отравления (микотоксикозы) животных.

2. Диагноз болезней, вызываемых грибами, ставится на основании комплекса исследований, в который входят:

а) эпизоотологические данные;

б) клинические или клинико-гематологические исследования

в) данные патологоанатомического и гистологического исследований;

г) лабораторные исследования патологического материала и кормов, имеющие в большинстве случаев решающее значение при диагностике микозов и микотоксикозов в комплексе исследований.

3. Результаты микологических исследований патологического материала и кормов зависят от правильности сбора и пересылки материала, а также от техники его исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ МИКОЗОВ

4. Лабораторная диагностика микозов основана на обнаружении возбудителя в органах и тканях при одновременном учете эпизоотологических факторов, клинического проявления болезни и патологоанатомических изменений.

Диагностические методы и приемы обнаружения грибов-возбудителей микозов — в принципе такие же, какие используются при диагностике болезней, вызываемых бактериями.

I. Дерматомикозы (дерматофитозы)

5. Диагноз на дерматомикозы устанавливается на основании клиники заболевания и результатов лабораторного исследования методами:

микроскопии патологического материала;

люминесцентного анализа;

определения вида гриба-возбудителя путем выделения его в чистую культуру.

6. Для исследования в лабораторию направляют: волосы, чешуйки, корочки, взятые с периферии пораженного участка кожи, не подвергавшегося лечению.

Патологический материал упаковывают в пробирки или пакеты из пергаментной бумаги.

7. Микроскопическое исследование.

Волосы, чешуйки или корочки помещают в 10%-ный раствор едкого натрия (калия) на 15—20 минут. После этого небольшой кусочек материала переносят препаровальной иглой в каплю 50%-ного водного раствора глицерина на предметном стекле. Затем препарат покрывают покровным стеклом и исследуют сначала под малым (7×), потом под большим (40×) увеличением микроскопа.

Примечания: не рекомендуется пользоваться крепкими растворами щелочи или сильно подогревать препарат. То и другое разрушает расположение элементов гриба, что иногда приводит к диагностическим ошибкам.

При обработке материала лактофенолом (карболовая кислота — 20 г, молочная кислота — 20 мл, глицерин — 40 мл, дистиллированная вода — 20 мл) сохраняется морфологическая структура и препараты могут храниться длительное время.

8. Люминесцентный анализ. Для люминесцентного анализа патологического материала (как и других объектов) источником ультрафиолетовых лучей является ртутно-кварцевая стационарная или переносная лампа типа ПРК-4, со светофильтром (стеклом Вуда), задерживающим видимую часть лучей и пропускающим ультрафиолетовые лучи.

Люминесцентный анализ производят в затемненном помещении. Лампу включают в электросеть и спустя 3—5 минут приступают к исследованию. Изучаемый объект помещают на столик под ртутно-кварцевую лампу на расстоянии 20 см от светофильтра. Объектом исследования на дерматомикозы являются волосы.

9. Культивирование. Для выделения грибов дерматофитов в чистую культуру используют пораженные волосы, которые освобождают от корочек, измельчают на прокаленном над пламенем горелки стекле или в стерильной чашке Петри и петлей переносят на поверхность питательной среды — сусло-агар и агар Сабуро с глюкозой.

В пробирки засевают 1—2 кусочка волоса 1—2 мм длины на расстоянии 1 см один от другого. Засевают 8—10 пробирок и культивируют при комнатной температуре. Засевать чешуйки или корочки не рекомендуется, они содержат большое количество посторонней микрофлоры, загрязняющей посевы.

Для посева можно отбирать пораженные волосы с помощью микроскопа или волосы, дающие свечение (микроспорум) при облучении ультрафиолетовыми лучами.

Выросшие колонии исследуют микроскопически. Для этого стерильной петлей снимают кусочек мицелия вдоль краев колоний, кладут его на предметное стекло в каплю 50%-ного раство ра глицерина или лактофенола, покрывают покровным стеклом и исследуют.

10. Предварительный диагноз на дерматомикозы ставят на основании данных микроскопического и люминесцентного (на микроспорию) исследований патологического материала с обязательным указанием типа поражения волоса.

Срок микроскопического исследования — одни сутки.

Срок микологического исследования — 10—30 дней.

ТРИХОФИТИЯ (ТРИХОФИТОЗ)

11. Возбудители: грибы рода Trichophyton. Основные виды: *Фавиформный трихофитон* — Trichophyton faviforme.

Гриб поражает крупный рогатый скот, реже лошадей, собак и еще реже коз и овец.

Гипсовый трихофитон — Trichophyton gypseum поражает крупный рогатый скот, лошадей, собак, кошек, морских свинок, мышей, обезьян, крыс, свиней. Встречается реже, чем фавиформный трихофитон.

Лошадиный трихофитон — Trichophyton equinum. Возбудитель трихофитии лошадей.

Морфология трихофитонов в патологическом материале. Гифы мицелия в волосе, с перегородками, располагаются правильными рядами по длине волоса. Споры одноклеточные круглые или овальные. Характерной особенностью грибов рода трихофитон является расположение спор в виде цепочек на волосе или внутри его и образование чехла из спор у основания волоса.

По расположению элементов гриба различают следующие типы поражений волоса:

а) Trichophyton ectothrix — цепочки из спор на волосе; у основания волос окружен чехлом из спор.

По размеру спор Трихофитон эктотрикс делят на две группы: крупноспоровые — ectothrix megaspores — 5—8 микрон (один из представителей этой группы— Trichophyton faviforme); мелкоспоровые — ectothrix microides — 3—4 микрона (представители — Trichophyton gypseum и др.);

б) Trichophyton endothrix—споры лежат только в волосе. Трихофитон эндотрикс является возбудителем трихофитии людей, реже животных (представитель — Trichophyton crateriforme).

В чешуйках (в эпидермисе) мицелий дерматофитов ветвящийся, иногда густо переплетен, с развитием распадается на споры, располагающиеся цепочкой и группами.

Морфология трихофитонов в культуре.

Фавиформный трихофитон (Trichophyton faviforme). Колонии медленнорастущие; бугристые, складчатые, иногда с периферической мучнистой зоной, белые (вариант album); кожистые, гладкие, желтые, коричневые (вариант discoides). Лучистый рост мицелия в питательный субстрат. Мицелий септированный, разветвленный, ровный или ракетообразный. Многочисленные круглые или многогранные артроспоры расположены цепочкой. Микроконидии и макроконидии образуются на специальных средах.

Гипсовый трихофитон (Trichophyton gypseum). Колонии на среде Сабуро образуются на 4—5 день. Они имеют правильную округлую форму, мучнисто-порошковатые, звездчатые (вариант asteroides) или зернистые (вариант granulosum), цвет белый или кремовый, оборотная сторона колонии желтая или коричневая. По морфологии колонии могут варьировать от пушистых до мучнистых.

Культуры типа гипсового трихофитона состоят из разветвленного, септированного мицелия, концы которого имеют форму спиралей, узлов и колец. В мучнистых колониях — в большом количестве мелкие, круглые микроконидии, расположенные гроздьями и одиночно на гифах. Макроконидии имеют форму веретена и состоят из 3—8 клеток. Иногда обнаруживаются хламидоспоры.

Лошадиный трихофитон (Trichophyton equinum). Колонии на сусло-агаре белые, бархатистые, в дальнейшем на них появляются радиальные бороздки. Старые колонии мучнистые. По периферии мицелий образует в питательном субстрате лучистые отростки.

Микроконидии грушевидные на коротких ножках, возникают по бокам гиф. Макроконидии рудиментарные. Хламидоспоры промежуточные и концевые.

Кратеровидный трихофитон (Trichophyton crateriforme). Колонии густомучнистые в центре, бархатистые по периферии, поверхность колонии складчатая, часто с кратеровидной впадиной в центре. Цвет колонии белый, с возрастом кремовый. Микроконидии образуются в большом количестве по бокам гиф,

формы их грушевидные или булавовидные; располагаются кистями по ходу мицелия. Макроконидии образуются редко или совсем отсутствуют. Хламидоспоры промежуточные и концевые, обнаруживаются в большом количестве в старых культурах. Мицелий септированный, часто ракетообразный на концах.

МИКРОСПОРИЯ (МИКРОСПОРОЗ)

12. Возбудители. *Пушистый микроспорум* (Microsporum lanosum) поражает кошек, пушных и хищных зверей, собак.

Лошадиный микроспорум (Microsporum equinum) — возбудитель микроспории лошадей.

Гипсовый микроспорум (Microsporum gypseum) поражает лошадей, собак, кошек, крыс, мышей. Заражается этим грибком и человек. Обнаружен в почве, как сапрофит.

Морфология грибов рода Микроспорум в патологическом материале. Мицелий непрямой, ветвистый, перегородки редкие. Споры располагаются внутри волоса, вне его и на его поверхности беспорядочно-мозаично. Размер спор от 3 до 4,5 микрона в диаметре.

Люминесцентная диагностика. Этот метод диагностики микроспории основан на способности волос, пораженных грибами рода Микроспорум (Микроспорум ланозум, Микроспорум эквинум), давать яркое зеленое или фиолетовое свечение при облучении ультрафиолетовыми лучами.

При подозрении на микроспорию волосы помещают в пробирку или в бактериологическую чашку и ставят под ртутно-кварцевую лампу для облучения.

Для выявления скрытых форм микроспории облучению подвергают весь волосяной покров животного, используя для этих целей переносные лампы. Этот метод важен также для дифференциации микроспории и трихофитии, так как волосы, пораженные грибами рода Трихофитон, не люминесцируют. Следует иметь также в виду, что у животных черной масти пораженные волосы часто не люминесцируют. Флюоресцируют также вазелин, риваноль, салициловая кислота, поэтому исследование надо проводить до обработки животных различными препаратами.

Морфология грибов рода Микроспорум в культуре. Грибы — быстрорастущие; многоклеточные, толстостенные, веретенообразные, макроконидии характеризуют род.

Пушистый микроспорум (Microsporum lanosum). На агаре Сабуро образует колонии пушистые, круглые, часто с концентрическими кругами. С возрастом мицелий становится порошко-

видным, светло-желтого (до коричневого) цвета в центре. Оборотная сторона колонии красновато-коричневого (до оранжевого) цвета.

Колонии пушистого микроспорума, выделенные от пушных и хищных зверей — вначале гладкие, желтые, позже в них появляется белый, рыхлый, воздушный мицелий; оборотная сторона колонии оранжевая.

Микроскопия. Большие многоклеточные, веретеновидные макроконидии, состоящие из 6—12 клеток, имеют зубчато-ворсистую оболочку, у некоторых вариантов оболочка гладкая. В первичных культурах по бокам возникают в небольшом количестве маленькие микроконидии. Мицелий имеет иногда вид узловатых органов, редко спиралей.

Лошадиный микроспорум (Microsporum equinum). Колонии часто кожистые, радиально-складчатые.

Микроскопия. Макроконидии более короткие и узкие.

Гипсовый микроспорум (Microsporum gypseum). Колонии быстрорастущие, порошковидные. Цвет светло-желтый до светло-коричневого. Некоторые штаммы образуют белый, ворсистый воздушный мицелий, который с возрастом становится порошковидным и светло-коричневым в центре с радиальными бороздками. Оборотная сторона колонии красновато-коричневого (до оранжевого) цвета.

Микроскопия. Макроконидии многочисленные, многоклеточные (4—6-клеточные), эллипсоидные. В первичных культурах макроконидии немногочисленные, одноклеточные, булавовидные. Иногда в культурах обнаруживают мицелий в виде спиралей, узловатых органов, а также хламидоспоры.

ФАВУС (ПАРША) ПТИЦ

13. Возбудитель: гриб Achorion (Trichophyton) galinae.

Морфология возбудителя фавуса в патологическом материале. Мицелий и споры не заполняют всего волоса, в нем также содержатся пузырьки воздуха. Мицелий в волосе преобладает. Споры имеют различную величину и располагаются группами.

Морфология гриба в культуре. Колонии белые, бархатистые, гладкие, с возрастом становятся складчатыми и растрескиваются. Иногда колонии розовые, красные.

Микроскопия. Мицелий септированный, иногда разветвленный. Макроконидии многоклеточные по бокам мицелия или на его концах (1—6-клеточные). Микроконидии расположены на боковых ответвлениях мицелия.

II. Кандидамикоз (молочница)

14. Возбудители кандидамикоза сельскохозяйственных животных дрожжевидные грибы рода Candida. Основной вид Candida albicans, реже другие виды этого рода (Candida tropicalis, Candida stellatoidea, Candida guillermondi и др.).

Заболевание наблюдается у птиц (кур, индеек) и редко у млекопитающих. Клинически кандидамикоз птиц характеризуется как подострый или хронический микоз, иногда протекающий в виде эпизоотических вспышек. Поражаются главным образом слизистые оболочки ротовой полости, пищевод, зоб; при генерализации процесса поражается кишечник, реже — другие органы.

Кандидамикоз млекопитающих характеризуется развитием маститов (крупный рогатый скот), энтеритов (свиньи) или поражаются органы дыхания.

Кандидамикоз встречается у животных всех возрастов. Молодые животные и птицы более восприимчивы к нему, чем взрослые.

Грибы рода Кандида обитают как сапрофиты у здоровых животных и птиц на слизистой оболочке ротовой полости, желудочно-кишечного тракта, верхних дыхательных путей. Они широко распространены в природе и живут на растениях, в почве, молочных продуктах, фруктах, овощах.

В большинстве случаев источник инфекции эндогенный. Заболевание чаще всего возникает у недоразвитых животных, на фоне других заболеваний, а также в результате неумелого применения антибиотиков.

Для прижизненной диагностики кандидамикоза у птицы производят соскобы со слизистой оболочки (если имеются налеты и серо-белые наложения, которые можно исследовать). Материал направляют на исследования в стерильных пробирках; иногда лучше доставить в лабораторию больную птицу.

Для посмертной диагностики в лабораторию направляют части различных пораженных органов или трупы птиц.

При массовых заболеваниях коров маститами молоко сдаивают из пораженных долей вымени в стерильные пробирки, которые срочно направляют в лабораторию. Перед взятием проб молока соски вымени тщательно протирают тампоном, смоченным в разведенном (50%-ном) спирте. Первую порцию молока, находящуюся в канале соска, сдаивают.

Для гистологического исследования материал консервируют 10%-ным раствором формалина.

Для микроскопического исследования из пораженных очагов соскобов со слизистых оболочек готовят препараты в капле 50%-ного водного раствора глицерина, нанесенной на предметное стекло. В случае необходимости (при наличии плотных корок) материал предварительно обрабатывают 10—15 минут в 10%-ном растворе едкого натрия и исследуют под большим увеличением (40×) сухой системы микроскопа. Мазки окрашивают по Граму.

Для выделения грибов Кандида в чистую культуру и дифференциации их от других дрожжевидных грибов, из присланного материала производят посевы на агар Литмана и глюкозный агар Сабуро и культивируют их при температуре 37°.

Из выделенной культуры на агаре Литмана или агаре Сабуро пересевают:

на жидкую среду Сабуро и культивируют при температуре 37°;

на морковно-картофельный агар с 2%-ной желчью или на кукурузный агар и культивируют при комнатной температуре;

на гипсовые блоки для выявления сумок (дифференциация от истинных дрожжей).

Для дифференциации видов используется также их биохимическая активность. С этой целью производят посев на цветной ряд, содержащий 1% глюкозы, мальтозы, сахарозы, лактозы, маннита. Названные сахара и спирты готовят обычным способом с реактивом Андредэ.

Морфология патогенных грибов Кандида в патологическом материале. Кандида альбиканс и другие виды Кандида в свежих препаратах имеют форму круглых, овальных, почкующихся клеток 2,5—6 микрон в диаметре, иногда в них обнаруживается мицелий с группами круглых мелких клеток — бластоспор.

В окрашенных препаратах обнаруживают грам-положительные овальные почкующиеся, дрожжевидные клетки, мицелий и бластоспоры.

Дрожжевидные почкующиеся клетки обнаруживаются в большом количестве.

Культуральные свойства. На агаре Литмана колонии гриба Кандида альбиканс в отличие от других видов рода Кандида конусовидные, выпуклые, блестящие, вначале гладкие, позже шероховатые, иногда они покрываются радиально расположенными бороздками. Окраска колоний — от темно-синей до пурпурной. Колонии других видов Кандида — плоские, бледно-синеватые с более темным центром.

На агаре Сабуро колонии гладкие, иногда с радиальными лучами. У некоторых штаммов колонии морщинистые. Цвет колоний кремовый.

Колонии состоят из овальных, круглых, почкующихся и непочкующихся дрожжевидных клеток от 1 до 6 микрон в диаметре. Ближе к субстрату и в ответвлениях колоний в глубине среды обнаруживается псевдомицелий, состоящий из удлиненных клеток с гроздьями или с группами круглых, мелких клеток — бластоспор.

На морковно-картофельном агаре с желчью через 18—24 часа Кандида альбиканс образует толстостенные, круглые клетки — хламидоспоры, отличающие его от других видов Кандида.

На жидкой среде Сабуро — рост Кандида альбиканс — глубинный.

(Дифференциация видов Кандида по культуральным свойствам — см. приложение 1).

На гипсовых блоках грибы рода Кандида сумок не образуют.

Биохимические свойства. Грибы Кандида обладают биохимическими свойствами, разлагая некоторые из сахаров. Для дифференциации используется их способность сбраживать глюкозу, мальтозу, сахарозу, редко лактозу (таблица 1).

Таблица 1

Культура \ Сахара		Глюкоза	Мальтоза	Сахароза	Лактоза
Candida	albicans	К+Г+	К+Г+	К+Г−	К−Г−
То же	tropicalis	К+Г+	К+Г+	К+Г+	К−Г−
»	pseudotropicalis	К+Г+	К−Г−	К+Г+	К+Г+
»	krusei	К+Г+	К−Г−	К−Г−	К−Г−
»	parakrusei	К+Г±	К−Г−	К−Г−	К−Г−
»	stellatoidea	К+Г+	К+Г+	К+Г+	К−Г−
»	guillermondi	К−Г−	К−Г−	К−Г−	К−Г−

Патогенность. Из лабораторных животных наиболее чувствительными к искусственному заражению Кандида альбиканс являются мыши (20-дневные) и кролики. Мышам внутрибрюшинно вводят густую (300000—500000 клеток в 1мл физиологического раствора) солевую суспензию дрожжевидных клеток гриба Кандида альбиканс, приготовленную из культуры в дозе 0,5 мл; кроликам — весом до 2 кг эту же суспензию в дозе 1 мл вводят внутривенно.

Свежевыделенная 48-часовая патогенная культура гриба вызывает гибель зараженных мышей в течение 2—7 дней, иногда смерть наступает на 9—10-й день после заражения. Единственными признаками заболевания могут быть: вялость, атаксия, лимфоцитопения. При вскрытии павших животных обнаруживаются мелкие белые узелки в печени, селезенке, легких, почках.

Вирулентные штаммы Кандида вызывают гибель кроликов в период от 3 до 10 дней. В этот период могут наблюдаться депрессия, повышение температуры, исхудание, иногда паралич. На вскрытии обнаруживают множественные серо-белые узелки в корковом слое почек.

Если зараженные кролики не гибнут за 10 дней, их убивают и при обнаружении поражения почек в виде мелких узелков в корковом слое штамм гриба определяют как слабовирулентный. Слабовирулентные штаммы могут вызывать гибель кроликов и мышей на 21—30-й день после заражения.

В мазках, приготовленных из пораженных очагов павших или убитых животных, обнаруживают дрожжевидные клетки, иногда и псевдомицелий.

Окончательный диагноз. Учитывая сапрофитный образ жизни грибов этой группы, окончательный диагноз устанавливают на основе эпизоотологических данных, клинических исследований, патологоанатомической картины вскрытия и полного лабораторного исследования. Исключение инфекционных заболеваний является обязательным.

При оценке результатов лабораторного исследования патологического материала необходимо учитывать место обнаружения гриба и количество обнаруженных дрожжевидных клеток при микроскопическом исследовании. Обнаружение в органах или тканях большого количества элементов гриба имеет решающее значение для лабораторного диагноза. Обнаружение Кандида в крови, моче и во всех закрытых очагах независимо от количества клеток является решающим фактором при постановке диагноза. При обнаружении Кандида в легких диагноз может быть поставлен только после исключения других легочных заболеваний; в данном случае решающее значение имеет гистологическое исследование.

Если результаты анализа дают основание подозревать кандидамикоз, то биологическое исследование проводят повторно. Срок исследования — до 10 дней.

III. Эпизоотический лимфангоит

15. Возбудитель — Cryptococcus (Hystoplasma) farciminosus.

В лаборатории диагноз на эпизоотический лимфангоит ставится на основании положительных результатов микроскопического исследования гнойного эксудата из абсцессов, язв.

Исследование материала производят в неокрашенных препаратах — в капле 50%-ного раствора глицерина (методом раздавленной капли между предметным и покровным стеклами).

Морфология гриба Cryptococcus farcimi-nosus в патологическом материале. В гнойном эксудате, в гранулематозных поражениях. возбудитель болезни гриб Криптококкус фарциминозус обнаруживается в дрожжевидной и реже в мицелиальной форме. Дрожжевидные клетки (криптококки) овальные, яйцевидные с двуконтурной оболочкой находятся в лейкоцитах и обнаруживаются свободно лежащими. Размеры 3—4,5 микрона длины и 2,4—3,5 микрона ширины.

Мицелий слабо разветвлен, септированный, 2,1—4,2 микрона ширины.

Срок исследования—одни сутки.

IV. Аспергиллез

16. Возбудитель аспергиллеза — грибы рода Aspergillus. Основной вид Aspergillus fumigatus редко Aspergillus flavus, Aspergillus niger.

Заболевание наблюдается у различных видов птиц: домашних, диких, живущих в неволе, и редко у млекопитающих.

Клинически аспергиллез птицы характеризуется как острый или хронический микоз, часто протекающий в виде эпизоотических вспышек. Поражаются главным образом органы дыхания: легкие, трахея, воздухоносные мешки. Чаще болеет молодая птица.

Аспергиллез млекопитающих заболевание редкое и характеризуется развитием узелкового процесса в легких.

Основным источником микоинфекции в хозяйстве являются: зараженные инкубаторы, гнезда, почва, корма, яйца.

В большинстве случаев аспергиллез птиц (и млекопитающих) диагносцируется после ее гибели или убоя.

Патологоанатомические данные при хроническом аспергиллезе могут оказать существенную помощь в постановке диагноза на аспергиллез в хозяйстве.

Патологоанатомический диагноз. Острый аспергиллез птицы характеризуется эксудативной пневмонией; отечностью легочной ткани, иногда на поверхности и на разрезе обнаруживаются узелки сероватого цвета, в центре узелков — некроз. В воздухоносных путях — гнойно-катаральный эксудат.

Хронический аспергиллез птицы характеризуется образованием узелкового процесса. Гранулематозные образования чаще плотные на ощупь, на разрезе состоят из концентрических наслоений соединительной ткани и казеозной массы. В просветах бронхов, трахее, воздухоносных мешках обнаруживается развитие гриба — мицелия, иногда и органов спороношения, окрашенных в зависимости от вида возбудителя в зеленый различных оттенков или черный цвет.

При появлении заболевания и гибели птицы с клиникой и данными патологоанатомического вскрытия, подозрительными на аспергиллез, для микологического исследования в лабораторию направляют трупы птиц.

Микроскопия. При получении лабораторией трупа производят вскрытие его, микроскопическое исследование и высевы

из подозрительных гранулематозных или воспалительных очагов для выделения возбудителя в чистую культуру.

Свежие неокрашенные препараты из эксудата, гранулематозных очагов, предварительно обработанных в капле 10%-ного раствора едкого натрия или в лактофеноле, исследуют под покровным стеклом. В препаратах обнаруживают многочисленные септированные гифы мицелия, иногда и органы спороношения.

Для окраски препаратов из пораженных очагов используют лактофуксин или хлопчатобумажную синь. Гранулематозную ткань, предварительно расщепленную, гной или соскоб помещают на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и под него подводят несколько капель красителя. Через 3—5 минут иглой осторожно придавливают покровное стекло и рассматривают препарат при среднем увеличении микроскопа.

При окраске лактофуксином фон препарата розовый, мицелий гриба бледно-голубой. Хлопчатобумажный краситель окрашивает мицелий в синий цвет.

Лактофуксин готовят следующим образом: 0,1 г кислого фуксина растворяют в 100 мл молочной кислоты. Окраска длится 3—5 минут. Хлопчатобумажная синь представляет собой 1%-ный водный или молочнокислый раствор. Окрашивание длится 5 секунд.

Культивирование. Посевы производят на агар Чапека или агар Сабуро в пробирках. При наличии гранулематозных очагов посевы производят в бактериологические чашки. Небольшие кусочки пораженной ткани обжигают над пламенем горелки, из середины вырезают стерильными ножницами кусочки ткани, которые и раскладывают на поверхности агаровой питательной среды. Культивируют при температуре 37°.

Культуральные свойства. Колонии гриба Аспергиллюс фумигатус появляются на 2—3-й день. На агаре Чапека они бархатистые с выраженным воздушным мицелием, голубоватые, зеленые, с возрастом темнеющие. Конидиеносцы густо скученные, с перегородками или без них, на верхушке с бутыльчатым вздутием до 20—30 микрон, в диаметре, в верхней части несущие одноярусные конидии, расположенные параллельно оси конидиеносца. Конидии в массе темно-зеленые, шаровидные, 2,5—3 микрон в диаметре. Цепочки конидий склеены в колонки.

Патологоанатомические данные, наличие типичных колоний в культуре и характерная микроскопическая картина в препаратах позволяют правильно поставить диагноз на аспергиллез.

Срок исследования до 7 дней.

V. Заболевания, вызываемые патогенными актиномицетами

17. Резервуаром актиномицетов как патогенных, так и непатогенных являются: почва, растения, растительные остатки. Патогенные актиномицеты являются обитателями ротовой полости и желудочно-кишечного тракта здоровых животных.

В патогенезе заболевания имеют значение механические повреждения — ссадины, уколы.

Для лабораторного диагноза направляют:

экстирпированные пораженные лимфоузлы в 30%-ном водном растворе глицерина;

гной из абсцессов, стерильно взятый в пробирку;

для гистологического исследования — пораженные органы и ткани или части их в 10%-ном растворе формалина.

Материал для исследования должен быть свежий и по возможности получен асептическим путем.

Наличие патогенных актиномицетов в тканях и органах животных обнаруживают наблюдением в светлом поле обычного микроскопа. Материал из содержимого узла или абсцессов просматривают в капле физраствора или 50%-ном растворе глицерина. В случае надобности, если в содержимом абсцесса имеются твердые серовато-белые с зеленоватым оттенком зернышки, различимые невооруженным глазом (зерна эти представляют собой так называемые друзы), прибегают к мацерации и просветлению патологического материала 10%-ным раствором едкого натрия или калия и рассматривают в раздавленной капле. Если друзы находятся в состоянии распада, необходимо материал после обработки щелочью центрифугировать и исследовать полученный осадок.

Для дифференциации патогенных актиномицетов в тканях препарата необходимо окрашивать по Граму.

АКТИНОМИКОЗ

18. Возбудитель — лучистый грибок Actinomyces bovis (анаэроб). Выделяемые из актиномикозных поражений другие микроорганизмы следует рассматривать как сопутствующие.

Лабораторный диагноз на актиномикоз ставится на основании результатов микроскопического исследования нативного материала (гноя), окрашенного по Граму.

При отрицательном результате микроскопического исследования прибегают к выделению грибка Актиномицес бовис в культуру.

Для выделения в культуру материал засевают на глюкозно-кровяной агар для анаэробного культивирования при температуре 37°. Для лучшего роста к среде добавляют 5—10% CO_2.

В сомнительных случаях производят гистологическое исследование.

Морфология грибка Actinomyces bovis в патологическом материале. В актиномикозном гное друзы грибка Актиномицес бовис бывают часто в виде мелких желтоватых или сероватых зернышек, окрашивающихся по Граму положительно. При малом увеличении микроскопа обнаруживаются темно-синие гифы мицелия и розовые колбовидные вздутия и палочковидные элементы. Друзы большие.

Культуральные свойства. Рост грибка Актиномицес бовис появляется в период от 15 до 20 дней, иногда и позже в виде небольших белых или желтоватых колоний в толще агара.

Микроскопия. Клетки в виде изогнутых палочек, окрашивающихся положительно по Граму. В молодых культурах грибок имеет вид тонких гиф мицелия.

В субкультурах при культивировании Актиномицес бовис в аэробных условиях появляется аэробный вариант.

Обнаружение в мазках грибка в виде друз, окрашивающихся по Граму положительно, может служить основанием для окончательного ответа.

При отрицательном результате микроскопического исследования патологического материала окончательный ответ о результатах дают после полного микологического исследования.

Срок микроскопического исследования — одни сутки.

Срок микологического исследования — до 15—20 дней.

ПСЕВДОАКТИНОМИКОЗ (АКТИНОБАЦИЛЛЕЗ)

19. Возбудитель: лучистый грибок Proactinomyces lignieresi (Actinobacillus lignieresi).

Псевдоактиномикоз, или актинобациллез,—хроническое заболевание сельскохозяйственных животных, клинически проявляющееся развитием одиночных или множественных абсцессов и опухолей. Поражаются кожа губ, морды, шеи, язык, подчелюстные, заглоточные, подкожные и другие лимфатические узлы. Могут поражаться и внутренние органы: легкие, печень, почки, селезенка, мозг, вымя и желудочно-кишечный тракт. Болеют крупный рогатый скот и овцы.

Материал на актинобациллез исследуют путем:

просмотра мазков, неокрашенных и окрашенных по Граму, под микроскопом;

посевов на питательные среды для выделения грибка в чистую культуру.

Посевы производят на сывороточный, кровяной или мозговой агар и культивируют при температуре 37°.

Морфология Proactinomyces lignieresi в патологическом материале. В мазках из гноя обнаруживаются маленькие серо-желтые друзы, окрашивающиеся по Граму отрицательно. Друзы в 2—3 раза меньше друз грибка Актиномицес бовис. Иногда концы колбовидных вздутий удерживают окраску по Граму и могут ошибочно приниматься за грам-положительные микроорганизмы. При рассмотрении гноя под лупой друзы имеют вид тонких беловатых хлопьев.

При окраске по Гимза гриб имеет вид палочек или коккобацилл до 0,5 микрона длины, расположенных одиночно, парами, в цепочку и нитчатые формы внутри друз.

В патологическом материале Актиномицес бовис и Актинобациллес лигниерези могут обнаруживаться одновременно.

Культуральные свойства. На косом сывороточном агаре рост появляется через 24 часа. Колонии круглые, гладкие, блестящие, бесцветные, опалесцирующие при проходящем свете. Колонии состоят из коротких неподвижных грам-отрицательных палочек. На кровяном агаре гемолиза нет. Молоко не изменяется. Лакмусовое молоко изменяется слабо. Желатину не разжижает.

Биохимические свойства. Для дифференциации грибка используется его способность сбраживать с образованием кислоты декстрозу, лактозу, сахарозу, ксилозу и левулезу. На средах с глюкозой и глицерином образование кислоты не постоянно.

Один просмотр мазков не может служить основанием для окончательного ответа даже при наличии друз, сходных с друзами Проактиномицес лигниерези.

Окончательное заключение дается после полного микологического исследования.

Срок исследования до 8 дней.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ МИКОТОКСИКОЗОВ

20. Грибами, вызывающими микотоксикозы сельскохозяйственных животных, могут быть:

а) токсические грибы, поражающие корма как мертвый субстрат и являющиеся обычными сапрофитами; развиваются они на различных кормах, имеющих при заготовке или хранении повышенную влажность.

Поражаются грубые корма, зернофураж и продукты его переработки.

Из этой группы токсических грибов известны:

Стахиботрис альтернанс (Stachybotris alternans);

Дендродохиум токсикум (Dendrodochium toxicum);

Фузариум споротрихиелла (Fusarium sporotrichiella). Фузариум споротрихиелла вариант поэ, Фузариум споротрихиелла вариант споротрихиоидес;

Аспергиллюс (Aspergillus): Аспергиллюс фумигатус, реже — Аспергиллюс флавус, Аспергиллюс нидуланс, Аспергиллюс клаватус, Аспергиллюс нигер;

б) токсические грибы, поражающие растения во время их вегетации.

К этой группе относятся:

спорыньевые — виды рода Claviceps:

Клавицепс пурпурea (Claviceps purpurea) — типичная спорынья ржи, поражает культурные и многочисленные дикие злаки, редко осоковые;

Клавицепс паспали (Claviceps paspali) паразитирует на дикорастущих злаках рода Паспалум в Закавказье (Paspalum digitaria и другие).

21. Различают: корм зараженный (заспоренный) спорами токсических грибов. Заспоренный корм отравления не вызывает; корм пораженный — когда споры различных грибов, находящиеся в кормах, начинают интенсивно расти и размножаться, масса грибницы и спор постепенно увеличивается и происходит накопление токсических веществ. Корма, пораженные токсическими грибами, вызывают отравления животных.

22. При постановке диагноза на микотическое отравление животных учитывают: эпизоотологическое состояние хозяйства, клиническое проявление болезни у животного, патологоанатомическую картину вскрытия.

Клиническая картина отравлений токсическими грибами часто не сопровождается характерными для их распознавания симптомами. Многие из признаков болезни (нервные явления, гастроэнтериты и др.) являются общими для отравлений различными токсическими грибами, а также ядовитыми растениями и химическими ядами.

Диагностическое значение при клиническом исследовании больных животных могут иметь некоторые особенности клинического проявления: при отравлении грибами Стахиботрис альтернанс и Фузариум споротрихиелла некротические процессы, изменения в морфологическом составе крови и т. д. Однако клинический синдром и течение отравлений определяет ряд факторов: степень токсичности гриба, количество действующих начал гриба, попавшего в организм с кормом, возрастные и индивидуальные особенности, состояние защитных сил и других факторов, определяющих реактивную способность организма животного.

Патологоанатомические изменения не дают основания для точного диагноза. Результаты вскрытия имеют значение только при учете и других данных, используемых для постановки диагноза.

Основанием для подозрения на отравление токсическими грибами являются внезапность и часто массовость заболеваний — заболевает одно за другим в течение короткого времени несколько животных при одинаковых условиях.

Болезнь не передается от одного животного к другому. Смена кормов обычно приостанавливает дальнейшее появление больных.

Окончательный диагноз на микотическое отравление устанавливается на основе полного микологического анализа кормов, воспроизведения экспериментального токсикоза при одновременном исключении инфекций и отравлений растительными и химическими ядами.

При подозрении на отравление лошадей грибом Стахиботрис альтернанс, помимо высылки материала в лабораторию для микологического исследования на месте производят клинико-лабораторные исследования (см. «Наставление по клинико-лабораторной диагностике стахиботриотоксикоза лошадей» от 14 августа 1954 г. Сборник «Ветеринарное законодательство», Издательство МСХ СССР, 1959 г.).

23. При подозрении на кормовое отравление необходимо выслать в лабораторию для полного микологического исследования корма, подозреваемые как источник отравления. Посылают образцы всех кормов, которые входили в суточный рацион до отравления или гибели животных.

Взятие, упаковка и пересылка кормов

24. Для микологического исследования пробы отбирают из среднего образца корма, которая должна характеризовать состояние корма в исследуемой партии.

Отобранные пробы кормов (грубых, зернофуража и др.), если они влажные, просушивают для предотвращения развития на них различной микрофлоры во время транспортировки и упаковывают.

Солома, сено. Для средней пробы сено или солому отбирают из разных мест партии в количестве не менее 5 кг на каждые 25 т непресованного (скирда) и 50 т — прессованного. По среднему образцу отбирают пробу для микологического анализа весом не менее 500 г и упаковывают в бумагу.

Зернофураж, комбикорм. Зерно для средней пробы отбирают порядком, предусмотренным ГОСТом 3040-55, а комбикорм—ГОСТом 8770-58. Для микологического анализа отбирают пробу в количестве не менее 1 кг. Пробы упаковывают в мешочки.

Силос. Независимо от типа силосных сооружений пробы силоса отбирают из различных мест, подозрительных по качеству

(в количестве 1 кг) и помещают в чистые банки с плотно закрывающимися пробками.

Зеленая трава кормовых культур. Для установления токсических свойств грибов-паразитов, поражающих растения во время вегетации, необходимо перед взятием образцов для микологического анализа обследовать пастбище и дать оценку траве, т. е. установить примерный ботанический состав травостоя, определить господствующие в травостое растения. При взятии образцов учитывается характер травостоя, стадия вегетации растения. При обследовании пастбища необходимо обращать внимание на растения, пораженные грибами, а главное— на степень поражения и их массовость. Для оценки пастбищной травы и дальнейшего взятия образцов для исследования и при неоднородности травостоя или однотипности пастбища выделяется несколько модельных участков — размером каждый до 1 кв. м с растительностью, типичной для данного пастбища. Трава скашивается или срезается ножницами со всеми органами (листья, цветы, плоды, стебель). Затем траву сушат до воздушно-сухого состояния в помещении, а для определения вида растения собранные растения раскладывают и высушивают между листами бумаги.

При возникновении отравлений после пастьбы по стерне для микологического анализа берут из различных мест выпасных участков остатки соломы на корню (срезают) или составляют пробы из остатков неубранных зерновых.

Одновременно с материалом нарочным или почтой отправляют и сопроводительные документы, в которых указывается: характер содержания (стойловое, пастбищное) и условия кормления животных.

Вместе с сопроводительными документами в лабораторию высылают подробную историю болезни животных, к которой прилагают акт вскрытия с подробным описанием патологоанатомических изменений, а также сведения об исключении инфекционных болезней и отравлений животных химическими и растительными ядами (если исследование проводилось).

25. Лабораторное исследование кормов предусматривает их микологический анализ и токсико-биологическое исследование.

Микологический анализ кормов

26. При поступлении проб корма в лаборатории производят органолептический анализ: цвет, запах, наличие заплесневения грибов-паразитов (спорыньевых и др.);

люминесцентное исследование проб;

микроскопическое исследование соскобов или смывов из кормов;

первичные непосредственные посевы из образцов кормов;

выделение грибов в чистую культуру из первичных посевов.

Наряду с этим проводят токсико-биологический анализ кормов и выделенных культур (см. ниже пп. 35—40).

Органолептический анализ

27. Грубые корма (сено, солома). При развитии грибов на грубых кормах обнаруживают потемнение, побурение, грибной налет различного цвета (черный, зеленый и др.), слежавшиеся пласты. Гриб Стахиботрис альтернанс на соломе образует сплошной или на узлах черный сажистый налет. Грубые корма, пораженные фузариум споротрихиелла, часто органолептически не отличаются от доброкачественных кормов.

Зерновые (ячмень, овес, пшеница и др.), пораженные особенно видами фузариум, могут содержать легковесные, морщинистые, щуплые, тусклые, иногда розовато-красного цвета, потемневшие зерна.

Мучнистые корма. В них могут быть слежавшиеся комки с запахом плесени.

При органолептическом анализе грубых кормов и зерна необходимо обращать внимание на наличие спорыньевых.

После органолептического анализа производят отбор материала (частей растения, зерна и др.) для микологического исследования.

Люминесцентный метод исследования кормов

28. Этим методом подвергают экспертизе зернофураж (ячмень, овес, пшеница, кукуруза).

Метод люминесцентного анализа кормов применяется с целью:

выявления степени пораженности кормов различными грибами;

отбора пораженных зерен для микологического исследования.

С указанной целью в бактериологические чашки насыпают сухой корм и исследуют под ртутно-кварцевой лампой.

В зависимости от степени заспорения или глубины поражения зерна яркость флюоресценции его варьирует:

а) сильное заспорение или развитие грибов на эпидермисе зерна (наружный слой) обусловливают тускло-фиолетовое свечение различной интенсивности; размол такого зерна дает яр-

кое сиреневое или сиренево-фиолетовое свечение;

б) зерно с поражением всех его оболочек (мезокарпия, эндокарпия, алейронового слоя) не люминесцирует; крупный размол зерна с пораженными оболочками частично флюоресцирует ярко-сиреневым светом;

в) проникновение грибов в мучнистое ядро (эндосперм) тушит люминесценцию как цельного зерна, так и его размола;

г) зерно, подвергавшееся физико-химическому воздействию, не люминесцирует или слабо люминесцирует (наблюдается тусклое его свечение);

д) наличие в муке частиц спорыньи (Клавицепс пурпуреа) обнаруживается вследствие темно-оранжевого свечения их.

Микроскопическое исследование

29. При обнаружении поражений или подозрительных очагов на стеблях, соломинках, листьях, соцветиях, зерне соскабливают обнаруженный грибной налет и переносят в каплю физиологического раствора поваренной соли или воды на предметном стекле, последнее покрывают покровным и просматривают под микроскопом. При поверхностном поражении и для установления наличия на кормах грибов, образующих поверхностные спороношения на различных частях растения, можно применять метод смыва спор. Зерно, а также предварительно измельченные солому, сено заливают чистой водой и в течение 20 минут взбалтывают. Если споры плохо смываются водой, то встряхивание лучше производить в шюттель-аппарате в течение 10 минут, после центрифугирования осадок исследуют обычным способом. Для обнаружения спор и других структур грибов каплю суспензии пипеткой наносят на предметное стекло, покрывают покровным и просматривают под микроскопом. При наличии спороношения микроскопическим исследованием смыва можно определить род (Фузариум, Аспергиллюс и др.), а иногда и вид гриба (Стахиботрис альтернанс).

Выделение культур из кормов

30. Целое зерно, нарезанную соломy и сено (до 2 см длины) переносят стерильным пинцетом на поверхность стерильной фильтровальной бумаги, увлажненной средой Ван-Итерсона (или стерильной водой) и на агар Чапека в бактериологические чашки, раскладывая их так, чтобы они не соприкасались друг с другом. Засевают до 100 зерен, кусочков соломы или сена, распределяя их в 8—10 чашках.

Для выделения гриба Дендродохиум токсикум, развивающегося внутри стебля растения, стебель разрезают или расщепляют и раскладывают наружной поверхностью на среды в чашках (агар Чапека и на фильтровальную бумагу).

Для выделения грибов из внутренних частей зерна (глубинное поражение) прибегают к поверхностной дезинфекции зерна с целью заглушения поверхностно развивающейся микрофлоры. Для дезинфекции применяют раствор формалина 1:300 при экспозиции до одного часа; спирт ректификат (70°-ный) или денатурированный — экспозиция до 6 минут.

После дезинфекции зерно тщательно промывают в стерильной воде (2—3 раза) и стерильным пинцетом раскладывают на поверхность среды.

Мучнистые корма. Для изоляции грибов из муки, отрубей и комбикорма применяют также метод непосредственного посева: на кончик стерильного скальпеля берут небольшое количество материала (несколько крупинок) и раскладывают кучками на увлажненную фильтровальную бумагу и параллельно на агар Чапека в чашках.

Культивирование чашек с посевами во всех случаях производится при температуре 22—25°. Чашки просматривают на 3-й, 5-й, 7-й и 10-й дни после посева. Иногда их выдерживают дополнительно еще 1—3 дня для выявления наиболее медленно развивающихся грибов.

Выделение чистых культур грибов из первичных посевов в чашках. Из колоний, выросших в чашках, при появлении роста производят пересев в пробирки с соответствующими средами для дальнейшего изучения и определения вида гриба.

Для пересева используют субстратный или воздушный мицелий или споры. Пересев мицелия производят загнутой иглой. С этой целью переносят небольшие кусочки его на питательную среду. При пересеве воздушного мицелия во избежание его повреждений необходимо соблюдать осторожность. Споры пересевают методом «сухой иглы», т. е. сухой иглой переносят минимальное количество спор.

Мицелий или споры при переносе в пробирку не погружают в субстрат, а оставляют на его поверхности. За произведенными пересевами ведется периодическое наблюдение.

Приготовление препаратов и микроскопическое исследование выделенных культур. Выросшие в пробирках колонии исследуют под микроскопом при малом увеличении: рассматривают наличие воздушного мицелия, конидиеносцев, плодовых тел, спор и других структур гри-

бов. После просмотра готовят препараты для микроскопического исследования. На чистое предметное стекло наносят каплю физиологического раствора, затем петлей или иглой вносят небольшое количество культуры, после чего исследуют препарат.

Дефференциация известных токсических грибов в культурах

31. Stahybotrys alternans. При первичном посеве соломы на среды в чашках Петри через 3—5 дней на соломинках появляется черный налет, состоящий из спор гриба, обнаруживаемых микроскопическим исследованием. Для выделения чистой культуры из чашки Петри производят пересев в пробирки на агар Чапека. На этом агаре молодой мицелий белый, с возрастом и развитием спороношения колония становится черно-сажистой. Старые культуры имеют буро-черную окраску. Края колонии в пробирке при малом увеличении микроскопа имеют черные образования в виде головок, сидящие на ответвлениях мицелия — конидиеносцах. Конидиеносцы часто симподиально разветвлены, бледно-оливковые с перегородками 42,5—52 микрон длины и 3—5 микрон ширины. На вершине конидиеносца имеется 5—8 выростов стеригм, несущие конидии, чаще собранные пучком и у основания сросшиеся. Конидии эллиптические, округлые, бледно-оливковые с гладкой оболочкой, с возрастом темнеющие, мелкошиповато-бородавчатые или гладкие, постепенно приобретающие почти черный цвет, от 6,3 до 12,6 микрона длины и 3,2—6,3 микрона ширины.

32. Dendrodochium toxicum. При первичном посеве в чашках на внутренней поверхности стебля растения на 2—3-й день появляется мицелий, а на 4—5 сутки на нем возникают подушечки спородохии, округлой или неправильной формы с белым мицелиальным ободком по периферии с оливково-черным или черным слоем конидий в центре.

При исследовании препарата обнаруживают: конидиеносцы в спородохиях скучены плотным слоем на сплетении гиф, неправильно или древовидно разветвленные, с конечными ответвлениями обычно мутовчатыми. Конидии эллиптические по обоим концам заостренные, бесцветные, бледно-зеленоватые, в массе оливковые или оливково-зеленые, 6,2—8,4, реже 9,2 микрона длины и 2—4,2 микрона ширины.

33. Род Fusarium. Во влажной камере через 3—5 дней появляются пушистые или паутинистые кремовые или розовые колонии. Для определения вида их выделяют в чистую культуру, а затем пересевают на сусловый или картофельный агар, на котором можно наблюдать образование пигмента и спороношения начиная с 5—7 дня после посева.

При определении видов и вариантов грибов рода Фузариум основными дифференциальными признаками являются: морфологические особенности макроконидий, наличие микроконидий, их форма, наличие хламидоспор — для некоторых видов. Наиболее характерными признаками для отдельных видов (для токсических вариантов) являются: морфология, макроконидий — величина и количество перегородок, форма верхней клетки, ее размеры, наличие ножки.

Fusarium sporotrichiella. Воздушный мицелий быстрорастущий, паутинистый или пушистый, высокий, белого, розового или красного цвета, септированный, разветвленный. Строма на декстрозно-картофельном или сусловом агаре темно-буроватая, различных оттенков, красная, редко бывает не окрашена. Макроконидии веретеновидно-серповидные, с постепенно суживающейся, неудлиненной верхней клеткой с выраженной ножкой или с сосочковидным основанием.

Макроконидии образуются на воздушном мицелии (чаще с тремя перегородками), реже в спородохиях или в пионнотах (обычно с пятью перегородками). Спородохии—плотное, а пионноты—рыхлое сплетение гиф, на котором тесным слоем расположены конидиеносцы. На поверхности агара спородохии видны в форме капель абрикосового цвета, а пионноты — в виде мелких кремовых подушечек.

Макроконидии с тремя перегородками 24—50 × 2,5—5 микрон с пятью перегородками 28—67 × 3,5—5 микрон.

Микроконидии грушевидные, лимоновидные, булавовидные, одноклеточные, реже с одной перегородкой. Микроконидии грушевидно-лимоновидные, одноклеточные 3,8—12,5 × 3,8—6,6 микрона; с одной перегородкой 9—18 × 3,5—9 микрон; продолговатые и веретеновидные, одноклеточные 9—15×2,5—4 микрон, с одной перегородкой 7—26 × 2,7 — 6 микрон.

Хламидоспоры промежуточные в цепочках, узелках реже одиночные.

Количественное соотношение различных типов конидий для вариантов Fusarium sporotrichiella неодинаково.

Различают следующие наиболее распространенные токсические варианты Fusarium sporotrichiella.

а) Fusarium sporotrichiella var. poae. Воздушный мицелий паутинистый или войлочно-пушистый, белый, розовый. Строма красная, реже не окрашена. Микроконидии в большом количестве грушевидно-лимоновидные, возникают на простых или разветвленных гифах мицелия — конидиеносцах, покрывают мицелий в виде белого порошка. Большей частью они одноклеточные, реже двуклеточные.

Микроконидии грушевидные или лимоновидные без перегородок 3,8—9,5×3,8—5,8 микрона; с одной перегородкой, булавовидные — 8,4—20 × 3,8—6,2 микрона.

Макроконидии немногочисленные — в воздушном мицелии с одной-тремя перегородками. С тремя перегородками, серповидные 17,2—32,4 × 3,8—5 микрон.

Хламидоспоры промежуточные в цепочках или узелках.

б) Fusarium sporotrichiella var. sporotrichioides. Воздушный мицелий пушистый, высокий, рыхлый, белый, розовый или красный. Строма красная, реже не окрашена. Вариант отличается от основного вида Фузариум споротрихиелла преобладанием макроконидий.

Макроконидии серповидно-веретеновидные с тремя реже с пятью перегородками, с удлиненной, постепенно суживающейся верхней клеткой, с выраженной ножкой. Макроконидии образуются в мицелии иногда в спородохиях. Макроконидии с тремя перегородками 18,2—46,4×3,2—5,5 микрона, с пятью перегородками 32—67 × 3,4—5,5 микрона (обычно 32—45 × 3,8—5,5 микрона).

Микроконидии грушевидно-лимоновидные при старении шаровидные, одноклеточные реже с одной перегородкой, нередко у основания с сосочком, грушевидно-лимоновидные 5,7—9,5 × × 5,7—6,8 микрона, булавовидные — 9,7—15 × 5,7—7,6 микрона, с одной перегородкой — 9—20 × 5—8 микрон.

Хламидоспоры промежуточные, многочисленные в цепочках или узелках. Иногда образуются коричневые или красно-коричневые склероции.

34. Род Aspergillus; обычный токсический вид Aspergillus fumigatus, реже распространены другие виды этого рода (см. п. 16).

Паразитные грибы: спорыньевые, ржавчинные, головневые не культивируются.

Токсико-биологический анализ кормов

35. Проверка токсичности образцов кормов и выделенных из них культур грибов является необходимым условием установления роли того или иного гриба в этиологии токсикоза.

Известные токсические варианты грибов: Стахиботрис альтернанс, Фузариум споротрихиелла и его варианты, Дендродохиум токсикум, Аспергиллюс фумигатус — обладают:

а) общетоксическим свойством при введении указанных выше грибов животным перорально, подкожно, внутривенно и внутрибрюшинно;

б) дермацидными свойствами — вызывают местный воспалительный процесс с развитием некроза при нанесении экстрактов из кормов или экстрактов из культур на кожу животных.

Токсические грибы, развивающиеся на вегетирующих растениях (спорыньевые), дермацидными свойствами не обладают.

Определение токсичности кормов

36. Токсичность образцов кормов определяют: кожной пробой, скармливанием подозрительных кормов чувствительным животным и по методу Васина.

Не рекомендуется определять токсичность кормов только химическими реакциями (Олифсона, метод с царской водкой и др.), ибо они не специфичны и могут привести к диагностическим ошибкам.

37. Кожная проба. Измельченный корм в количестве 50 г помещают в бумажные патроны из фильтровальной бумаги и экстрагируют в аппарате Сокслета серным эфиром в течение 6 часов; полученный экстракт переносят в бюкс или другой сосуд и конденсируют при комнатной температуре до испарения эфира.

При отсутствии аппарата Сокслета то же количество измельченного корма экстрагируют серным эфиром в стеклянных банках с притертой пробкой. Материал заливают эфиром так, чтобы жидкость (эфир) покрывала корм на 2 см. Экстракцию производят в течение 24 часов при комнатной температуре и при периодическом встряхивании, затем эфир сливают в сухую колбу и выпаривают в водяной бане при температуре 45—50°. Экстракцию можно производить ацетоном, хлороформом.

На выбритую поверхность кожи (4—5 см) кролика наносят экстракт и по возможности его равномерно распределяют, слегка втирая в кожу стеклянной палочкой или шпателем. Для предупреждения слизывания экстракта на шею кролика надевают картонный воротник. Экстракт наносят двукратно с интервалом в 24 часа. Двукратное нанесение экстракта достаточно для выявления дермацидных свойств гриба. Реакцию учитывают ежедневным наблюдением за опытными животными. Окончательную запись результатов учета реакции производят через 72 часа.

Положительная реакция. У животных на месте нанесения экстракта из корма (культуры) через 48—72 часа появляется воспалительная реакция в виде гиперемии, отечности с последующим развитием некроза.

Резко токсические корма (культуры) вызывают на коже резкую гиперемию, отечность, выделение эксудата, трещины, глубокий некроз, массивный струп. Заживление затягивается до 10—20 дней.

Токсические корма (культуры) вызывают резкую гиперемию, утолщение кожи, выделение эксудата, поверхностный некроз. Заживление наступает на 5—7-й день.

Слабоположительная реакция. На месте нанесения экстракта образуется гиперемия, иногда утолщение кожи, исчезающее на 3—5-й день.

Слабоположительную реакцию обычно вызывают: слаботоксические варианты грибов в кормах и их культуры; зернофураж с высокой кислотностью при отсутствии токсических грибов.

Отрицательная реакция. После двукратного нанесения на кожу экстракта из кормов (культур) реактивных изменений не наблюдается.

38. Алиментарная проба. Одновременно с кожной пробой производят скармливание исследуемого корма: цыплятам (2—3 мес. возраста), молодым морским свинкам, мышам (самцам весом до 20 г), а при возможности также и поросятам. Суточную норму заменяют исследуемым кормом и скармливают его 3—5 животным не менее 10 дней (если до истечения этого срока они не погибли).

Павших и забитых животных вскрывают и бактериологически исключают у них инфекцию. При вскрытии обращают внимание на состояние внутренних органов и особенно на желудочно-кишечный тракт.

39. Метод Васина. Измельченный корм (200—250 г) заливают подкисленной эфирно-спиртовой смесью (200 мл эфира, 100 мл винного спирта, 1 мл крепкой соляной кислоты). Экстрагируют на холоде двое-трое суток, затем эфирно-спиртовую смесь отфильтровывают. Остаток жидкости из кормовых масс отжимают через чистое полотно, фильтрат помещают в широкие чашки для испарения при комнатной температуре до полного удаления эфирно-спиртового растворителя и образования в остатке маслообразной массы.

Экстракт разбавляют нейтральным жиром (рыбий жир, подсолнечное масло) в соотношении 0,1 мл на 4,5. Пяти мышам вводят под кожу по 0,5 мл разбавленной массы. Контрольным мышам вводят чистый жир. В зависимости от степени токсичности корма мыши гибнут в течение первых двух суток или на месте введения развивается некроз.

Определение токсичности культур

40. При выделении из корма культур грибов Фузариум споротрихиелла и его вариантов, Стахиботрис альтернанс, Дендродохиум токсикум и видов Аспергиллюс обязательно проверяют их токсичность, ибо в кормах эти грибы встречаются в токсичной, слаботоксичной и атоксичной формах.

Токсичность культур определяют: кожной пробой, скармливанием или подкожным введением экстрактов из культур или культуральной жидкости лабораторным животным.

Накопление токсических веществ у грибов более интенсивно происходит на тех субстратах, на которых грибы развиваются во внешней среде: соломе, овсе, ячмене, кукурузе, комбикорме.

Для культивирования Стахиботрис альтернанс вместо соломы можно использовать овес. Виды Фузариум, Дендродохиум токсикум, Аспергиллюс фумигатус культивируют на овсе, ячмене, кукурузе.

41. В лаборатории среды готовят из доброкачественных кормов. В матрацы емкостью в 1,5 л или колбы емкостью в 300—500 мл помещают 150—200 г зерна, а грубых кормов или комбикорма — 30—50 г, увлажняют водой (воды к зерну добавляют 80%, к комбикорму — 100%, грубым кормам — 50%) и стерилизуют в автоклаве при давлении 1 атм 40 мин. Приготовленную среду засевают споровой взвесью испытываемого гриба, колбы с посевами тщательно встряхивают.

Для приготовления споровой взвеси используют чистые культуры грибов, выделенные из первичных посевов в чашках. В пробирки наливают 3—5 мл физиологического раствора, встряхивают содержимое для отделения спор и этой взвесью засевают сосуды со средой.

Накопление токсических веществ у гриба Фузариум споротрихиелла, Аспергиллюс фумигатус наблюдается также на жидкой глюкозо-пептонной среде (среда Бодена и Готье—1% пептона, 3—5% глюкозы); у Стахиботрис альтернанс—на агаре Чапека, у Дендродохиум токсикум — на сусловом агаре.

Посевы культивируют при температуре 20—25°.

42. Длительность культивирования для максимального накопления токсических веществ определяется видом гриба, питательным субстратом, влажностью и температурным режимом. Обычно накопление токсических веществ в субстрате идет параллельно росту и развитию того или иного гриба и происходит:

у гриба Стахиботрис альтернанс в возрасте культуры 10—25 дней;

у гриба Фузариум споротрихиелла в возрасте культуры 10—15 дней;

у гриба Аспергиллюс фумигатус в возрасте культуры 5—10 дней;

у гриба Дендродохиум токсикум в возрасте культуры 10—15 дней.

При появлении в культуре обильного спороношения ее извлекают из сосудов, помещают в пакеты из фильтровальной бумаги и подсушивают при температуре 35—40°. Культуру, выращенную на зерне, измельчают и экстрагируют (см. п. 37). Не рекомендуется убивать культуру в автоклаве, ибо это снижает токсичность культуры гриба.

Токсические штаммы культур грибов: Аспергиллюс фумигатус, Фузариум споротрихиелла, Стахиботрис альтернанс, Дендродохиум токсикум — убивают лабораторных животных:

при скармливании культур в течение 40—72 часов;

при подкожном введении мышам экстрактов из культур или культуральной жидкости в дозе 0,5—1 мл — за 18—24 часа.

Нанесение на кожу кролика экстрактов из культур вызывает воспалительную реакцию с образованием некроза.

Ход исследований кормов

43. Исследование кормов по дням ведут по следующей схеме:

В первый день из присланных образцов кормов готовят экстракты, производят органолептический анализ, микроскопируют соскобы или смывы из проб кормов и производят посевы в бактериологические чашки, во влажные камеры; чашки с посевами ставят в термостат; начинают скармливать животным выделенный для этих целей исследуемый корм, готовят экстракт.

На 2-й день — готовый экстракт наносят на выбритую кожу кролика.

На 3-й день — вторично наносят экстракт на кожу кролика. Чашки вынимают из термостата и посевы рассматривают невооруженным глазом. Если токсичность корма проверяется по методу Васина, экстракт вводят под кожу.

На 4-й день — учитывают кожную реакцию.

На 5-й день — просматривают посевы в чашках, учитывают выросшие колонии. При наличии спороношения определяют вид (Стахиботрис альтернанс, Дендродохиум токсикум, Аспергиллюс фумигатус). Пересевают на агар Чапека в пробирках и ставят в термостат до появления спороношения. Для определения видов Фузариум колонии пересевают для спороношения на декстроз-

но-картофельный или сусловый агар, а также на рис для пигментообразования.

На 7-й—10-й день — просматривают чашки с первичными посевами.

На 9-й—10-й день на зерне могут появляться запоздалые колонии; их также пересевают на агар Чапека в пробирках для дальнейших работ. Производят окончательный учет выросших колоний грибов. Определение степени заражения образцов кормов производят ориентировочно, выводя процентное отношение выросших колоний каждого гриба к общему числу посеянных зерен, кусочков соломы, сена или кусочков мучнистых кормов или производят посев на пластинчатый агар смыва с одного грамма корма в последовательных разведениях (1:1000, 1:10000 и т. д.) и затем делают расчет обсемененности. Споровой взвесью (из выросших колоний на агаре Чапека, засеянных на пятый день) заражают приготовленные растительные среды и ставят в термостат при температуре 20—25° и выдерживают до полного развития спороношения; сосуды из термостата вынимают и оставляют при комнатной температуре еще на пять суток.

На двадцатый день проверяют токсичность выделенных культур.

В зависимости от особенностей случая указанные сроки исследования могут сокращаться (при выделении гриба Фузариум споротрихиелла, Аспергиллюс фумигатус) или удлиняться (гриб Стахиботрис альтернанс). Важно изучать культуру с первых дней ее появления и дальнейшего развития — спороношения, а также своевременно выявлять загрязнение.

Оценка результатов исследования кормов

44. При подведении итогов токсико-микологического анализа кормов учитываются результаты биопробы и микологического исследования.

а) Оценка результатов микологического исследования при положительной биопробе. При установлении токсичности образцов кормов с помощью кожной пробы или скармливанием и при выделении известных токсических грибов (Стахиботрис альтернанс, Фузариум споротрихиелла и его вариантов, Аспергиллюс фумигатус, Дендродохиум токсикум) в значительном количестве и при подтверждении их токсичности такой корм следует считать пораженным и к скармливанию животным не пригодным.

В случае установления биопробой (кожной пробой или скармливанием) токсичности присланных образцов кормов, а мико-

логическим исследованием известные токсические грибы не выделены, обращают внимание на те грибы, которые в посевах из кормов встречаются в значительном количестве.

При выделении из образцов кормов неизвестных токсических грибов и для установления их роли в этиологии отравления метод скармливания присланных образцов кормов является основным в токсико-биологическом анализе. Кожная проба, подкожное, парентеральное и другие способы введения материала являются только подсобными.

Для воспроизведения естественно протекающего заболевания при скармливании подозрительного по качеству корма используются те виды животных, которые уже болели в данном хозяйстве.

б) Оценка результатов микологического исследования при отрицательной биопробе. Обнаружение в присланных образцах кормов токсических вариантов грибов: Стахиботрис альтернанс, Фузариум споротрихиелла и его вариантов, Дендродохиум токсикум, Аспергиллюс фумигатус — при отрицательной биопробе (при проверке токсичности кормов) расценивается как заражение (заспорение) спорами указанных выше грибов.

Заспоренный корм не может явиться источником отравления животных в хозяйстве.

Партии корма (солома, сено, зернофураж и продукты его переработки), давшие слабоположительную реакцию по кожной пробе и отрицательный результат скармливания экспериментальным животным в течение 10 дней, могут быть допущены к скармливанию крупному и мелкому рогатому скоту, взрослой птице (зернофураж и продукты его переработки) без ограничений.

Длительное хранение партии корма, давшей слабоположительную реакцию по кожной пробе, не рекомендуется.

Окончательный ответ можно получить на 15—20 день.

Лабораторная диагностика отравлений грибами, паразитирующими на вегетирующих растениях

45. Основным критерием для постановки диагноза на отравление животных спорыньевыми грибами (Клавицепс пурпуреа и Клавицепс паспали) являются: клиническое проявление болезни, обнаружение на злаках этих грибов в виде склероциев и степень поражения растений.

Лабораторный диагноз ставят на основании органолептического (сена, травы), люминесцентного (см. п. 28) и химического исследований (муки, отрубей, комбикорма) присланных образцов кормов.

Склероции гриба Claviceps purpurea по форме бывают в виде рожка, трехгранные, закругленные. В зависимости от вида растения величина их колеблется от нескольких миллиметров до 5 см длины. Цвет склероциев от светло-фиолетового до черного. Сердцевина белая. Склероции обнаруживаются в завязи растения.

Склероции гриба Claviceps paspali шаровидные, овальные, иногда к вершине конические. Цвет их желто-бурый. Размеры колеблются от 1,6 до 4,5 мм в диаметре.

46. Определение спорыньи в кормах. *В зернофураже.* Из навески зерна в 400 г отбирают все склероции (рожки), взвешивают и определяют процентное содержание их с точностью до 0,01%.

В размолотых кормах (муке) спорынью определяют по методу Зимина—Гофмана: 10 г корма смачивают 20 мл эфира, смесь взбалтывают и оставляют на 6 часов, затем фильтруют. К фильтрату добавляют 1 мл раствора углекислой соды (10%), взбалтывают и отстаивают. При наличии спорыньи фильтрат окрашивается в фиолетовый цвет. Спорынья обнаруживается при содержании ее не менее 0,05%.

Для определения в сене процентного содержания склероциев гриба Клавицепс паспали и рожков гриба Клавицепс пурпуреа (спорыньи) из доставленного в лабораторию образца сена берут навеску 300 г, выбирают из растений склероции, взвешивают их и вычисляют количество склероциев в процентах к общему весу навески.

Оценка результатов исследования. Корма (сено, зернофураж, размолотые корма) с примесью склероциев гриба Клавицепс пурпуреа (спорыньи), а также сено, содержащее склероции гриба Клавицепс паспали свыше 0,1%, скармливать животным не рекомендуется.

В случае необходимости токсичность склероциев гриба Клавицепс пурпуреа проверяется путем скармливания корма петухам, а склероциев гриба Клавицепс паспали — кроликам.

Приложение 1

Дифференциальная диагностика видов Candida

Виды	Сабуро-агар	Сабуро-бульон	Литман-агар	Кукурузный агар
	Морфология колонии			Микроскопическая морфология гриба
Candida albicans	Кремовые, гладкие, влажные, с возрастом морщинистые или с редкими бороздками	Глубинный рост	Конусовидные, блестящие, вначале гладкие; окраска темно-синяя в старых культурах	Мицелий с хламидоспорами и бластоспорами
Candida tropicalis	То же	Небольшая поверхностная пленка, пузырьки пены	Плоские бледно-синие	Разветвленный, хорошо развитый мицелий с многочисленными бластоспорами
Candida pseudotropicalis	Рост не характерный	Поверхностной пленки нет	То же	Мицелий слабо развит
Candida krusei	Гладкие, сухие	Широкая поверхностная пленка	"	Мицелий торчащий
Candida parakrusei	Гладкие	Поверхностного роста нет	"	Мицелий хорошо развит

Продолжение

Виды	Сабуро-агар	Сабуро-бульон	Литман-агар	Кукурузный агар
Candida stellatoidea	Кремовые, гладкие	Поверхностного роста нет	Наличие отростков, суживающихся к концу	Мицелий с большими шарообразными гроздьями спор
Candida guillermondi	Кремовые	То же	Плоские	Мицелий хорошо развит, хламидоспор нет

Приложение 2

НАИБОЛЕЕ УПОТРЕБИТЕЛЬНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ

Глюкозный агар Сабуро

Глюкозы	4,0 г
Пептона	1,0 г
Агара	1,8 г
Воды	100 мл

Среда пригодна для многих как паразитных, так и сапрофитных грибов, а также для первичных посевов из патологического материала (органов и тканей).

Для стимуляции спорообразования и роста некоторых паразитных грибов к среде добавляют: аспарагин (0,2 г на 100 мл) или вместо воды используют дрожжевой экстракт.

При выделении грибов из загрязненного бактериями материала к среде добавляют (после автоклавирования) антибиотики: пенициллин — 20 единиц, стрептомицин — 40 единиц на 1 мл среды.

Агар Литмана

Бычьей желчи (обезвоженной)	15,0 г
Декстрозы	10,0 г
Пептона	10,0 г
Кристалл-виолета	0,01 г
Агара	20,0 г
Воды	1000 мл
Стерилизация при 110°	30 минут

Солодовое сусло

Обычное сусло (получают с пивоваренного завода) содержит 10—12% сахара и имеет плотность 16—18° по Биллингу. Сусло фильтруют, разбавляют в два раза водопроводной водой, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 110° в течение 30 минут. На сусле готовят двухпроцентный агар.

Кровяной агар.

Готовят 3%-ный мясо-пептонный агар (мясо можно заменить экстрактом из телячьего сердца), pH — 7,4—7,8. Разливают агар в колбы и стерилизуют при 110° в течение 30 минут.

По мере надобности агар в колбе расплавляют, охлаждают до 45°, добавляют 1% стерильной глюкозы и 1% стерильной цельной крови.

Разливка в пробирки или в чашки производится в стерильных условиях. Используют кровь лошади, овцы, козы и кролика.

Кукурузный агар

Кукурузной муки	40,0 г
Агара	20,0 г
Воды	1000 мл

Кукурузную муку заливают водой, равномерно размешивают и кипятят в течение одного часа. Фильтруют через марлю, затем смешивают фильтрат кукурузной муки с агаром и добавляют воду до общего объема — 1000 мл. Разливают агар в пробирки. Стерилизуют в течение 15 минут при давлении в одну атмосферу. В случае надобности добавляют 1% глюкозы.

Картофельный агар

Картофеля	200,0 г
Агара	20,0 г
Воды	1000 мл

Картофель очищают, нарезают ломтиками, заливают водой и помещают на 10 минут в аппарат Коха или в автоклав. В последнем стерилизуют текучим паром 30 минут, затем фильтруют. Восстанавливают, разливают, стерилизуют под давлением 0,5 атмосферы в течение 30 минут.

Рисовая среда

Неочищенного риса	10,0 г
Воды	30 мл

В пробирки насыпают рис высотой до 15—20 мм и заливают двумя объемами воды. Стерилизуют под давлением 0,5 атмосферы в течение 30 минут.

Дрожжевая вода

В одном литре воды растворяют 80 г прессованных дрожжей или 20 г сухих, затем кипятят в течение 15 минут и фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в течение 20 минут при 120°.

Дрожжевой экстракт

10%-ную водную взвесь из сухих дрожжей или 30%-ную взвесь из прессованных хлебных дрожжей кипятят один час, оставляют в течение суток на холоде, жидкий слой декантируют (отделяют жидкий слой от осадка путем центрифугирования), фильтруют через бумагу и нагревают при 120° в течение 30 минут. Для получения прозрачной жидкости ее несколько раз фильтруют. Стерилизуют фильтрацией через свечу во избежание выпадения осадка.

Среда Чапека

Глюкозы	30,0 г
Натрия азотнокислого ($NaNO_3$)	2,0 г
Калия фосфорнокислого одноосновного (KH_2PO_4)	1,0 г
Магния сернокислого ($MgSO_4$)	0,5 г
Калия хлористого (KCl)	0,5 г
Железа сернокислого ($FeSO_4$)	0,001 г
Воды дистиллированной	1000 мл

Для изготовления твердой среды добавляют 2% агара.

Среда Ван-Итерсона

Аммония азотнокислого (NH_4NO_3)	0,5 г
Калия фосфорнокислого одноосновного (KH_2PO_4)	0,5 г
Воды водопроводной	1000 мл

Смесь разливают в пробирки или колбы и стерилизуют в течение 30 минут при давлении в одну атмосферу.

Среда для получения аскоспор у дрожжей

Готовят гипсовые блоки или конусы с широким основанием и ставят в чашки с невысоким слоем пивного сусла. Жидкость должна смачивать только часть их поверхности, остальная в силу капиллярности будет влажной.

Приложение 3

Форма журнала регистрации кормов, поступивших на токсико-микологическое исследование

№ пп.	Дата поступления	Название хозяйства (совхоз, колхоз)	Тип корма	Когда начато исследование	№ экспертизы

Результаты исследования		Результаты токсико-биологических исследований			Заключение и подпись врача, производившего исследование
органолептического	микологического	кожная проба	скармливание	подкожное введение	

СОДЕРЖАНИЕ

Методы исследования при диагностике микозов 3
I. Дерматомикозы 3
II. Кандидамикоз 9
III. Эпизоотический лимфангоит 12
IV. Аспергиллез 13
V. Заболевания, вызываемые патогенными актиномицетами . . . 15
Методы исследования кормов при диагностике микотоксикозов . . . 17
Микологический анализ кормов 20
Токсико-биологический анализ кормов 26
Лабораторная диагностика отравлений грибами, паразитирующими на вегетирующих растениях 32
Приложения 34

Т-11926 Подп. к печ. 14/X 1959 г. Зак. 1037 Тир. 7000 экз.
Типография № 1 Изд-ва МСХ СССР, Москва, Цветной бульвар, 26.

gost.e-ecolog.ru