

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

Методы:
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

05.05.94г. № 19-7-2/83

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника Департа-
мента ветеринарии Минсельхоз-



В.М.Авилов

1994г.

На № _____

По лабораторной диагностике ⁷
цитробактероза пчел

1. Общие положения

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

Citrobacter sp. - граммотрицательные палочки, не образующие спор
и капсул, подвижные. Обладают основными характеристиками семейства
Enterobacteriaceae, идентификацию *Citrobacter sp.* внутри указан-
ного семейства проводят с помощью биохимических тестов (табл.).

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

1.3. 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 слоя-
ми марли или консервируют в 50%-ном глицерине.

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

2. Лабораторное исследование

2.1. Отобранных для исследования живых пчел обездвигивают па-
рами 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

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 гемолимфы 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°C посеvy 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) размером 1 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 серноокислым железом, среда для определения лизин-декарбоксилазы (Приложение). Для исследования биохимических свойств можно использовать пластины биохимические дифференцирующие энтеробактерий (ПЕДЭ), согласно инструкции по их применению, утвержденной ГУКИ Минздрава СССР 10.10.87 г.

2.5. К *Citrobacter sp.* относят грамотрицательные, подвижные, не образующие спор и капсул палочки, утилизирующие цитрат, недезаминирующие лизин-декарбоксилазу, не ферментирующие сахарозу, ферментирующие с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, маннит, не образующие 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 с действующими методическими указаниями

Приложение I
к Методическим указаниям по
лабораторной диагностике
цитробактероза пчел

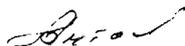
Готовят питательную среду следующего состава: гидролизат казеина—0,5 г, дрожжевой экстракт—0,3 мл, глюкоза—0,1 г, L-лизин—0,5 дистиллированная вода—100 мл. Добавляют 4,5 мл индикатора бромтимолового синего (0,1% раствора в 20% спирте); устанавливают pH среды 6,0 (среда имеет лимонную окраску). Среду разливают в пробирки по 3 мл и стерилизуют текущим паром 3 дня или при 0,5 атм 15 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 4-5 сут.

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

Заместитель начальника отдела
Департамента ветеринарии



Б.Н. Антонов

Таблица

Дифференцирующие признаки встречающихся у пчел родов энтеропатогенных бактерий

№№: пп:	<i>Strobilactis</i> <i>sp.</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Proteus</i>
1. Использование цитрата	+	-	+	+	+	<u>±</u>
2. Тест на метил-рот	+	+	+	-	-	+
3. Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	-	+	+	<u>±</u>
4. Образование индола	+	+	-	-	-	<u>±</u>
5. Образование сероводорода	-	-	+	-	-	<u>±</u>
6. Наличие лизин-декарбоксилазы	-	+	+	-	<u>±</u>	-
7. Глюкоза	+	+	+	-	+	+
8. Лактоза	+	+	-	+	<u>±</u>	-
9. Сахароза	-	<u>±</u>	-	-	+	+
10. Маннит	+	<u>±</u>	+	+	+	-