

Утверждены 22 сентября 1998г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**  
по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб

**1. Общие положения**

**1.1.** Псевдомоноз - инфекционная болезнь тепловодных, холодноводных и аквариумных рыб, встречающаяся в прудовых и индустриальных хозяйствах.

**1.2.** Возбудителями псевдомоноза являются вирулентные штаммы бактерий рода *pseudomonas*. Чаще всего встречаются виды *ps.fluorescens*, *ps.putida*, *ps.aureofaciens*, *ps.cyprinisepticum*, *ps.intestinalis*, *ps.anguilliseptica*, *ps.chlorographis*. Каждый из этих видов может вызвать заболевание самостоятельно, в ассоциации друг с другом или другими микроорганизмами.

**1.3.** Для бактериологического исследования берут только живую больную рыбу. В каждом случае исследуют не менее 5 экземпляров рыб с признаками болезни.

**2. Бактериологическое исследование**

**2.1.** Высевы производят из асцитной жидкости, печени, почек, селезенки, из крови (отдельно из каждой пробы) на чашки с МПА (рН 7,2-7,4).

**2.2.** Заболевание характеризуется септическим течением, поэтому в посевах из крови и паренхиматозных органов, как правило, обильный рост культуры возбудителя.

**2.3.** Посев можно производить инокуляционной петлей, погружая её в обследуемый орган и поворачивая несколько раз, или пинцетом с изогнутыми браншами.

**2.4.** Посевы инкубируют при 25-26°C в течение 48-72 часов. На МПА бактерии рода *pseudomonas* образуют бесцветные или серовато-белые полупрозрачные, круглые выпуклые колонии с ровными краями. На 3-4-е сутки отмечают образование желто-зеленого или оранжево-желтого флюоресцирующего пигмента. *ps.cyprinisepticum* и некоторые штаммы *ps.fluorescens* могут образовывать слизистые колонии.

**2.5.** При обнаружении на агаре характерного роста подозрительные колонии пересевают на среду Клиглера и через 18 часов культуры, давшие на этой среде щелочную реакцию (столбик и скошенная поверхность окрашивается в малиновый цвет), подвергают дальнейшему изучению. Для дифференциации возбудителей рода *pseudomonas* от бактерий сходных с ними родов (табл. 1) определяют оксидазную активность, способность расщеплять глюкозу в среде Хью-Лейфсона (тест окисления-ферментации).

**2.5.1.** Для определения оксидазной активности на небольшой участок скошенной поверхности с культурой наносят каплю смеси реактивов 1%-ного водного раствора диметилпарафенилендиамин (гидрохлорида или оксалата) и 1%-ного раствора (α-нафтола и 60° спирте-ректификате). Оксидазоположительные колонии окрашиваются в синий цвет через 30-60 секунд. Оксидазоотрицательные культуры дальше не исследуются.

**2.5.2.** При проведении теста окисления-ферментации (О/Ф) исследуемую культуру засевают уколом до дна в пробирку с 6 мл среды Хью-Лейфсона. Посевы инкубируют 96 часов при 25-26°C. Возбудители псевдомоноза окисляют глюкозу в аэробных условиях, поэтому среда в верхних слоях становится соломенно-желтой, нижний слой остается без изменения ферментация не происходит.

**2.5.3.** В случае сомнительного результата теста окисления-ферментации проводят дополнительные исследования декарбоксилазной активности выделенных культур. Исследуемую культуру высеваяют в четыре пробирки со средой Меллера или Биргер-Крушинской, в три из которых добавлено по одной из аминокислот (аргинин, лизин, орнитин), четвертая - контрольная. Затем на поверхность среды наслаивается стерильное вазелиновое масло (примерно 1 мл). Посевы инкубируют 4 суток при 25-26°C. Возбудители псевдомоноза обладают аргинин-дегидролазой, но не декарбоксилируют лизин и орнитин, в результате чего цвет среды Биргер-Крушинской в пробирке с аргинином становится синим. Цвет среды Меллера изменяется до фиолетового, при слабой реакции становится голубовато-серым.

2.5.4. Для определения видовой принадлежности культур проводят высевы на среды Гисса с маннитом, сахарозой, мальтозой, лактозой (см. табл. 2).

2.5.5. Подвижность культуры определяют при посеве на среду Хью-Лейфсона. Подвижные культуры растут диффузно, вызывая помутнение всей среды, неподвижные - строго по уколу (*ps.fluorescens* f. *capsulata*).

### 3. Биологическое исследование

3.1. Биологическую пробу ставят на 6-10 клинически здоровых рыбах того же вида и возраста, от которых выделена культура возбудителя, завезенных из хозяйства, благополучного по данному заболеванию.

3.2. Двухсуточную бульонную культуру вводят 4-6 рыбам внутримышечно и 4-6 рыбам внутривентрально в дозе 0,3 мл. Рыбам массой более 150 г вводят по 0,5 мл культуры. Температура воды в аквариуме, где содержится зараженная рыба, должна быть в пределах 15-25° С.

3.3. Одновременно ставят контроль на 6-10 рыбах, которым вводят стерильный МПБ в тех же дозах. Срок наблюдения 16 суток.

3.4. В случае проявления заболевания или гибели рыб проводят бактериологическое исследование.

3.5. Биологическую пробу считают положительной, если все зараженные рыбы заболевают и не менее 50% из них погибает с признаками псевдомоноза, а из крови и внутренних органов реизолируют исходную культуру.

3.6. Лабораторный диагноз на псевдомоноз считают установленным при выделении культуры со свойствами, характерными для возбудителей болезни, и патогенной для подопытных рыб.

*С утверждением настоящих Методических указаний утрачивают силу "Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб", утвержденные ГУВ Госагропрома СССР 12.06.1986 г.*

## Приложение 1

Таблица 1 Дифференциация бактерий рода *pseudomonas* от бактерий сходных с ними родов

Основные признаки	<i>pseudomonas</i>	<i>vibrio</i>	<i>aeromonas</i>	<i>plesiomonas</i>
Оксидаза	+	+	+	+
Расщепление глюкозы на среде Хью-Лейфсона	O/-	O/Φ	O/Φ	-/Φ
Лизип-декарбоксилаза	-	+	-	+
Орнитин-декарбоксилаза	-	+	-	+
Аргинин-декарбоксилаза	+	-	-	+

Таблица 2 Дифференциация представителей рода *pseudomonas*

Основные признаки	<i>ps.fluorescens</i>	<i>ps.putida</i>	<i>ps.intestinalis</i>	<i>ps.dermaolba</i>	<i>ps.aurofaciens</i>	<i>ps.cypripinisepticum</i>	<i>ps.chlororaphis</i>
Наличие капсулы в мазках	-	-	-	-	-	+	-
Маннит	-	-	к	к	к	-	-
Мальтоза	-	к	к	к	-	-	-
Лактоза	-	к	-	к	к	-	-
Сахароза	к/-	-/к	к	к	к	-	к

---

## Приложение 2 Рецепты специальных сред

1. *Среда Хью-Лейфсона*, Состав: пептона -2.0 г, хлорида натрия -5.0 г., калия фосфорнокислого двухзамещенного (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) - 0.3 г, бромтимолового синего - 0.03 г, агар-агара -3.0 г дистиллированной воды - 1000 мл. Компоненты смешивают, расплавляют агар, pH смеси доводят до 7.1-7.2. Среду кипятят, разливают в пробирки по 3 мл и стерилизуют в автоклаве при 1 атм (120°C) 20 мин. После охлаждения смеси до 45-50°C в каждую пробирку стерильно вносят по 0.3 мл 10%-ного стерильного раствора глюкозы. Готовая среда травянисто-зеленого цвета.

2. *Среда Меллера*, Состав: пептона -5.0 г, мясной воды (вода и мясо берется в соотношении 1:1) - 300.0 мл, бромкрезоловый красный 1.6%-ный раствор - 0.625 мл, крезоловый красный 0.2%-ный водный раствор - 2.5 мл, d-глюкозы - 0.5 г, пиридоксала (можно витамина B6) - 5.0 г дистиллированной воды - 1000 мл. Компоненты смешивают, pH смеси доводят до 6.0 или 6.5. Затем среду делят на 4 части, в три из которых добавляют по 1% одной из аминокислот - 1- аргинина, 1-лизина, 1-орнитина, (dl-формы - 2%). Четвертая часть среды (без аминокислоты) - контрольная. В пробирках с орнитином pH среды устанавливают после добавления аминокислоты, перед стерилизацией. Среду разливают в пробирки по 2 мл и стерилизуют в автоклаве при 1 атм (120°C) 20 мин.

3. *Среда Биргер-Крушинской*. Состав: гидролизата казеина (пептона) -5.0 г, дрожжевого экстракта - 3.0 мл, глюкозы - 1.0 г, индикатора бромтимолового синего - 45.0 мл (0.1%-ного раствора в 20%-ном спирте), дистиллированной воды - 1000 мл. Компоненты смешивают, устанавливают pH смеси 6.0-6.2. Среду делят на 4 части, в три из которых добавляют по 1% одной из аминокислот - 1-аргинина, 1-лизина, 1-орнитина, (dl-формы - 2%). Четвертая часть среды (без аминокислоты) - контрольная. В пробирках с орнитином pH среды устанавливают после добавления аминокислоты, перед стерилизацией. Среду разливают в пробирки по 2-4 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня или в автоклаве при 0.5 атм 15 мин.