

УДК 619:616.98:579.852.13

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АНАЭРОБНОЙ
ЭНТЕРОТОКСЕМИИ (НЕКРОТИЧЕСКОГО ЭНТЕРИТА) ПТИЦ
AVIAN NECROTIC ENTERITIS: SOME IMPROVEMENTS IN LABORATORY
DIAGNOSTICS**

**А.Н. Древилло, О.Б. Новикова
A.N. Drevilo, O.B. Novikova**

**Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт
птицеводства
All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science**

*Avian necrotic enteritis is an enterotoxaemia, caused by enteric Gram-positive bacterium *Cl. perfringens*. The disease is widespread in poultry and increasing in incidence. Diagnostics of this disease, especially of associative forms is quite difficult. We improved the method of microbiological indication *Cl. perfringens* for the needs of poultry industry.*

Анаэробная энтеротоксемия (некротический энтерит) птиц – это острая анаэробная инфекция, характеризующаяся диффузными фибринозно-некротическими поражениями слизистой оболочки тонкого отдела кишечника. Возбудителем является *Clostridium perfringens* типов А и С [9] (ранее возбудителем считался *Cl. perfringens* – типов В, С и D [6]).

Болезнь распространена повсеместно и наносит ощутимый ущерб промышленному животноводству. При субклиническом течении наряду с энтеритами регистрируют некрозы печени и мышечного желудка, что приводит к значительной выбраковке продукции на перерабатывающих предприятиях [9].

Определить причину энтеритов у птиц только по клиническим и патологоанатомическим признакам невозможно [8, 9], для подтверждения необходима лабораторная диагностика.

Согласно действующему ГОСТ [2], для подтверждения диагноза на это заболевание необходимо определить вид и тип возбудителя, выделенного из кишечника павших птиц, по основному летальному токсину в реакции нейтрализации. Однако часто в лабораториях ограничиваются ответом «выделен микроорганизм рода *Clostridium*», что совершенно неинформативно. Безусловно, индикация анаэробных микроорганизмов более сложна, чем, например, энтеробактерий, но вполне осуществима, даже при отсутствии специального оборудования, если учитывать основные физиологические особенности микроорганизмов данного рода.

Во-первых, основное требование – отбор материала от свежих трупов, поскольку через 3- 4 часа клостридии, обитающие при жизни в кишечнике птиц, павших от самых разных причин, активно проникают в органы и ткани трупа, поэтому обнаружение возбудителя в органах при отсутствии в содержимом кишечника не дает основания для постановки диагноза [6].

Для исследования отбирают измененные участки кишечника с содержимым, брыжеечные лимфатические узлы, кусочки печени, почек, селезёнки. Допускается по ГОСТ [2] и дает лучшие результаты именно отбор кусочков кишечника и паренхиматозных органов, что технически даже проще, чем посев пастеровской пипеткой.

В качестве транспортной среды не рекомендуется использовать физиологический раствор, поскольку он не обеспечивает поддержания стабильных уровней редокс–потенциала и рН, чем существенно ограничивает жизнеспособность анаэробных микроорганизмов.

Мы рекомендуем в качестве транспортной использовать тиогликолевую среду (среда для контроля стерильности), в пробирках по 5 мл. Она избыточно питательна за счет гидролизата казеина и экстракта кормовых дрожжей, содержит восстанавливающий компонент - тиогликолят натрия, небольшое количество агара (0,075%) для снижения диффузии кислорода в среду, 0,5% глюкозы и имеет слабощелочной pH (7,2). Данная среда позволяет сохранить жизнеспособность таких эпидемически опасных и зоопатогенных микроорганизмов, как клостридии, сальмонеллы и кампилобактерии, до 3-х суток при комнатной температуре и до 5-7 суток при охлаждении до +4°C.

Индикация *Cl.perfringens* проще, чем остальных представителей рода, поскольку он является нестрогим анаэробом и обладает рядом морфологических и культурально-биохимических особенностей, отличающих его от других патогенных клостридий. Во-первых, в организме птиц *Cl.perfringens* образует капсулу, которую легко обнаружить при окраске мазков по Гинсу; во-вторых, он неподвижен, что легко определяется в мазке «висячая капля» или «раздавленная капля»; в-третьих, - обладает сульфитредуцирующими свойствами, т.е. восстанавливает сульфиты до сульфидов, вызывая почернение в специальных средах, в-четвёртых, - дает быстрый специфический рост в молоке [6].

Согласно ГОСТ [2], из патологического материала делают мазки-отпечатки, которые окрашивают по Граму (*Cl.perfringens* – грамположительные крупные палочки с закругленными или обрубленными концами, споры крупные, овальные, центрально или субтерминально расположенные), и мазки на капсулу по Гинсу; далее материал растирают в стерильной фарфоровой ступке с небольшим количеством физиологического раствора, полученный гомогенат засевают в пробирки с жидкими питательными средами.

При использовании среды для контроля стерильности в качестве транспортной можно сделать мазки и посевы из самой среды со дна пробирки, что значительно ускоряет работу.

При посеве на жидкие питательные среды следует помнить, что анаэробный тип дыхания гораздо менее продуктивен, чем аэробный, поэтому объем посева должен быть достаточно большим - 0,5 – 2 мл и производиться пастеровской пипеткой со дна пробирки и на дно, не допуская попадания пузырьков воздуха. Колонии, выросшие на плотной питательной среде, также отбирают кончиком пастеровской пипетки и помещают на дно пробирки с жидкой питательной средой [6].

Первичный посев, согласно ГОСТ [2], производят в среду Китт-Тароцци (МППБ, мясо-пептонный печеночный бульон с кусочками печени под вазелиновым маслом). Общеизвестно, что такая среда наилучшим образом сохраняет жизнеспособность и токсигенность культур клостридий и применяется по целому ряду показаний, среди которых получение роста анаэробных микроорганизмов, в том числе при малом количестве клеток в посевном материале или наличии каких-либо ингибирующих факторов. Перед посевом среду регенерируют – кипятят на водяной бане и быстро охлаждают для удаления растворенного кислорода (свежеприготовленную среду регенерировать не надо).

Однако среда Китт-Тароцци при первичном посеве не дает возможности индикации *Cl.perfringens* и обладает селективными свойствами только за счет создания анаэробных условий. Поскольку общей особенностью бактериальных болезней в промышленном птицеводстве в настоящее время является развитие смешанных инфекций [1], врачи лабораторий сталкиваются с обилием в первичных посевах микроорганизмов родов *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* и других, менее требовательных к питательным средам, и по-разному влияющих на рост клостридий; например, энтерококки образуют

молочную кислоту, угнетающую рост клостридий, - для птиц это, несомненно, полезно, но очень затрудняет диагностику.

Для инактивации вегетативных клеток посева обычно рекомендуют прогреть [2], но *Cl.perfringens* редко образует споры в организме животных [5, 7], и в результате после прогревания в посевах встречаются лишь спорообразующие микроорганизмы рода *Bacillus*, обычно *B.cereus* или *B.mesentericus*, очень похожие на клостридии морфологически, но синтезирующие фермент каталазу (для его обнаружения достаточно капли перекиси водорода) и способные расти в аэробных условиях на простых питательных средах.

В руководстве [3] рекомендуется делать первичный посев одновременно на среду Китт-Тароцци, молоко по Тукаеву (пептонная вода с 5-6% обезжиренного молока) и железосульфитный агар (Вильсон, Блер, 1924) для индикации сульфитредуцирующих свойств.

Мы предлагаем использовать метод двойной индикации с промежуточным накоплением и производить первичный посев на МППБ и железосульфитное молоко (Робинсон, Стюарт, 1937) [4] или лактозо-сульфитный бульон (lactose sulphite broth, Merck®) в пробирках. На этих средах *Cl.perfringens* можно выделить в смеси с энтерококками, которые на других средах способны заметно угнетать его рост.

Такой комплексный подход позволяет через 3 - 6 часов оценить рост по нескольким признакам:

- 1) помутнение и газообразование на МППБ;
- 2) образование чёрного губчатого сгустка со следами пузырьков газа и прозрачной сероватой сыворотки при посеве в железосульфитное молоко; либо почернение лактозо-сульфитного бульона.

- 3) обнаружение в микроскопических препаратах, сделанных из МППБ, крупных грамположительных палочек, не обладающих активной подвижностью при исследовании культуры в препарате «висячая капля» или «раздавленная капля».

При получении указанных результатов можно сделать предварительное заключение об обнаружении в исследуемом материале *Cl.perfringens*.

Из проб, в которых имеется хотя бы один из вышеперечисленных признаков, мы рекомендуем пересеять материал на какую-либо жидкую питательную среду для накопления *Cl.perfringens* (МППБ с 1% глюкозы, мясо-казеиновую, казеиново-дрожжевую); при появлении признаков роста (помутнение, газообразование) – на плотную питательную среду с индикаторной системой на сульфитредуцирующие свойства (при наличии анаэробности – на поверхность среды, при отсутствии – глубинным способом) для получения чистой культуры и определения её токсигенности.

При посеве глубинным способом материал перемешивают с расплавленной средой, дают немного застыть и заливают сверху слоем той же среды или голодного агара толщиной не менее 0,2 см. Из почерневших участков среды, пересевая материал со дна чашки пастеровской пипеткой на МППБ, предварительно вырезав маленький участок верхнего слоя стерильным скальпелем или бактериологической петлей, можно получить чистую культуру *Cl.perfringens*.

При использовании усовершенствованной нами методики было исследовано 146 проб патологического материала от цыплят и кур разного возраста с 6 птицефабрик различного технологического направления: 127 проб от цыплят-бройлеров, 4 пробы от родительского стада бройлеров, 15 проб от яичных кур (внутренние органы, кишечник, помёт). От бройлеров мы выделили 7 культур *Cl.perfringens*; от яичных кур - 3 культуры, всего 10 культур (из печени, селезёнки, тонкого отдела кишечника). Помимо культур клостридий от птиц были выделены следующие эпидемически опасные и зоопатогенные микроорганизмы: *Salmonella*

enteritidis, *Salmonella gallinarum-pullorum*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Campylobacter jejuni* и другие.

Таким образом, приведенная схема исследования (первичная индикация – накопление – подтверждающая индикация) дает возможность быстрого выделения чистой культуры возбудителя анаэробной энтеротоксемии птиц даже при сильном обсеменении патологического материала посторонней микрофлорой.

Исследования выполнены при поддержке гранта президента РФ для молодых учёных – кандидатов наук МК-3041.2009.4.

Литература

1. Борисенкова А.Н. Проблема бактериальных болезней птиц на современном этапе развития промышленного птицеводства. // Материалы научно-практической конференции, посвящённой памяти академика Россельхозакадемии Р.Н.Коровина 5-6 июня 2007 года «Болезни птиц в промышленном птицеводстве. Современное состояние и стратегия борьбы». С. 198-202.
2. ГОСТ 26503-85. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов. М.: Издательство стандартов, 1985. 15 с.
3. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1972. С. 328 – 334.
4. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. под ред. Сидорова М.А. М.: Колос, 1995. 319 с.
5. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Микробиология. М.: «Медицина», 1980. С. 140.
6. Ургуев К.Р. Клостридиозы животных. М.: Россельхозиздат, 1987. 183 с.
7. Garmory H.S. et al. Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays // *Epidemiological Infectology* – 2000. 124, P. 61 – 67.
8. Songer J.G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals // *Clinical Microbiology Reviewes*. – 1996. 9:2. P. 216 – 234.
9. Williams R.B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity // *Avian Pathology*. – 2005. - 34:3, P. 159 — 180.