

ДІАГНОСТИКА КЛОСТРИДІОЗІВ: особливості застосування різних лабораторних методів

Одним із найпідступніших захворювань свиней з точки зору діагностики та правильного лікування вважають клостридіоз (анаеробна ентеротоксемія). Адже часто перебіг хвороби безсимптомний. Тому вчасно її виявити досить складно, а єдиним засобом підтвердження діагнозу є лабораторні методи.

Наталія Неверковець,
Володимир Глебенюк,
Науково-дослідний центр
біобезпеки та екологічного
контролю ресурсів АПК
(BIOSAFETY-CENTER)

КЛОСТРИДІОЗ СВИНЕЙ: ЕТІОЛОГІЯ ТА ПАТОГЕНЕЗ

Анаеробна ентеротоксемія—найрозповсюдженіше інфекційне захворювання поросят в неонатальному періоді. Характеризується високою летальністю з ознаками ураження шлунково-кишкового тракту або, навпаки, помірно вираженим запаленням кишечника та відсутністю загиблих тварин. Така варіабельність прояву залежить від типу збудника, що спричиняє інфекційний процес: *Cl. perfringens* і *Cl. difficile*.

Бактерії уражають поросят у перший тиждень життя. Фекалії інфікованих тварин мають жовто-зелений колір з бульбашками газу, згодом набувають бурого забарвлення. Патологоанатомічні зміни найчастіше спостерігають у тонкому відділі кишечника: дифузний набряк, потовщення слизової оболонки, кривавий уміст, геморагічний (фото 1) або некрогеморагічний ентерит, брижову гіперемію. У дорослих свиней хвороба протікає переважно в прихованій формі та проявляється як негеморагічна мукоїдна діарея.

Патогенність *Cl. perfringens* обумовлена наявністю токсинів: альфа [CPA], бета [CPB], епсілон [ETX], йота [ITX]), а також недавно відкритими ентеротоксином і бета-2 токсином (таблиця 1). Альфа-токсин має гемолітичну дію, руйнує тромбоцити, нейтрофіли, пошкоджує капіляри. Бета-токсин спричиняє сегментарний кишковий некроз. Епсілон- і йота-токсини—менш патогенні, але посилюють дію інших токсинів. Ентеротоксин провокує укорочення та руйнування ворсинок слизової

оболонки кишечника. Бета-2-токсин—аналогічний дії бета-токсину, але має менш виражену цитотоксичну активність.

ДІАГНОСТИКА КЛОСТРИДІОЗІВ

На етапі відбору матеріалів для лабораторних досліджень першочергове значення має свіжість патологічного матеріалу, відібраного для аналізу. Адже після загибелі тварини відбувається швидка (впродовж 3–4-ох годин) інактивація токсинів патогенних клостридій. Тож треба якнайшвидше доставити біологічний матеріал (уміст кишечника, печінка, селезінка, фекалії) в лабораторію. Або використовувати транспортні середовища, які дозволяють підтримувати достатню кількість мікроорганізмів і їх токсинів триваліший час.

Досить довго «золотим стандартом» в лабораторній діагностиці клостридіозів був бактеріологічний метод. Він дозволяв виділяти чисту культуру бактерій (фото 2), визначати її тип, токсиноутворення і чутливість до антибіотиків. Діагноз вважали підтвердженим при виділенні культури клостридій в кишечнику і паренхіматозних органів або виявлення токсинів у вмісті кишечника за допомогою реакції нейтралізації (біопроба на білих мишах).

Проте, згідно з даними американських науковців, колонізація паренхіматозних органів клостридіями відбувається після загибелі тварини, незалежно від того, чи вона спричинена впливом токсинів анаеробної флори, чи інших чинниками. Тобто умовно-патогенна мікробна флора кишеч-

■ Таблиця 1

Продуктування токсинів, спричинене різними типами *Cl. perfringens*

Токсино-типи	Види токсинів і кодуючі їх гени					
	α (альфа)	β (бета)	ϵ (епсі-лон)	ι (йота)	Ентеротоксин	$\beta 2$ (бета2)
	CPA	CPB	ETX	IAP	CPE	CPB 2
A	+					+
B	+	+	+			+
C	+	+				+
D	+		+			+
E	+			+		+
F	+				+	+

НАТАЛІЯ НЕВЕРКОВЕЦЬ,

завідуюча відділом бактеріології та біотехнології Biosafety-center

Освіта: вища ветеринарна.
Професійні інтереси: ветеринарна мікробіологія, розробка та впровадження моніторингу інфекційних хвороб у господарствах.

ВОЛОДИМИР ГЛЕБЕНЮК,

науковий співробітник відділу бактеріології та біотехнології Biosafety-center

Освіта: вища, кандидат ветеринарних наук.
Професійні інтереси: ветеринарна мікробіологія.

ника колонізує внутрішні органи, сприяючи аутолітичним процесам (процеси розпаду компонентів тканин під впливом ферментів, що знаходяться в них). Це означає, що ізоляція культури клостридій з патологічного матеріалу не є достатньою підставою для постановки діагнозу. З іншого боку, виявлення токсинів в біопробі на мишах також має низку недоліків: насамперед, тривалість і трудомісткість процедури.

Таким чином, в лабораторній діагностиці анаеробної ентеротоксемії необхідно застосовувати методи на основі ідентифікації факторів патогенності клостридій (токсигенних типів бактерій або безпосередньо токсинів), яким властива висока чутливість і специфічність, а також швидкість виконання. Це, зокрема, методи імуоферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції.

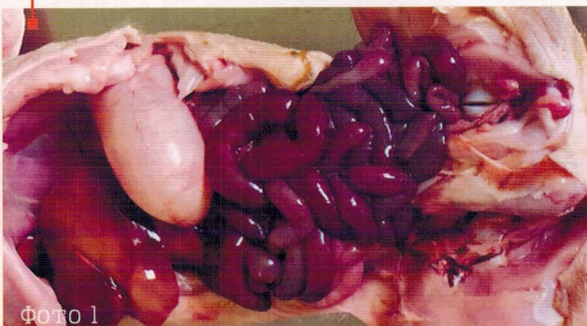
Геморагічний ентерит у поросяти, спричинений *Cl. perfringens*

Фото 1

Джерело: BIOSAFETY-CENTER, 2020

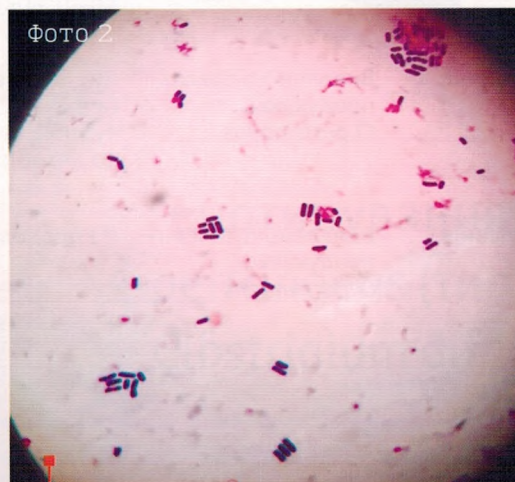


Фото 2

Мазок з культури клостридій, виділеної від свиней

Імуноферментний аналіз (ІФА)—високоспецифічний метод діагностики, який дозволяє визначити наявність у зразку токсинів і ферментів.

Цей метод добре підходить для скринінгових досліджень, завдяки своїй високій стабільності та чутливості. За допомогою ІФА можна визначити один з основних чинників патогенності *Cl. difficile*—глутаматдегідрогеназу—фермент, який виробляють як токсигенні, так і нетоксигенні штами бактерій.

Для якісного визначення токсинів (α , β , ϵ , ι , $\beta 2$) *Cl. perfringens* застосовують непрямий імуноферментний аналіз з використанням поліклональних і моноклональних антитіл.

Суть методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ідентифікації токсигенних клостридій полягає у виявленні унікальних фрагментів нуклеотидної послідовності ДНК генів, що кодують токсини.

Для виявлення токсигенних клостридій використовують мультиплекс ПЛР-системи для ідентифікації генів, що кодують токсини *Cl. perfringens*: α (ср α), β (ср β), ϵ (етх), ентеротоксин (ср ϵ), ι (іар), $\beta 2$ (ср $\beta 2$), а також гени, які кодують токсини *Cl. difficile*: TcdA/B (tcdA/B). Порівняно зі стандартною процедурою ідентифікації типу *Cl. Perfringens* шляхом постановки реакції нейтралізації токсинів специфічними сироватками, типування токсигенних клостридій в ПЛР є менш трудомістким і швидшим способом аналізу, що має високу чутливість і специфічність. При цьому типування токсигенних штамів *Cl. perfringens* і *Cl. difficile* має вирішальне значення, оскільки дозволяє правильно обрати схему заходів щодо профілактики і ліквідації анаеробної ентеротоксемії молодняка свиней.

Таким чином, беручи до уваги біологічні особливості збудників анаеробної ентеротоксемії, застосовують різні лабораторні методи діагностики (таблиця 2). Проте найраціональнішим є комбінування бактеріологічного, ІФА і ПЛР методів. ■

Таким чином, беручи до уваги біологічні особливості збудників анаеробної ентеротоксемії, застосовують різні лабораторні методи діагностики (таблиця 2). Проте найраціональнішим є комбінування бактеріологічного, ІФА і ПЛР методів. ■

■ Таблиця 2

Результати проведення лабораторних досліджень біологічного матеріалу на анаеробну ентеротоксемію свиней з різних господарств

Господарство, №	Результати досліджень			Інтерпретація результатів
	ІФА (виявлення основних летальних токсинів <i>Cl. perfringens</i>)	ПЛР (виявлення токсин-кодуючих генів <i>Cl. perfringens</i>)	Бактеріологія (виявлення <i>Cl. perfringens</i> в органах)	
1.	Виявлено альфа-токсин у вмісті кишечника	Виявлено α -токсин продукуючі та β -токсин продукуючі <i>Cl. perfringens</i>	Виділено культуру та визначено чутливість до антибіотиків	Наявність альфа-токсину у вмісті кишечника безпосередньо вказує на токсемію. За наявності ср α та ср β генів визначено <i>Cl. perfringens</i> типу С.
2.	Виявлено альфа-токсин у вмісті кишечника	Не проводилось	Виділено культуру та визначено чутливість до антибіотиків	Наявність альфа-токсину у вмісті кишечника безпосередньо вказує на токсемію. Виділену культуру ідентифіковано як <i>Cl. perfringens</i> .
3.	Відсутність токсинів у кишечника	Виявлено α -токсин-продукуючі <i>Cl. perfringens</i>	Виділено культуру та визначено чутливість до антибіотиків	За відсутності токсинів у біологічному матеріалі, але наявністю ср α гену визначено <i>Cl. perfringens</i> типу А.
4.	Відсутність токсинів у кишечника	Виявлено α -токсин-продукуючі <i>Cl. perfringens</i>	Не проводилось	За відсутності токсинів у біологічному матеріалі та негативних результатах бактеріологічних досліджень, наявності ср α гена <i>Cl. perfringens</i> типу А не достатньо для постановки діагнозу на анаеробну ентеротоксемію. Це вимагає проведення подальших лабораторних досліджень.

Джерело: Biosafety Center, 2020