

Н.Н.Андросик, академик ААН РБ, доктор ветеринарных наук, профессор
Н.В.Москалева, младший научный сотрудник

Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского

УДК 619:616.98:579.852.13ЭН

Этиологическая роль энтеротоксигенных штаммов *Clostridium perfringens* типа А в заболевании телят энтеротоксемией

*Цель работы – изучение роли энтеротоксигенных штаммов *Cl. Perfringens* типа А в возникновении желудочно-кишечных болезней новорожденных телят.*

*The purpose of our work was to study a role of enterotoxigenic *Cl. perfringens*, type A strains in cases of development of gastrointestinal diseases in newborn calves.*

Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь № 2, 1999

Н.Н.Андросик, академик ААН РБ, доктор ветеринарных наук, профессор

Н.В.Москалева, младший научный сотрудник

Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского

УДК 619:616.98:579.852.13ЭН

Этиологическая роль энтеротоксигенных штаммов *Clostridium perfringens* типа А в заболевании телят энтеротоксемией

*Цель работы – изучение роли энтеротоксигенных штаммов *Cl. Perfringens* типа А в возникновении желудочно-кишечных болезней новорожденных телят.*

*The purpose of our work was to study a role of enterotoxigenic *Cl. perfringens*, type A strains in cases of development of gastrointestinal diseases in newborn calves.*

Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь № 2, 1999

Исследованиями установлено, что в ряде хозяйств республики регистрируется анаэробная энтеротоксемия телят, вызываемая указанным возбудителем, который изолирован в 54,3% случаев от числа исследованного материала. При этом нами выделено 12 (31,5%) штаммов, которые не типировались диагностическими стандартными сыворотками. Образующий ими энтеротоксин обладал летальными, эритемными, диареагенными свойствами, а при экспериментальном заражении телят вызывал клинические признаки и патологоанатомические изменения, наблюдаемые при естественном течении этой болезни.

Среди желудочно-кишечных заболеваний телят значительное место занимает анаэробная энтеротоксемия, которая протекает в форме энзоотий, характеризуется расстройством желудочно-кишечного тракта с явлениями интоксикации и сопровождается большим процентом (20–40%) падежа животных [1, 4, 5].

Возбудителем этой болезни наиболее часто является *Cl. perfringens* типов А, В, С, D, Е, F, который продуцирует 12 различных токсинов, однако основную роль в патогенезе заболеваний играют альфа, бета, дельта и эпсилон (α , β , δ , ϵ)-токсины, обладающие летальными, некротическими и гемолитическими свойствами. Они синтезируются вегетативными клетками клостридий в период их активного роста и выделяются в окружающую среду. Если в отношении типов В, С, D, Е, F нет сомнения в этиологической их роли, то значение *Cl. perfringens* типа А остается спорным. Это связано с тем, что по некоторым факторам токсигенности многие культуры *Cl. perfringens* типа А не укладываются в номенклатуру классических штаммов и являются наиболее вариабельными по токсическим свойствам [2, 3, 6].

Целью настоящей работы было провести исследование по выделению энтеротоксигенных штаммов *Cl. perfringens* типа А, изучить у них способность к споро- и энтеротоксинообразованию, что является необходимым этапом в изучении этиологии, разработке современных методов диагностики и средств специфической профилактики болезней, обусловленных этим микроорганизмом.

Для выделения энтеротоксигенных штаммов *Cl. perfringens* типа А исследованию подвергнут материал (фекалии, содержимое тонкого отдела кишечника) от 360 больных и павших телят с признаками расстройства пищеварения из 15 хозяйств республики. В неблагополучных хозяйствах изучали клиническое проявление и течение болезни, учитывали возраст больных и павших животных, а также патологоанатомические изменения.

При бактериологических исследованиях посевы проводили на МППБ (бульон Китт-Тароцци), агар Цейслера с добавлением 0,5% глюкозы, лакмусовое молоко и молоко с железом.

Выделение и идентификацию штаммов *Cl. perfringens*, культуральные, морфологические, тинкториальные и биохимические свойства культур изучали общепринятыми методами. При этом обращали внима-

During research it was found that in a number of farms anaerobic enterotoxemia of calves was recorded caused by the mentioned agent isolated in 54,3% of examined materials. Besides, 12 (31,5%) strains were isolated by us, which could not be typified by Standard diagnostic serum. Enterotoxin developed by these bacteria had lethal, erythemic diarrheal properties and induced clinical signs and pathologic and anatomic changes after experimental infections which were typical for natural infections.

ние на величину, форму, цвет колоний на питательных средах, а также интенсивность и характер роста.

После микроскопии, убедившись в типичности культур, делали посевы из изолированных колоний на МППБ с добавлением глюкозы для получения чистых культур. Культуру поддерживали в лабораторных условиях путем пересева на МППБ без глюкозы и хранили при температуре +4... +8°C.

Токсичность фильтратов содержимого тонкого отдела кишечника и фекалий больных телят, а также выделенных штаммов *Cl. perfringens* определяли путем внутривенного введения белым мышам весом 16–18 г в дозе 0,5 мл.

Для подтверждения взаимосвязи энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А и заболеваемости энтеротоксемией нами произведен ряд опытов по экспериментальному инфицированию лабораторных животных и новорожденных телят. Всего в опытах использовали 1750 белых мышей, 12 кроликов, 25 морских свинок, 10 телят.

Исходя из того, что энтеротоксинообразование данного микроорганизма неразрывно связано со споруляцией, мы у всех выделенных штаммов *Cl. perfringens* типа А испытывали способность к споруляции на модифицированной среде ДС (Duncan, Strong), по следующей методике: 1 мл культуры *Cl. perfringens* типа А, после двукратного пассажа на тиогликолевой среде вносили в 10 мл среды ДС и инкубировали в течение 16–18 ч при температуре 37°C, а затем микроскопически определяли спорообразование в посевах.

Летальные свойства энтеротоксина определяли методом биопробы на белых мышах. Для этого спорулирующие штаммы выращивали на среде ДС в течение 48 ч и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр и вводили внутривенно белым мышам в дозе 0,5 мл.

Эритемную активность энтеротоксина изучали на 24 морских свинках путем его внутривенных инъекций в объеме 0,1 мл. За единицу эритемной активности энтеротоксина принимали участок эритемы диаметром 0,8 см. Все пробы инъектировали в два места одной и той же морской свинке. Средние результаты получали минимально от трех разных морских свинок. В качестве контроля для каждого животного использовали чистую питательную среду (плацебо). Результаты учитывали через 18–24 ч.

Изучение диареягенных свойств выделенных штаммов *Cl.perfringens* типа А проводили на изолированных петлях кишечника новорожденных телят по методике C.L.Duncan and D.H.Strong [7].

Теленку под тиопенталовым наркозом проводили лапоротомию. Из брюшной полости извлекали тонкий отдел кишечника и, отступая 15–20 см от 12-перстной кишки, накладывали лигатуру таким образом, чтобы изолировать 20–25 сегментов длиной около 15 см на расстоянии 15 см друг от друга. В каждый из изолированных сегментов вводили культуру *Cl.perfringens* типа А, суспендированную на спорулирующей среде в нарастающих концентрациях микробных клеток от 2×10^4 до 2×10^8 . После экспозиции, равной 8–10 ч, теленка усыпляли избыточным введением тиопентала и определяли индекс дилатации, который рассчитывали путем деления количества содержимого в кишечной петле в мл на длину петли в см. Для контроля в качестве плацебо использовали питательную среду без микробных клеток. Диагностический убой проводили с обязательным патологоанатомическим осмотром и отбором материала для патогистологических исследований.

Этиологическую роль энтеротоксигенных штаммов *Cl.perfringens* типа А изучали путем воспроизведения заболевания на телятах. Для опыта из благополучного по энтеротоксемии хозяйства подобрали 8 клинически здоровых телят в возрасте 1–4 дней весом 25–30 кг. В сыворотке крови подопытных животных естественных анитоксинов против *Cl.perfringens* не обнаружено.

После предварительного наблюдения в течение 2 дней провели постановку опыта по экспериментальному воспроизведению энтеротоксемии.

Теленка № 1 заразили путем выпаивания 48-часовой спорулирующей культуры *Cl.perfringens* типа А, содержащей 8 ДЛМ/кг живого веса в количестве 500 мл.

Теленка № 2 заразили путем выпаивания 48-часовой спорулирующей культуры *Cl.perfringens* типа А, содержащей 4 ДЛМ/кг живого веса в количестве 500 мл.

Теленка №3 заразили путем выпаивания 48-часовой спорулирующей культуры *Cl.perfringens* типа А, содержащей 2 ДЛМ/кг живого веса в количестве 1000 мл.

Телят № 4, 5 и 6 заражали внутривенно в дозах 2, 4 и 8 ДЛМ/кг живого веса соответственно. Перед заражением культуру центрифугировали и фильтровали через бумажный фильтр.

Контрольные телята (№ 7 и № 8) получали культуральную жидкость без микробных клеток (плацебо).

Для оценки состояния опытных и контрольных животных отбирали пробы кала с целью определения их токсичности, вели общее клиническое наблюдение.

Результаты исследований.

В результате наших исследований анаэробная энтеротоксемия, обусловленная *Cl.perfringens* типа А, была установлена в пяти хозяйствах (к-з “Правда” Лиозненского района, с-з “Горняк” Солигорского района, с-з “Рыдомольский” Толочинского района, к-з “Заболотье” Мстиславского района, к-з “Красный берег” Жлобинского района). В двух хозяйствах (к-з им. Куйбышева Кировского района, к-з им. Мичурина Столбцовского района) была выявлена энтеротоксемия, вызванная *Cl.perfringens* типа С (табл.).

Болезнь во многих обследованных хозяйствах носила стационарный характер, регистрировалась на протяжении нескольких лет и не зависела от сезона года. В большинстве случаев диарея имела место среди 2–12-дневных телят. Как правило, животные заболевали на 2–5-й день после рождения, в некоторых случаях клинические признаки проявлялись уже через 16–18 ч после рождения.

При патологоанатомическом исследовании обнаруживали катарально-геморрагическое воспаление слизистой дуоденальной части сычуга, диффузный катарально-геморрагический энтерит. Под эпикардом и в корковом слое почек выявляли точечные кровоизлияния. Легкие отечны, вишневого цвета, наполнены кровью, печень дряблой консистенции, пульпа селезенки размягчена. Брыжеечные и порталные лимфо-

Таблица. Результаты выделения *Cl.perfringens* от новорожденных телят в хозяйствах Республики Беларусь

Наименование хозяйства	Исследов. проб патматериала	Выделено		В том числе			
		штаммов	%	тип А	%	тип С	%
к-з “Правда” Лиозненского района	57	17	29,8	12	70,5		
с-з “Горняк” Солигорского района	43	14	32,5	10	71,4		
с-з “Рыдомольский” Толочинского района	25	10	40,0	7	70,0		
к-з “Заболотье” Мстиславского района	21	8	38,0	5	62,5		
к-з “Красный берег” Жлобинского района	19	7	36,8	4	57,1		
к-з им.Куйбышева Кировского района	18	5	27,7			2	40,0
к-з им.Мичурина Столбцовского района	24	9	37,5			5	55,5
Всего	164	70	42,7	38	54,3	7	10,0

узлы отечны, увеличены в размере, на разрезе гиперемированы.

Фильтрат содержимого тонкого отдела кишечника от 164 телят в 38 (54,3%) случаях был токсичен для белых мышей. 26 проб токсинов (68,4%) нейтрализовались антиоксической типоспецифической сывороткой *Cl.perfringens* типа А, биологическую активность 12 проб (31,5%) нейтрализовали антиэнтеротоксической диагностической сывороткой типа А, полученной в БелНИИЭВ им. С.Н.Вышелесского в 1988 г. После проведения бактериологического исследования изученные штаммы *Cl.perfringens* обладали характерными для данного вида микроорганизмов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Выделенные микроорганизмы представляли собой короткие, толстые, неподвижные палочки с закругленными концами, длиной 2–4, шириной 0,8–1,8 мк. В мазках из сред, богатых углеводами и белками, многие культуры имели кокковидную форму. В старых культурах, особенно под влиянием неблагоприятных условий, часто образовывались нитевидные, коккообразные или вздутые формы. В мазках из суточной культуры микробы располагались одиночно или кучками. Споры крупные, овальные превышали ширину микроба и располагались центрально, иногда субтерминально на средах без добавления глюкозы. По Граму, микробы окрашивались положительно, а в некоторых старых культурах – отрицательно.

Морфология микроба наиболее характерно проявлялась в мазках, приготовленных из культур 18-часового роста на кровяном агаре.

Выделенные микроорганизмы хорошо росли на обычных питательных средах, применяемых для выращивания анаэробов. На бульоне Китт-Тароцци с добавлением 0,5% глюкозы через 2–3 ч наблюдался бурный рост, характеризующийся интенсивным помутнением и газообразованием. Максимальное образование газов в результате сбраживания углеводов, имеющихся в среде, происходило через 2–2,5 ч с момента начала роста. Через сутки рост прекращался, и микробы оседали на дно в виде рыхлого серо-белого осадка.

В бактериологических чашках на агаре Цейслера с добавлением 2% глюкозы в анаэробных условиях вырастали крупные, гладкие колонии серого цвета с ровными краями, слегка выпуклые по центру, с одной или двумя зонами гемолиза, которые при выдерживании на воздухе приобретали зеленоватый оттенок, что является характерным для колоний микроорганизмов данного вида. Из изолированных колоний (не менее 5) выделяли чистую культуру *Cl.perfringens*, которая продуцировала токсин с той же активностью, как и в организме животного. Токсины возбудителя, как же как и токсины содержимого тонкого отдела кишечника, инактивировались формалином и разрушались кипячением.

При выращивании *Cl.perfringens* на лакмусовом мо-

локе наблюдалось свертывание, покраснение среды и газообразование, на молоке с железом выделенные культуры давали резкое почернение.

Все культуры *Cl.perfringens* образовывали сероводород и не вырабатывали индол.

На средах с сахарами изучаемые культуры ферментировали глюкозу, мальтозу, галактозу, сахарозу, лактозу и глицерин с образованием кислоты и газа, но не ферментировали маннит, дульцит, сорбит, изодульцит и арабинозу.

В результате исследований установлено, что из 38 изученных штаммов только 12 (31,5%) образовывали споры в среде ДС, с уровнем споруляции от 25 до 80% и обладали летальной активностью от 2 до 8 ДЛМ/мл. Гибель мышей наступала через 5–10 мин. после внутривенного введения, что характерно для действия энтеротоксина *Cl.perfringens*. Споры оказались термоустойчивыми, выдерживали кипячение в течение часа, активность и количественное содержание энтеротоксина не всегда коррелировали с уровнем споруляции штаммов.

Результаты проведенных опытов показали, что изученные нами штаммы синтезировали антигенно однородный энтеротоксин, что подтверждалось в реакции нейтрализации на белых мышах с помощью специфической антиэнтеротоксической сыворотки *Cl.perfringens* типа А.

Энтеротоксин выделенных штаммов вызывал участки эритемы на коже морских свинок диаметром от 0,8 до 1,2 см. При этом следует отметить, что эритему вызывали штаммы, содержащие от 4 до 8 ДЛМ/мл энтеротоксина на спорующей среде. Штаммы активностью 2 ДЛМ/мл вызывали эритему не более 0,5 см. Активность неизвестной пробы всегда сравнивали со стандартом, которым служил энтеротоксигенный штамм 8239 *Cl.perfringens* типа А, полученный из НИИЭиМ им. Н.Ф.Гамалеи, с активностью 8 ДЛМ/мл. Антиэнтеротоксическая сыворотка полностью нейтрализовала эритемные свойства всех взятых в опыт токсинов.

Таким образом, фактор, обуславливающий эритему штаммами *Cl.perfringens*, выделенными от телят, является специфичным.

Из 38 испытанных штаммов *Cl.perfringens* 12 обладали диареягенными свойствами с индексом дилатации от 0,5 до 2,5 соответственно.

В результате патологоанатомических исследований установлена прямопропорциональная зависимость изменений от концентрации введенной культуры. В петлях кишки, в которые было введено 2×10^4 м.к., выявляли преимущественно гиперемию слизистой оболочки и наличие в просвете небольшого количества серозного экссудата без видимых признаков дилатации (0,24). Вышеуказанные изменения достигали максимума при введении культуры в дозе 2×10^7 и 2×10^8 м.к., характеризовавшиеся резким увеличением в объеме сегментов кишок (до 4 см), вследствие переполнения просвета серозным экссудатом.

Гистологические исследования подтвердили указанную зависимость. Так, если в сегментах после введения минимальной дозы культуры выявляли главным образом острую застойную гиперемия сосудов, набухание энтероцитов и их криброзность, то в максимальной дозе преобладали деструктивные процессы (разрушение крипт вследствие десквамации энтероцитов, цитокариопикноза, рексиса и лизиса).

Нами установлено, что минимальной концентрацией *Cl.perfringens* типа А, способной вызвать диарею, является 2×10^7 м.к. Любое увеличение количества микробных клеток выше 2×10^8 не вело к соответствующему повышению накопления жидкости в лигированной петле. Срезы контрольных петель не показали явных структурных изменений и напоминали таковые нормального кишечника.

Опыты по экспериментальному заражению новорожденных телят культурой, содержащей энтеротоксин *Cl.perfringens* типа А, показали, что явные клинические признаки были выявлены у теленка, получившего культуру, содержащую 8 ДЛМ токсина в 1 мл для белой мыши. Через час после заражения отмечали кратковременное повышение температуры тела до 40°C , учащение пульса и дыхания, спазмы желудка и кишечника, понос, фекалии зловонного запаха, желтого цвета с пузырьками газа. У теленка, получившего 500 мл культуральной жидкости активностью 4 ДЛМ/мл, клинические признаки проявились через 1,5 ч после заражения и были выражены в меньшей степени, чем в первом случае. У третьего теленка, получившего 1000 мл спорулирующей среды активностью 2 ДЛМ/мл, через 2 ч наблюдали вздутие живота, которое спало через 3,5 ч. При этом не отмечали потери аппетита, а температура, пульс и дыхание оставались в пределах нормы.

Пробы фекалий, отобранные в начальный период болезни, были токсичны при внутривенном введении белым мышам и нейтрализовались антиэнтеротоксической сывороткой *Cl.perfringens* типа А.

При внутривенном введении телятам энтеротоксигенных культур наблюдали следующую клиническую картину: у теленка, получившего 8 ДЛМ/мл (для белой мыши) энтеротоксина *Cl.perfringens* типа А, через 2 мин. отмечали легкое покашливание и учащенное дыхание (Д 108). Через 4 мин. водянистый понос бледно-желтого цвета, пошатывание, зрачки расширены, слизистые верхних дыхательных путей анемичны, через 17 мин. количество дыхательных движений снижалось до 76, однако общее состояние ухудшалось. Через 20 мин. после введения энтеротоксина теленок погиб с признаками асфиксии и явными интоксикации.

Теленок, получивший 4 ДЛМ/мл, погиб с такими же признаками через 55 мин.

Теленок, получивший 2 ДЛМ/мл, тяжело переболел.

Клиническая и патологоанатомическая картина у экспериментально зараженных животных в основном не отличалась от наблюдаемой при естественном течении заболевания. Животные, которые получили питательную среду без микробных клеток, не заболели.

Фильтрат содержимого тонкого кишечника павших телят, а также фекалии больного теленка были токсичны при внутривенном введении белым мышам и нейтрализовались антиэнтеротоксической сывороткой. От зараженных телят получена также исходная культура.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показали, что в ряде хозяйств Республики Беларусь регистрируется анаэробная энтеротоксемия телят, вызываемая энтеротоксином *Cl.perfringens* типа А. Указанный токсин обладает летальными, эритемальными, диареагенными свойствами, а после экспериментального заражения телят вызывает клинические признаки и патологоанатомические изменения, наблюдаемые при естественном течении этой болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дереза А.Ф., Ленькова В.А., Сергеева Т.А., Бакулин И.Н. Этиология, клинические и патоморфологические признаки энтеротоксемии телят // Инфекционные болезни крупного рогатого скота и меры борьбы с ними: Сб. науч. тр. / БелНИИЭВ. – Минск, 1982. – С. 87–90.
2. Дереза А.Ф. Энтеротоксигенные свойства штаммов *Cl.perfringens* типа А, выделенных от новорожденных телят при острых желудочно-кишечных заболеваниях // Вопросы интенсификации и научно обоснованного ветеринарного обслуживания промышленного животноводства: Тез. докл. конф. – Кишинев, 1987. – С. 9.
3. Дереза А.Ф., Лосякина Н.В. Энтеротоксигенный фактор *Cl.perfringens* и его этиологическая роль в диарее новорожденных телят // Тез. докл. III Всесоюзной конф. по эпизоотологии. Новосибирск, 24–26 сентября 1991 г. – Новосибирск, 1991. – С. 276–277.
4. Леньков В.И., Ленькова В.А. Анаэробные желудочно-кишечные заболевания молодняка сельскохозяйственных животных. – Минск: Ураджай, 1974. – 80 с.
5. Литвин В.П., Поживил А.И. Инфекционные и инвазионные болезни телят. – Минск, 1991. – С. 84–88.
6. Сергеева Т.И., Лайшев А.Х., Бакулин И.Н. Значение энтеротоксигенных штаммов *Cl.perfringens* типа А в этиологии инфекционной энтеротоксемии крупного рогатого скота // Докл. ВАСХНИЛ. – 1987. – № 5. – С. 32–34.
7. Duncan C.L., Sugiyama H. and Strong D.H. Rabbit ileal loop response to strains of *Cl.perfringens* // J. Bacteriol. – 1968. – V. 95. – P. 1560–1566.