

УДК 636:576.8.07:006.354

В.Н. АФОНЮШКИН, кандидат биологических наук, заведующий сектором,
В.С. ЧЕРЕПУШКИНА, лаборант-исследователь,
А.С. КИРЕВИЧЕВА, лаборант,
Е.В. ДУДАРЕВА, научный сотрудник

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
630501, Новосибирская область, пос. Краснообск
e-mail: referent@ievsidv.ru

М.Л. ФИЛИПЕНКО, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Лаврентьева, 8
e-mail: lisocim@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ ИНФИЦИРОВАННОСТИ ПЕЧЕНИ И КИШЕЧНИКА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* У КУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Клостридиозы кур, вызываемые *Clostridium perfringens*, наносят существенный экономический ущерб и могут стать причиной заражения и отравления людей, потребляющих птицеводческую продукцию с неблагополучных по клостридиозам птицефабрик. Исследования проводили в секторе молекулярной биологии птиц Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Новосибирская область, пос. Краснообск) и лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины (Новосибирск). С использованием ПЦР-анализа, гистологических и микробиологических методов оценена инфицированность кишечника кур и цыплят-бройлеров различных возрастов. Рассмотрено значение полимеразной цепной реакции в комплексной диагностике клостридиозов. В ряде случаев при гистологическом исследовании в очагах некротических поражений печени и кишечника встречались клостридии. Результаты данных патологоанатомических и гистологических исследований были верифицированы ПЦР, что давало основание ставить диагноз – клостридиоз. Для изучения уровня инфицированности кур *C. perfringens* исследовали 1052 пробы клоакальных смывов, более 50 проб патологического материала, отобранных на семи птицефабриках Российской Федерации. Обнаружен неравномерный характер распределения инфицированных *C. perfringens* цыплят (0–80 %). Сделано заключение о том, что существуют неучтенные факторы, влияющие на восприимчивость кур к заражению (например, структура микробиоценоза кишечника), или эффективность санитарных мероприятий достаточна для предотвращения заноса *C. perfringens* в отдельные птичники.

Ключевые слова: *Clostridium perfringens*, клостридиозы, полимеразная цепная реакция, цыплята-бройлеры.

Clostridium perfringens — грамположительная анаэробная спорообразующая палочковидная бактерия рода *Clostridium*. Представители этого вида больше, чем другие клостридии, экологически связаны с кишечником человека и животных [1–3]. По спектру продуцируемых токсинов различают пять типов *C. perfringens* – А, В, С, D, Е. Заболевания кур чаще связаны с типом А и С (некротизирующий энтерит) [3]. Актуальность работы обусловлена широкой распространенностью на птицефабриках токсикозов и инфекций, ассоциируемых с *C. perfringens*, наличием рисков заражения людей и возникновения как спорадических, так и массовых случаев токсикоинфекций. Для диагностики пищевых и кормовых токсикоинфекций, вызванных *C. perfringens*, применяют методы микробиологи-

ческого анализа, предпочтительно с оценкой содержания спор на 1 г кишечного содержимого (диагностически значимым критерием является наличие более 10^5 спор/г) [4, 5]. Также используют серологическую диагностику [6, 7]. Большое значение имеет определение типа токсина, продуцируемого микроорганизмом [8–11]. Клостридиозы у птицы возникают не вследствие самого факта заражения клостридиями, а из-за создания их высокой концентрации в организме за счет размножения или поступления извне в большом количестве [12–14]. В связи с этим дифференциальная диагностика клостридиозов является сложной задачей. Один из путей решения проблемы – анализ инцидентности на основе массовых скрининговых исследований у птицы с различными уровнями манифестации клостридиозов (а также с их отсутствием).

Цель исследования – усовершенствование критериев дифференциальной диагностики клостридиальных поражений печени и кишечника у кур и цыплят-бройлеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в секторе молекулярной биологии птиц Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока и лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины.

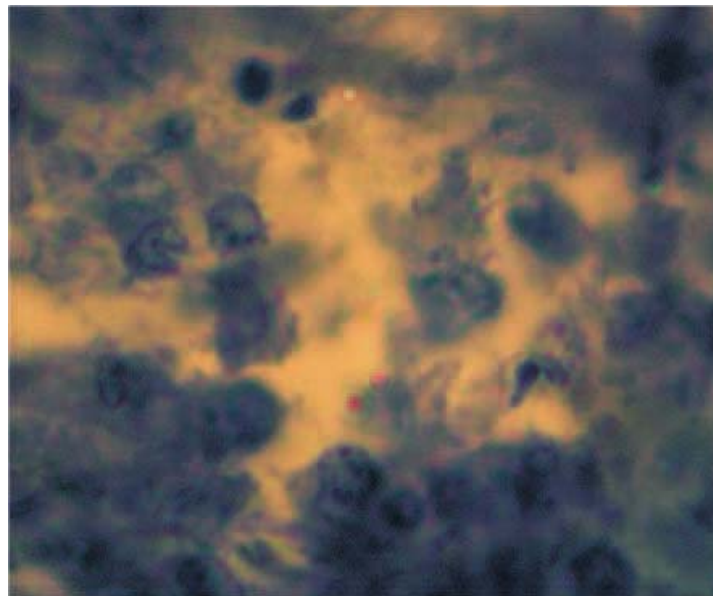
Для изучения уровня инфицированности кур *C. perfringens* исследовали 1052 пробы клоакальных смывов, более 50 проб патологического материала, отобранных на 7 птицефабриках Российской Федерации. Клостридий культивировали на бульоне Шедлера. Выделение ДНК из культур осуществляли методом с FAST, силико-сорбционным и фенол-хлороформными методами. Выявление геномной ДНК *C. perfringens* в биоматериале птицы проводили с использованием двух методических подходов: прямого детектирования геномной ДНК, выделенной из патологического материала (печень, кишечное содержимое) силико-сорбционным методом; предварительного обогащения проб биоматериала путем культивирования в анаэробных условиях в пробирках с бульоном Шедлера. В последующем проводили выделение геномной ДНК силико-сорбционным методом и методом с FAST. Для гистологических исследований материал фиксировали 10%-м раствором забуференного формалина, кусочки тканей уплотняли парафином, после предварительного обезвоживания в возрастающих концентрациях спиртов (50, 70, 80, 96 %) три смены ксилола. Срезы окрашивали метиленовым синим по Леффлеру и гематоксилин-эозином по Вейгерту. ПЦР в режиме реального времени с Taqman зондом проводили на реалтайм-амплификаторе «MiniOpticon» (BioRad) и LightCycler (Roche). Праймеры для детектирования *C. perfringens* имели следующую структуру: CPF1 acatgttcagctgaccgatact (Tm=61.33), CPF2 cacgtgctctaccgactga (Tm=61.49), Taqman зонд имел структуру Fam-catcggcttctaaggcttaaccgtc –BHQ. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис.-HCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,5 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров, Taq-ДНК полимеразы 1–2 ед.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При патологоанатомических исследованиях обращали внимание на наличие некротических изменений в слизистой желудочно-кишечного тракта толстого и тонкого отдела кишечника, некроза печени. В ряде случаев при гистологическом исследовании в очагах некротических поражений кишечника встречались клостридии, которые обычно ассоциировались с некрозами в печени (см. рисунок). Результаты патологоанатомических и гистологических исследований верифицировали ПЦР, что давало основание ставить диагноз – клостридиоз.

В 2014 г. на птицефабрике бройлерного направления мы отмечали рост смертности цыплят-бройлеров, нарастающей к убою, начиная с 30-дневного возраста. За 2 мес сохранность в среднем снизилась от 96 до 93 %. Более значительный ущерб понесло родительское стадо, где на один птичник с 20-тысячным поголовьем в среднем смертность достигала 20–25 гол. в день, что превышало нормативы в 4–5 раз. При вскрытии отмечали некротические поражения в печени. По данным ПЦР, лишь одна проба из восьми содержала ДНК *C. perfringens*. Данный факт косвенно указывал на отсутствие значимой роли *C. perfringens* в возникновении некротических поражений печени. Комплекс патологоанатомических, эпизоотологических и гистологических исследований показал отсутствие ассоциации клостридий с поражениями печени и позволил установить наличие гепатоспленомегалии.

Обращаемость ветеринарных специалистов по поводу клостридиозов носила преимущественно сезонный характер и затрагивала осенний и весенний периоды как 2014 г., так и 2010–2013 гг. Следует отметить,



Наличие клостридий в очагах поражения слизистой кишечника ($\times 1000$, окраска по Леффлеру)

что в эти же периоды на неблагополучных птицефабриках отмечен синдром массовых коагулопатий, ассоциированных с «белой стенкой кишечника» [14]. Можно предположить, что факторы, предрасполагающие к возникновению синдрома коагулопатии («белой стенки кишечника») и росту встречаемости некротических энтеритов-гепатитов, являются общими.

Для изучения уровня инфицированности кур *C. perfringens* исследовали 1052 пробы клоакальных смывов. Протокол исследований был следующий:

1. Тампоны стерильными ножницами отрезали и помещали в пробирку эппендорфа с 800 мкл бульона Шедлера под вазелиновым маслом.
2. Пробы инкубировали при 37 °С в течение суток.
3. Удаляли питательную среду, тампон и минеральное масло и к осадку бактерий добавляли 300 мкл FAST.
4. Пробы прогревали при 95 °С 10 мин.
5. Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР.

Первые положительные пробы появлялись у цыплят начиная с возраста 19–20 сут, что можно объяснить появлением протяженных анаэробных зон желудочно-кишечного тракта и повышением вероятности заражения клостридиями с увеличением возраста.

Как следует из таблицы, на основании анализа клоакальных смывов методом ПЦР с предварительным подращиванием образцов инфицированность *C. perfringens* цыплят-бройлеров распределяется неравномерно.

Неравномерное распределение количества инфицированных цыплят свидетельствует или о наличии неучтенных факторов, влияющих на восприимчивость к заражению (например, структура микробиоценоза кишечника), или о том, что эффективность санитарных мероприятий достаточна для предотвращения заноса *C. perfringens* в отдельные птичники. Неравномерность благополучия разных птичников в отношении *C. perfringens* позволяет считать метод оценки инфицированности цып-

Инфицированность *C. perfringens* клоакальных смывов цыплят-бройлеров и птицы родительского стада клоакальных смывов в августе 2014 г.

Возраст цыплят, мес	Положительные пробы		n	Число птичников	Число птичников, не имеющих зараженной птицы
	в неблагополучных птичниках, %	в неблагополучных птичниках (в среднем), %			
5–8	0	0	80	4	4
10–12	0	0	80	4	4
19–21	8,3–25	13,04	112	5	2
30	80–45	62,5	120	6	4
35–36	15–35	23,3	120	6	0
39–40	35–45	39,16	120	6	0
Взрослые (родительское стадо)	0	0	100	5	5

лят данным инфекционным агентом, достаточно информативным в качестве оценки рисков возникновения клостридиозов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В структуре дифференциальной диагностики некротических энтероколитов – гепатитов, вызванных токсикоинфекцией *C. perfringens*, ПЦР-диагностика позволяет верифицировать результаты гистологических и патологоанатомических исследований. По данным анализа клоакальных смывов, инфицированность цыплят-бройлеров в возрасте 19–35 дней (в неблагополучных по наличию клостридий птичниках) варьирует от 8,3 до 80 %.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Canard B., Saint-Joanis B., Cole S.T. Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens* // Mol Microbiol. – 1992. – Vol. 6. – P. 1421–1429.
2. Granum P.E., Stewart G. Molecular biology of *Clostridium perfringens* enterotoxin // Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria. – New York: Springer, 1993. – P. 235–247.
3. Fimlaid K.A., Bond J.P., Schutz K.C., Putnam E.E., Leung J.M., Lawley T.D., Shen A. Global Analysis of the Sporulation Pathway of *Clostridium difficile* // PLoS Genetics. – 2013. – Vol. 9 (8).
4. Nowell V.J., Kropinski A.M., Songer J.G., MacInnes J.I., Parreira V.R., Prescott J.F. Genome sequencing and analysis of a type A *Clostridium perfringens* isolate from a case of bovine clostridial abomasitis // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 (3).
5. Parreira V.R., Costa M., Eikmeyer F., Blom J., Prescott J.F. Sequence of two plasmids from *Clostridium perfringens* chicken necrotic enteritis isolates and comparison with *C. perfringens* conjugative plasmids // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 (11).
6. Miyamoto K., Yumine N., Mimura K., Nagahama M., Li J., McClane B.A., Akimoto S. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene // PLoS One. – 2011. – Vol. 6 (5).
7. Rood, Cole T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens* // Microbiol Rev. – 1991. – Vol. 55. – P. 621–648.
8. Hauschild A.H.W. Criteria and procedures for implicating *Clostridium perfringens* in foodborne outbreaks // Can. J. Public Health. – 1975. – Vol. 66. – P. 388–392.
9. Hatheway C.L., Whaley D.N., Dowell Jr. V.R. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness // Food Technol. – 1980. – Vol. 34. – P. 77–79.
10. Harmon S.M., Kautter D.A. Evaluation of a reversed passive latex agglutination test kit for *Clostridium perfringens* enterotoxin // J. Food Prot. – 1986. – Vol. 49. – P. 523–525.
11. Berry P.R., Rodhouse J.C., Hughes S., Bartholomew B.A., Gilbert R.J. Evaluation of ELISA, RPLA, and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens // J. Clin. Pathol. – 1988. – Vol. 41. – P. 458–461.
12. Berry P.R., Wieneke A.A., Rodhouse J.C., Gilbert R.J. Immunological techniques in microbiology // Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. – 1987. – Vol. 24. – P. 245–254.
13. Stringer M.F. *Clostridium perfringens* type A food poisoning, // *Clostridia* in gastrointestinal disease / S.P. Borriello (ed.). – Boca Raton Fla.: CRC Press, 1985. – P. 117–143.
14. Афоношкин В.Н., Леонов С.В., Сулимова Л.И., Сигарева Н.А. Изучение массовой коагулопатии и сопутствующие патологии сельскохозяйственной птицы в Сибирском регионе в 2007–2008 гг. // БИО. – 2009. – № 8 (107). – С. 4–6.

Поступила в редакцию 15.06.2015

**V.N. AFONYUSHKIN, Candidate of Science in Biology, Sector Head,
V.S. CHEREPUSHKINA, Laboratory Researcher,
A.S. KIREVICHEVA, Laboratory Assistant,
E.V. DUDAREVA, Researcher**

Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East
Krasnoobsk, Novosibirsk District, Novosibirsk Region, 630501
e-mail: referent@ievsidv.ru

M.L. FILIPENKO, Candidate of Science in Biology, Laboratory Head

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS
8, Lavrentyeva St, Novosibirsk, 630090
e-mail: lisocim@mail.ru

STUDYING THE INCIDENCE RATE FOR INFECTING THE LIVER AND INTESTINE OF CHICKENS WITH *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Necrotic enteritis and the subclinical form of *C. perfringens* infection in poultry caused by *C. perfringens* cause significant economic damage, and may be the cause of infecting and poisoning people consuming poultry products from poultry plants having a clostridiosis problem. Investigations were carried out at the poultry molecular biology sector of the Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East (Krasnoobsk, Novosibirsk Region), and at the pharmacogenomics laboratory of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine (Novosibirsk). By using the PCR analysis, histological and microbiological methods has been evaluated the infection of the intestine of chickens and broiler chickens of different ages, and the value of polymerase chain reaction in the complex diagnosis of clostridiosis has been examined. In some cases, at carrying out histological studies, the cells of *Clostridium* were found in the necrotic foci in the liver and the intestine. The results of pathological and histological studies were verified by PCR that provided a basis for diagnosing clostridiosis. To study the incidence rate for infecting chickens with *C. perfringens*, 1052 cloacal swab samples, and 50 samples of pathological material taken at 7 poultry plants of Russia were examined. There was discovered an uneven distribution in chickens infected with *C. perfringens* (0–80%) that has indicated the presence of unaccounted factors influencing the susceptibility to infection (e.g. structure of the intestine microbiocenosis), or the fact that the effectiveness of preventive measures is sufficient to prevent the contamination of poultry houses with *C. perfringens*.

Keywords: *Clostridium perfringens*, clostridiosis, polymerase chain reaction, broiler chickens.