

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

А.Т. Толеухан *, Ж.С. Киркимбаева , А.Ж. Жылкайдар 

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Казахстан
amanzoltoleuhan@gmail.com

Аннотация: были изучены биологические свойства выделенных клостридий, идентифицированы изоляты клостридий по культуральным морфологическим свойствам.

Ключевые слова: клостридиоз; Китт-тароцци; *Cl. perfringens*; токсин.

Введение

Животноводство в республике Казахстан несет существенный урон от дизентерии ягнят, бродзота и энтеротоксемии, а также эмфизематозного карбункула поражающего крупный рогатый скот. Не обходит стороной животных всех видов заболевания злокачественный отек, некробациллез, столбняк, ботулизм [1].

Род *Clostridium* включает более 100 видов. В этот род объединены патогенные и сапрофитные анаэробные спорообразующие палочковидные микроорганизмы, за исключением нескольких сульфатредуцирующих пигментообразующих видов [2].

Родовое название дано на основании сходства этих микроорганизмов с веретеном (closter – лат., маленькое веретено), которое они приобретают в результате раздувания бактериальных клеток крупными спорами, располагающимися в центре или ближе к одному концу [3].

Факторами патогенности клостридии являются инвазивность и токсигенность. Инвазивность лидирует в локальных поражениях тканей и обусловлена действием ферментов. Экзотоксины вызывают более широкие системные поражения организма и служат основными факторами патогенности клостридии [4].

У некоторых клостридии, токсигенность которых невысока (*Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*), факторами патогенности, очевидно, являются жгутики, обеспечивающие подвижность, адгезию и гемагглютинацию. У клостридии в целом не обнаружены факторы, вызывающие привыкание к антибактериальным препаратам, о чем говорит опыт многолетнего использования антибиотиков в терапии вызываемых ими болезней [5].

Все болезни клостридиальной этиологии на основе механизма передачи возбудителей и путей заражения макроорганизма делят на две группы: энтеральные (кормовые) и травматические. ЭМКАР условно можно отнести к обеим группам [6].

В инфекционной патологии животных энтеральные клостридиозы имеют более широкое распространение и наносят значительный экономический ущерб хозяйствам, тогда как травматические клостридиозы регистрируют значительно реже и преимущественно в виде спорадических случаев [7].

В целом из клостридиозов наибольшее значение имеют болезни, вызываемые микроорганизмом *Cl. perfringens*. Разные типы этого микроорганизма являются возбудителями различных болезней животных и человека. В 60-80 % случаев при злокачественном отеке у животных и газовой гангрене у человека выделяют *Cl. perfringens* типа А в чистом виде или в ассоциации с другими микроорганизмами [8].

Материалы и методы

Для определения видового состава и типов бактерий, в частности *Cl. perfringens*, циркулирующих среди телят, ягнят, были исследованы пробы материалов, полученные от трупов павших животных. Из них изолировали 19 культур клостридий. культуральные, тинкториальные, морфологические и биохимические свойства культур *Cl. perfringens* принципиально не отличались от описанных ранее в литературе.

Результаты

Однако, в ходе определения основного токсина клостридий выявлено преобладание *Cl. perfringens* типа А – 12 культур, две – к *Cl. perfringens* типу С и одна – к *Cl. perfringens* типу Д. Четыре культуры *Cl. perfringens* не удалось типировать. В 7% случаев удалось выделить монокультуру *Cl. perfringens*, а в 93% – ассоциации с другими микроорганизмами. В них доминировали: *Salmonella abortus ovis* – 37%, *Escherichia coli* – 20%. Оставшийся процент приходился на *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*.

Таблица 1 – Определение токсинов клостридий

Токсины выделенных культур <i>Cl. perfringens</i>	Количество выделенных культур
<i>Cl. perfringens</i> типа А	12
<i>Cl. perfringens</i> типа С	2
<i>Cl. perfringens</i> типа Д	1

Морфология может варьировать, например, на углеводных средах могут образовывать форму коккобактерии, а на белковых средах – нити с заостренными концами длиной до 145 мкм., образуют капсулы (единственный капсулообразующий вид среди патогенных клостридий). В течение некоторого времени капсулы сохраняются и при культивировании на средах, содержащих нативный белок, наиболее выражены у вирулентных штаммов, резистентных к фагоцитарным реакциям. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, в старых культурах могут быть грамтрицательными. *Cl. perfringens* – крупные, строго грамположительные, жгутиков не имеют, неподвижны (один из немногих неподвижных видов). Классические формы представлены короткими палочками с обрубленными под прямым углом концами (0,6-1,0).

Споры у *Cl. perfringens* крупные, овальные, расположены центрально (у *Cl. perfringens* типа А – также субтерминально). Термоустойчивость спор серотипов В и D относительно невысока (погибают при кипячении в течение 15-30 минут), споры типов А и С более устойчивы и выживают при кипячении и даже автоклавировании в течение 1-6 ч. Спорообразование обычно имеет место в почве и кишечнике, споры можно получить на щелочных средах, богатых белком и не содержащих углеводов (например, на свернувшейся лошадиной сыворотке). Спорообразование стимулирует прогревание при 75°C в течение 10-15 минут.

Cl. perfringens – факультативный анаэроб (в сравнении с другими клостридиями) и хорошо переносит кратковременные кислородные воздействия, хотя имеются чувствительные штаммы, погибающие при воздействии кислорода на культуру в течение 3 минут. Способен расти в высоких столбиках сред без герметизации вазелином.

Хорошо растет на питательных средах для анаэробов – Китт-Тароцци, глюкозо-кровоном агаре Цейсслера, желточном агаре.

Cl. perfringens в организме животных и при культивировании на питательных средах с кровяной сывороткой образует капсулу, во внешней среде и на богатых белком средах – споры.

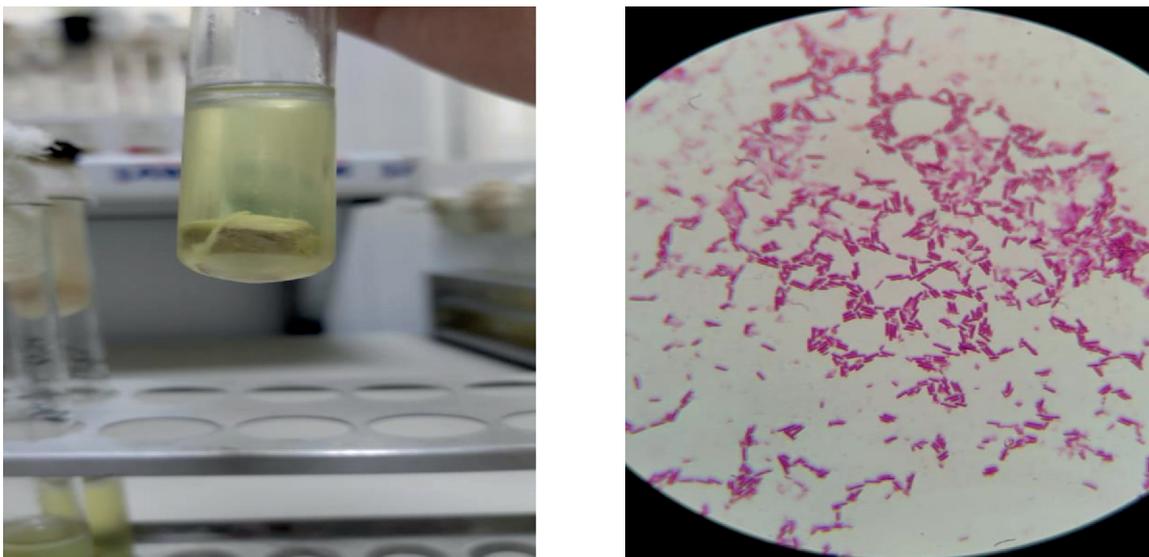


Рисунок 2 – Культивирование *Cl. perfringens* на среде Китта-Тароцци

Рост на жидких и полужидких средах, особенно содержащих глюкозу, происходит очень бурно с образованием H_2 и CO_2 , и обычно заканчивается через 8-12 ч; при стоянии среда постепенно светлеет и образуется обильный осадок, культуры *Cl. perfringens* типа А имеют характерный запах масляной кислоты. Оптимум рН 7,2-7,4, но могут расти в интервале 5,0-8,5. Первые признаки роста на среде Китта-Тароцци могут проявляться уже через 1-2 ч (особенно при 43°C); последние проявляются появлением пузырьков газа из-под кусочков печени при встряхивании. Помутнение среды и активное газообразование можно наблюдать через 4-8 ч культивирования.

Через 2-3 дня размножение прекращается, *Cl. perfringens* постепенно оседают на дно, образуя обильный осадок; среда становится прозрачной. Кусочки ткани печени остаются без изменений даже при длительном хранении культуры.

На плотных питательных средах обычно образуются S- и R-колонии. S-колонии круглые, сочные, куполообразные, с гладкими ровными краями, в начале роста прозрачные, напоминающие капли росы, позднее становятся мутными, серовато-белыми. R-колонии неправильной формы, бугристые, с неровными шероховатыми краями, в глубине агара напоминают комочки ваты. У некоторых штаммов отмечают слизистые M-колонии, особенно у слизистых вариантов *Cl. perfringens*, образующих густую слизь на жидких средах, они напоминают S-колонии с более высоким куполом и слизистой консистенцией; представлены капсулированными клетками. Иногда можно наблюдать смешанные O- колонии.

На агаре Цейсслера через 12-18 ч образует гладкие сероватые колонии с ровными краями и плотным возвышением в центре. Колонии окружены зоной гемолиза, он может быть полным либо частичным. Зона гемолиза может быть двойной: вокруг колоний полный гемолиз (за счет действия гемолизина), на отдалении – неполный (за счет действия лецитиназы). При контакте с кислородом колонии могут приобретать зеленоватую окраску.

На желточном агаре образует колонии, окруженные зоной перламутрового преципитата (фосфорилхолин), образующегося из лецитина куриного желтка под действием лецитиназы.

Характерный признак колоний *Cl. perfringens* – способность менять серовато-белый цвет на зеленовато-оливковый после кратковременного пребывания в аэробных условиях (может служить дифференциально диагностическим признаком). Колонии в толще питательной среды имеют вид чечевичных зерен, дисков или комочков ваты.

Клостридии обладают резко выраженными сахаролитическими свойствами, *Cl. perfringens* расщепляет с образованием кислоты и газа глюкозу, ксилозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, маннозу, не сбраживает маннит, дульцит. От прочих клостридий *Cl. perfringens* отличает способность восстанавливать нитраты, расщеплять лактозу, образовывать лецитиназу. Протеолитическая активность слабая; разжижает желатин, не разлагает казеин; только некоторые штаммы медленно разжижают свернувшуюся сыворотку. Интенсивно створаживают молоко с образованием крупноячеистого губчатого сгустка уже через 3 ч (феномен известен как «штормовая реакция»). В организме и на питательных средах образуют сильные токсины.

Таблица 2 – Биохимические свойства культур *Cl. perfringens*

<i>C. perfringens</i> биохимические свойства	
Глюкоза	+
Ксилозу	+
Галактозу	+
Мальтозу	+
Лактоза	+
Сахароза	+
Маннозу	+
Раффиноза	+
Маннит	-
Дульцит	-
Арабиноза	-
Рамноза	-
Индол	-
Молоко	+
Желатин	+
Казеин	-

Как видно из таблицы 2, все изучаемые культуры *Cl. perfringens*, обладали выраженными сахаролитическими свойствами и сбраживали с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, раффинозу, не ферментировали маннит, арабинозу, рамнозу и дульцит, а также свертывали и пептонизировали молоко, расплавляли желатину и не образовывали индол.

Обсуждение

Учитывая, что возбудителями клостридиозов телят и ягнят являются *Cl. perfringens*, нами были отобраны 12 штаммов *Cl. perfringens* типа А, 2 штамма *Cl. perfringens* типа Д, 2 штамма *Cl. perfringens* типа С. Все культуры были выделены от павших телят и ягнят из хозяйств Алматинской и Кызылординской области.

Для определения видового состава и типов бактерий, в частности *Cl. perfringens*, циркулирующих среди телят и ягнят были исследованы пробы материалов, полученные от трупов павших животных. Из них изолировали 19 культур клостридий. Культуральные, тинкториальные, морфологические и биохимические свойства культур *Cl. perfringens* принципиально не отличались от описанных ранее в литературе. Однако, в ходе определения основного токсина клостридий выявлено преобладание *Cl. perfringens* типа А – 12

культур, две – к *Cl. perfringens* типу С и одна – к *Cl. perfringens* типу Д. Четыре культуры *Cl. perfringens* не удалось типировать. В 7% случаев удалось выделить монокультуру *Cl. perfringens*, а в 93% – ассоциации с другими микроорганизмами. В них доминировали: *Salmonella abortus ovis* – 37%, *Escherichia coli* – 20%. Оставшийся процент приходился на *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*.

Базируясь на полученных результатах исследований, можно заключить, что основным возбудителем анаэробной энтеротоксемии ягнят, телят и поросят, диагностируемой в хозяйствах Алматинской и Кызылординской области, является *Cl. perfringens* типа С, А и Д, которые способствуют в возникновении этой болезни. Кроме того, заболевание новорожденных ягнят и телят с поражением желудочно-кишечного тракта может вызывать ассоциация микроорганизмов, включающая энтеропатогенные штаммы *E. coli* и токсигенные культуры *Cl. perfringens*. Наиболее чувствительны к токсинам *Cl. perfringens* ягнята, телята и поросята первых дней жизни. У 2-3 дневных ягнят, телят и поросят заболеваемость составила 28,3-37,1%. В некоторых хозяйствах анаэробная энтеротоксемия имеет стационарный характер и проявляется в виде не продолжительных эпизоотии. В период ее развития заболеваемость достигает до 40%, с летальностью – 80-100%.

Заключение

Вовремя исследовательских работ, все культуры были выделены от павших телят из хозяйств Алматинской и Кызылординской области. В ходе определения основного токсина клостридий выявлено преобладание *Cl. perfringens* типа А – 12 культур, две – к *Cl. perfringens* типу С и одна – к *Cl. perfringens* типу Д. Четыре культуры *Cl. perfringens* не удалось типировать. В 7% случаев удалось выделить монокультуру *Cl. perfringens*, а в 93% – ассоциации с другими микроорганизмами. В них доминировали: *Salmonella abortus ovis* – 37%, *Escherichia coli* – 20%. Оставшийся процент приходился на *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*.

Финансирование. Работа выполнена собственного бюджета

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАИУ и Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии за оказанную помощь в проведении данных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 Девришов Д.А. Технологические и иммунологические аспекты производства вакцины против эмфизематозного карбункула / Д.А. Девришов, Ф.Х. Пулотов// Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2019. – №1. – С. 60-65.
- 2 Пулотов Ф.Х. Клостридиозы овец и их контроль / Пулотов Ф.Х., Девришов Д.А// Ветеринария. – 2019. – №5. – С. 27-30.
- 3 Капустин А.В. Результаты клинических исследований безопасности, антигенной активности и эффективности применения инактивированной вакцины против эшерихиоза и клостридозов свиней // Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Алипер Т.И., Верховский О.А., Кунаков К.Ю., Котельников А.П., Мишин А.М., Шемельков Е.В.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – С. 352-248.
- 4 Сляров О.Д. Изучение безопасности применения ассоциированной вакцины против клостридозов КРС для животных различных возрастных и физиологических групп. / Сляров, О.Д. Капустин А.В., Лаишевцев А.И. // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – №65. – С. 124-130.

- 5 Михеев В.Е. Оценка напряженности поствакцинального иммунитета к эpsilon токсину *Clostridium perfringens* // Ветеринария и кормление. – 2017. – №4. – С. 38-40.
- 6 Михеев В.Е. Оценка содержания специфического иммуноглобулина к эpsilon-токсину клостридий методом иммуноферментного анализа / Михеев В.Е. // I11 Всероссийская научная конференция молодых ученых с международным участием «Современное состояние, проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса». – Симферополь, Россия. – 2017. – 20 с.
- 7 Новикова О.Б. *Clostridium perfringens* – эпидемиологически опасный микроорганизм, выделяемый от птиц / О.Б. Новикова // Птица и птицепродукты. – 2015. – №6. – С. 37-38.
- 8 Терлецкий В.П. Генотипирование микроорганизмов – инструмент контроля эпизоотической ситуации, путей распространения и источников возбудителя инфекции / В.П. Терлецкий, С.В. Щепеткина, В.И. Тыщенко, О.Б. Новикова [и др.] // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2017. – №4 (16). – С. 184-192.

References

- 1 Devrishov D.A. Technological and immunobiological aspects of vaccine production against emphysematous carbuncle / D.A. Devrishov, F.H. Pulotov // Veterinary medicine, animal science and biotechnology. – 2019. – №1. – P. 60-65.
- 2 Pulotov F.H. Sheep clostridiosis and their control / Pulotov F.H., Devrishov D.A. // Veterinary Medicine. – 2019. – №5. – P. 27-30.
- 3 Kapustin A.V. Results of clinical studies of safety, antigenic activity and efficacy of inactivated vaccine against escherichiosis and clostridiosis of pigs. // Kapustin A.V., Laishevtsev A.I., Aliper T.I., Verkhovsky O.A., Kunakov K.Yu., Kotelnikov A.P. Mishin A.M., Shemelkov E.V. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – P. 352-248.
- 4 Sklyarov O.D. The study of the safety of the associated vaccine against cattle clostridiosis for animals of various age and physiological groups. / Sklyarov, O.D. Kapustin A.V., Laishevtsev A.I. // Proceedings of the Kuban State Agrarian University. – 2017. – №65. – P. 124-130.
- 5 Mikheev V.E. Assessment of the intensity of post-vaccination immunity to epsilon toxin *Clostridium perfringens* // Veterinary medicine and feeding. – 2017. – №4. – P. 38-40.
- 6 Mikheev V.E. Assessment of the content of specific immunoglobulin kepsilon-toxin clostridium by enzyme immunoassay // I11 All-Russian scientific conference of young scientists with international participation «Current state, problems and prospects of development of the agroindustrial complex». – Simferopol, Russia. – 2017. – 20 p.
- 7 Novikova O.B. *Clostridium perfringens* – epidemiologically dangerous microorganism isolated from birds / O.B. Novikova // Poultry and poultry products. – 2015. – №6. – P. 37-38.
- 8 Terletsy, V.P. Genotyping of microorganisms – a tool for controlling the epizootic situation, ways of spreading and sources of the causative agent of infection / V.P. Terletsy, S.V. Shchepetkina, V.I. Tyshchenko, O.B. Novikova [et al.] // Innovations in agriculture: problems and prospects. – 2017. – №4 (16). – P. 184-192.

CL. PERFRINGENS ШТАМДАРЫНЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІ

А.Т. Төлеухан *, Ж.С. Киркимбаева , А.Ж. Жылқайдар 

«Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Қазақстан
 amanzoltoleuhan@gmail.com

Аннотация: оқшауланған клостридиялардың биологиялық қасиеттері зерттелді, мәдени морфологиялық қасиеттері бойынша клостридия изоляттары анықталды.

Түйін сөздер: клостридий; Китт-тароцци; *Cl. perfringens*; токсин.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF *CL. PERFRINGENS* STRAINS

T.A. Toleukhan *, Zh.S. Kirkimbayeva , A.Zh. Zhylkaidar 

NAO «Kazakh National Agrarian Research University», Kazakhstan,
amanzoltoleuhan@gmail.com

Abstract: the biological properties of isolated clostridium were studied, clostridium isolates were identified by cultural morphological properties.

Key words: clostridium, Kitt-tarozzi, *Cl. perfringens*, toxin.