

УДК 619:616.9:636.2

ДИАГНОСТИКА И МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУРЫ *C. PARVUM*

Васильева В.А., Кулясов П.А., Курочкина Ю.Е.

*ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»,
Саранск, e-mail: agro-inst @adm. mrsu. ru*

Показаны методы диагностики (прямой микроскопии фекалий больных животных, окраска ооцист криптоспоридий в мазках фекалий или содержимого кишечника по Цилю – Нильсену, Романовскому – Гимзе, по Граму и полимеразной цепной реакции – ПЦР), а также дифференциальной диагностики от других инвазий, часто встречающихся у животных, и методы выделения культуры ооцист *C. parvum* с использованием различных методов обогащения, хорошо известных в гельминтологии. Флотационными жидкостями являются насыщенные растворы разных веществ. В качестве вспомогательного средства применяют флотацию без центрифугирования, флотацию с центрифугированием и метод седиментации. Для длительного сохранения ооцист используется 2,5% раствор бихромата калия. Хранить их можно при комнатной температуре и в холодильнике. Предпочтительнее перед заражением экспериментальных животных проводить биопробу на мышах. Количество ооцист подсчитывают с помощью камеры Горяева, используемой в гематологической практике. Для количественных определений общего количества ооцист используется окрашенный мазок, приготовленный из определенного количества фекалий (например, из 0,2).

Ключевые слова: криптоспоридии, диагностика, методы, концентрация, флотация, центрифугирование, мыши, фекалии, окраска, дифференциация

DIAGNOSIS AND METHODS OF ALLOCATION OF *C. PARVUM* CULTURE

Vasileva V.A., Kulyasov P.A., Kurochkina Y.E.

Mordovia Ogarev State University, Saransk, e-mail: agro-inst @adm. mrsu. ru

The article deals with methods of diagnosis (with direct microscopy of feces of infected animals, cryptosporidium oocysts stain in feces smears or intestinal contents by Ziehl-Nielsen, Romanovsky-Giemsa, and Gram and by polymerase chain reaction (PCR) as well as the differential diagnosis of other infestations often occurring in animals and methods for *C. parvum* oocysts culture isolation using different methods of enrichment, which are well known in Helminthology. As an aid flotation without and with centrifugation and sedimentation method are used. For long-term preservation of oocysts one should use 2,5% solution of potassium dichromate. Can be stored at room temperature as well as in refrigerator. It is recommended to carry out mice bioassay before experimental animals infecting. Number of oocysts are counted with Goryaev camera using in hematology practice. For quantitative determination of the total number of oocysts it can be done in stained smear prepared from certain amounts of the faeces (e.g., 0,2)

Keywords: Cryptosporidium, diagnosis, methods, concentration, flotation, centrifugation, mice, feces, stain, differentiation

Анализ многочисленных литературных источников [1; 2; 4; 8] свидетельствуют о высоком интересе к проблеме криптоспоридиоза. Криптоспоридиоз – протозойная инвазия человека и животных, особенно опасная для молодняка сельскохозяйственных животных с иммунодефицитом. Инфекции желудочно-кишечного тракта, вызванные криптоспоридиями, зарегистрированы во всех регионах РФ и странах СНГ, а также на всех континентах, за исключением Антарктиды. Такое широкое распространение инвазии связано с большим количеством ее природных и синантропных резервуаров, низкой инфицирующей дозой и высокой резистентностью возбудителя к дезинфектантам и противопаразитарным препаратам. Криптоспоридии паразитируют преимущественно в кишечном тракте, но были обнаружены также в других органах, тканях и жидкостях (рвотные массы, мокрота, бронхиальная слизь).

Роль криптоспоридий в этиологии заболеваний животных в настоящее время установлена, но мало изучена [3]. Основные гистологические изменения наблюдаются в кишечнике больных животных. На слизистой оболочке отмечаются деформация ворсинок, единичные клетки слущенного эпителия, лимфоциты, гистиоциты и плазматические клетки. Криптоспоридии локализуются в просвете ворсинок, на их верхушках и боковых поверхностях, в микроворсинках эпителиального слоя тощей, подвздошной и в криптах слепой кишки [5; 6; 7]. В результате поражения микроворсинок нарушается всасывание питательных веществ, воды и электролитов, существенно страдает ферментативная деятельность кишечника.

Однако до сих пор криптоспоридиоз в ветеринарной практике почти не диагностируется и не указывается в ветеринарных отчетах. Причиной этого является непод-

готовленность ветеринарных специалистов и трудность диагностики ввиду микроскопического размера паразитов и частого участия в этиологии болезни наряду с другими патогенами.

Для диагностики криптоспориоза в настоящее время используются следующие методы: метод прямой микроскопии фекалий больных животных, окраска ооцист криптоспоридий в мазках фекалий или содержимого кишечника методом Циля – Нильсена, Романовского – Гимзы и по Граму, а также метод полимеразной цепной реакции – ПЦР. Основным методом, применяемым на практике, является паразитологический, заключающийся в обнаружении возбудителя при микроскопии материала. Как правило, криптоспоридии ищут в свежих фекалиях, из которых готовят тонкие мазки на предметных стеклах в 1–2 каплях изотонического раствора NaCl. Мазки сушат на воздухе не менее 30 мин, фиксируют смесью Никифорова 10–15 мин и снова сушат на воздухе. В дальнейшем их окрашивают различными красителями. Чаще применяют окрашивание карбол-фуксином по Цилю – Нильсену с последующим докрасиванием препаратов малахитовым зеленым. При этом ооцисты криптоспоридий приобретают ярко-красный цвет. Они имеют вид округлых образований диаметром до 5 мкм, внутри некоторых из них видны удлинённые спорозиты. Сопутствующая микрофлора окрашивается в зелёный цвет. Капли жироподобных веществ и глыбки дextrита также окрашиваются в ярко-красный цвет, но они не имеют четких контуров и какой-либо внутренней структуры.

Необходимо провести дифференциальную диагностику. Оценка делается по показателям, предложенным М. Vulgin (1983), после окраски по Граму.

1. В поле зрения микроскопа почти чистая культура грамотрицательных мелких, толстых, с закругленными концами палочек, расположенных кучками. Ориентировочный диагноз – кишечная колиинфекция.

2. В мазках-отпечатках преобладают грамположительные толстые, с прямоугольными концами бациллы, расположенные одиночно, парами или короткими цепочками. Ориентировочный диагноз – энтеротоксемия.

3. При микроскопии мазков в поле зрения преобладают нейтрофильные клетки с микробами. Ориентировочный диагноз – сальмонеллез.

4. В мазках имеются не окрашенные по Граму образования, по величине и форме напоминающие эритроциты, часть их имеет светлый ободок. Ориентировочный диагноз – криптоспориоз.

5. В мазках-отпечатках содержится разнообразная микрофлора, среди которой трудно определить преобладающую. Такая картина характерна для инфекций, вызванных вирусами. Окончательно наличие эшерихиозных возбудителей определяется исследованиями патологического материала, предусмотренными методическими указаниями по бактериологической диагностике колибактериоза животных.

Для увеличения концентрации ооцист в исследуемом материале используют различные методы обогащения, чаще всего флотацию и седиментацию, так как нередко количество ооцист в фекалиях больных животных может быть настолько незначительным, что их выявление с помощью микроскопии окрашенных мазков представляет трудную задачу. В связи с этим используют методы обогащения, хорошо известные в гельминтологии. Флотационными жидкостями являются насыщенные растворы разных веществ. В качестве вспомогательного средства применяют флотацию без центрифугирования, флотацию с центрифугированием, методом седиментации.

В качестве флотационных жидкостей используют насыщенные растворы хлорида натрия (плотность раствора составляет 1,20 мг/см³), нитрата аммония (1,31 мг/см³), сахарозы (1,25 мг/см³), сульфата цинка (1,39 мг/см³), жидкость Дарлинга (1,20 мг/см³), среду Бреза (смесь насыщенных растворов сульфата магния, тиосульфата натрия и водопроводной воды в соотношении 3:3:1), смесь Павласека (хлорид цинка – 220 г, хлорид натрия – 210 г, водопроводная вода – 800 мл) и некоторые другие солевые растворы.

В последующем во избежание потерь собранных ооцист в процессе высушивания мазка и последующей его обработки рекомендуется предварительно нанести на покровное стекло небольшое количество плазмы или альбумина и высушить при комнатной температуре или в термостате при 37°C.

Для длительного сохранения ооцист используют 2,5% раствор бихромата калия. Через несколько дней вследствие исчезновения остаточного тела спорозиты внутри ооцист видны более отчетливо. Материал можно хранить как при комнатной температуре, так и в холодильнике, но последнее предпочтительнее.

Перед заражением экспериментальных животных обязательно нужно проводить биопробу на мышах. Для постановки биопроб необходимо скормить небольшие порции фекалий новорожденным или 2–5-дневным белым мышам. При наличии в пробах

ооцист криптоспоридий в фекалиях мышей через 5–8 дней будут обнаруживаться ооцисты. При вскрытии мышей в более ранний период (на 3–7-й день) в гистологических препаратах кишечника (предпочтительно использовать препараты подвздошной кишки) будут выявляться эндогенные стадии развития криптоспоридий, локализующихся в зоне щеточной каемки.

При постановке биопроб на животных можно к гомогенату фекалий добавлять антибиотики (пенициллин, стрептомицин, гентамицин), которые подавляют сопутствующую микрофлору, но не влияют на инвазивность ооцист криптоспоридий.

Количество ооцист криптоспоридий подсчитывают с помощью камеры Горяева, используемой в гематологической практике. После инкубации, стимулирующей эксцистирование ооцист, можно таким же способом подсчитывать и количество паразитов. Для количественной оценки можно также подсчитывать общее количество ооцист в окрашенном мазке, приготовленном из определенного количества фекалий (например, из 0,2 г).

Выводы

Согласно литературным данным и результатам собственных исследований, для выявления ооцист криптоспоридий наиболее приемлемым, особенно в условиях производства, является окраска мазков методом Циля – Нильсена. Для получения большой массы ооцист криптоспоридий следует использовать метод флотации с насыщенным раствором сахарозы. Культуру в последующем можно использовать при проведении экспериментальных исследований, а также для постановки биопроб на животных.

Список литературы

1. Бейер Т.В. Новое в изучении возбудителя криптоспориоза (*Cryptosporidium*, *Sporozoa*, *Apicomplexa*) // Вестн. ветеринарии. – 1998. – № 1. – С. 48–52.
2. Бочкарев И.И. Криптоспориоз: эпизоотология, симптомокомплекс болезни, ультраструктура *C. parvum*. Особенности развития хозяин – паразит – клетка эмбрион, принципы лечения и профилактика: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 1996. – 39 с.
3. Васильева В.А. Этиология криптоспориоза у поросят / В. А. Васильева // Фундаментальные исследования. – М., 2009. – № 3. – С. 110–111.
4. Васильева В.А. Криптоспориоз и эзофагостомоз свиней при моноинвазиях и паразитоценозе: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – М., 1998. – 42 с.

5. Мусаткина Т.Б. Биохимические показатели крови и патоморфология при криптоспориозе поросят: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Саранск, 2009. – 17 с.

6. Мусаткина Т.Б. Влияние экологических условий на распространение и сохранность возбудителя криптоспориоза свиней во внешней среде / Т.Б. Мусаткина, В.А. Васильева // Вестник Брянского государственного университета. – 2012. – № 4. – С. 139–141.

7. Решетникова Т.И. Биохимические и патоморфологические изменения при криптоспориозе поросят / Т.И. Решетникова, В.А. Васильева, Н.С. Малахов // Практик. – 2005. – № 1–2. – С. 66–67.

8. Шибалова Т.А. Поиск экспериментальной модели – как основа для изучения жизненного цикла возбудителя криптоспориозов / Т.А. Шибалова, И.Ф. Павласек, Н.В. Касаткина и др. // Тезисы докладов 81-й конференции Украинского общества паразитологов. – Киев, 1993. – С. 183.

References

1. Beyer T.V. The new in studying of causative agent of cryptosporidiosis (*Cryptosporidium*, *Sporozoa*, *Apicomplexa*) // Veterinary Bulletin. 1998. no. 1. pp. 48–52.
2. Bochkarev I.I. Cryptosporidiosis: epizootiology, disease symptom, ultrastructure *C. parvum*. Features of development of host parasite cell embryo, principles of treatment and prevention: Abstract of Doctor of Biology Science dissertation. SPb, 1996. 39 p.
3. Vasilieva V.A. Etiology of cryptosporidiosis in piglets/ V.A. Vasilieva //Fundamental researches. Moscow, 2009. no. 3. pp. 110–111.
4. Vasilieva VA Cryptosporidiosis and Oesophagostomosis of pigs under monoinvasion and parasitocenoses: Abstract of Doctor of Veterinary Science dissertation. Moscow, 1998. 42 p.
5. Musatkina T.B. Blood biochemistry and morbid anatomy under piglets cryptosporidiosis: Abstract of Candidate of Veterinary Science dissertation. Saransk, 2009. 17 p.
6. Musatkina T. B. Effect of environmental conditions on the distribution and preservation of the causative agent of cryptosporidiosis of pigs in the environment / T.B. Musatkina, V.A. Vasilieva // Bulletin of Bryansk State University. 2012. no. 4. pp. 139–141.
7. Resetnicova T.I. Biochemical and pathological changes in piglet cryptosporidiosis / T.I. Resetnicov, V.A. Vasilieva, N.S. Malakhov. Practitioner. 2005. no. 1–2. pp. 66–67.
8. Shibalova T.A. The search of experimental model as a basis for studying the life cycle of the causative agent of cryptosporidiosis / T.A. Shibalova, I.F. Pavlasek, N.V. Kasatkina [et al.] // Abstracts of the 81 th Conference of the Ukrainian Parasitologists Society. Kiev, 1993. pp. 183.

Рецензенты:

Столяров В.А., д.в.н., профессор кафедры морфологии и физиологии животных, Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск;

Ерофеев В.И., д.б.н., проректор института ФГОУ ДПОС «Мордовский институт переподготовки кадров агробизнеса», профессор кафедры научно-технического прогресса и организации производства, г. Саранск.

Работа поступила в редакцию 29.09.2014.