

УДК 619:616.993

КОПРОСКОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КРИПТОСПОРИДИОЗА

Мехова О.С.

Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Криптоспоридиоз – это протозооз, возбудителем которого является Cryptosporidium parvum, паразитирующий в кишечнике и распространяющийся с фекалиями больных животных. В настоящее время гастроэнтериты, вызванные Cryptosporidium parvum, признаны и широко распространены у молодняка. Нами проведено сравнение различных методов копроскопической диагностики с целью выявления ооцист криптоспоридий в фекалиях животных. Были использованы методы флотации, седиментации, метод окрашивания по Циллю-Нильсену и др. В результате проведенных исследований была подтверждена роль криптоспоридий в этиологии гастроэнтеритов молодняка.

Cryptosporidiosis is a diarrheal disease caused by a microscopic parasite, Cryptosporidium parvum, that can live in the intestine of animals and is passed in the faeces of an infected animal. Cryptosporidium parvum is now widely accepted as a cause of gastroenteritis. We compared different methods for the detection of Cryptosporidium in faeces. Various methods have been applied to detect oocysts in faeces, but the difficulties of discriminating between non-cryptosporidial bodies, acid fast bodies like cryptosporidia, and cryptosporidia remain. Ziehl-Neelsen staining method, flotation method, sedimentation method for confirmation are described. A modification of the formol ether method of concentration is also described. Preliminary findings show that Cryptosporidium is an important pathogenic agent gastroenteritis, confirm the increased incidence in young animals.

Введение. Одним из опасных возбудителей типичного зооноза (по данным ВОЗ), являются простейшие рода *Cryptosporidium*, вызывающие криптоспоридиоз [8]. Простейшие относятся к типу *Apicomplexa*, классу *Sporozoa*, отряду *Coccidia*, семейству *Cryptosporidiidae*, роду *Cryptosporidium*. Восприимчивыми к этому заболеванию являются животные (особенно в раннем возрасте), птицы, а также люди [3, 4]. Инвазия характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта, легких, бронхов, трахеи, органов иммунной системы, желчных протоков, нарушением процессов пищеварения и всасывания в кишечнике, приводящим к развитию диарей, бронхитов, пневмоний, иммунодефицитов и обезвоживанию организма [2, 4, 11, 13]. Широкое распространение данного заболевания связано с большим количеством природных резервуаров инфекции, низкой инфицирующей дозой и высокой

резистентностью возбудителя к дезинфектантам и противопаразитарным препаратам [7]. Практически во всех регионах Европы ооцисты *Cryptosporidium* выделяют из поверхностных, подземных, сточных и рекреационных вод [12].

Для выделения ооцист простейших из фекалий зараженных животных широко применяют копроскопические методы [6, 13, 14]. Методы специфической диагностики и изучения криптоспоридиоза по целевой установке, экономичности и сложности исполнения подразделяются на две группы: 1) методы, направленные на изучение самого паразита – его морфологии и структуры на разных стадиях развития (методы Циля-Нильсена, Романовского-Гимза); 2) диагностические, направленные на обнаружение в организме и в испражнениях животного возбудителя – ооцист и размножающегося паразита на разных эндогенных стадиях (методы флотации, седиментации) [6].

Эффективность методов диагностики зависит от выбора насыщенных растворов для флотации и составляет: для натрия хлорида – 68%, для аммиачной селитры – 77,1%, для раствора Бреза – 82,8-100%, для раствора натрия нитрата – 82,8% [6]. Якубовский М. Б. на основе анализа эффективности насыщенных растворов поваренной соли, аммиачной селитры, сахарозы, сульфата цинка, раствора Бреза, раствора Павласека пришел к выводу, что наиболее экономичным, доступным и результативным является насыщенный раствор натрия хлорида [9]. По данным Алиева А. А. применение насыщенного раствора хлорида натрия (плотность 1,18–1,25 г/мл) приводило к разрушению ооцист в течение 30–60 минут. Еще более быстрое разрушение ооцист происходило при применении насыщенного раствора аммиачной селитры. Применение насыщенных растворов сахарозы (плотность 1,25 мг/см³) имеет преимущество перед другими флотационными растворами, т.к. является наиболее щадящим по отношению к ооцистам. Это является важным при исследовании большого количества проб и накоплении биомассы возбудителя [1].

Материалы и методы. Целью наших исследований явилось определение наиболее эффективного метода выделения ооцист из фекалий 10 поросят 3-15-дневного возраста. Навеска материала составляла 1 грамм из пробы для каждого метода. Также был произведен сравнительный анализ эффективности выявления ооцист в нативных препаратах и в мазках-отпечатках окрашенных методами Циля-Нильсена, Романовского-Гимза. При этом определялась эффективность применения в диагностике и удобство использования.

Результаты исследований. Выбор той или иной методики зависит от поставленных целей исследования и возможности ее исполнения. Метод окраски мазков по *Цилю-Нильсену* является наиболее демонстративным [10, 9].

В результате окрашивания зафиксированных мазков из содержимого кишечника поросят карбол-фуксином ооцисты криптоспоридий окрасились

в пурпурный цвет с разными оттенками: от ярко-красного до бледно-розового. Они представляли собой округлые образования размером в среднем 5,4×4,6 мкм. Внутри некоторых ооцист можно было рассмотреть удлинённые спорозоиты. Сопутствующая микрофлора окрасилась в синие тона (рисунок 1). В среднем мы выявляли 0–2 ооцисты в поле зрения микроскопа, что соответствовало средней степени инвазии по Никитину Н.Ф. (2007 г.) [6]. Данный метод признан наиболее надёжным для выявления ооцист криптоспоридий.

Однако к окраске карболовым фуксином восприимчивы не только простейшие *C. parvum*, но и другие биологические объекты (в частности, цисты простейших других родов, споры грибов). Это затрудняло дифференциацию цист простейших и спор грибов, а также их видовую дифференциацию, т.к. форма, размер и тинкториальные свойства окрашенных объектов были практически неразличимы [5]. Также не все ооцисты окрашивались, и часто в мазках наблюдались бледно-розовые или совершенно неокрашенные клетки возбудителя [9, 10, 11]. Таким образом, цветовой и морфометрический критерии идентификации объектов при использовании метода Циль-Нильсена не являются специфичными, так как при данном методе доступны преимущественно параметры длины, ширины объекта, а также его тинкториальные свойства, которых недостаточно для объективной оценки [5].

В ходе научных исследований также осуществлялось окрашивание мазков фекалий 10-ти поросят азур-эозином по Романовскому-Гимза. В ряде случаев он весьма информативен, поскольку при адекватной предварительной подготовке мазка краситель проникает внутрь ооцисты и окрашивает спорозоиты (рисунок 2).

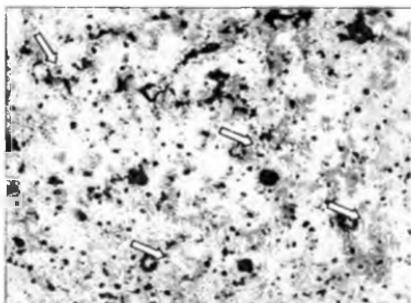


Рисунок 1 – Ооцисты криптоспоридий.
Окраска по методу Циль-Нильсена
(увеличение ×1000)

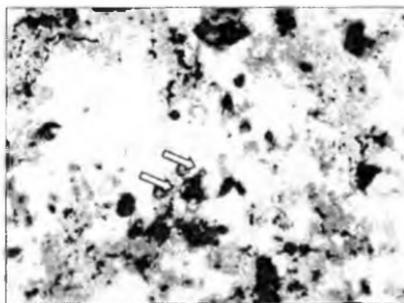


Рисунок 2 – Ооцисты
криптоспоридий.
Окраска по методу Романовского-
Гимза (увеличение ×1000)

Ооцисты криптоспоридий имели вид неокрашенных или слабо окрашенных по периферии округлых образований диаметром до 5 мкм. Спорозоиты располагались по периферии ооцисты, оставляя ее центральной частью пустой. Идентификация ооцист криптоспоридий была затруднена тем, что другие микроорганизмы кишечника также окрашивались азур-эозином, причем значительно интенсивнее ооцист.

Следует учитывать, что вышеописанные методы наиболее эффективны при высокой интенсивности инвазии.

По данным Никитина Н.Ф. оптимальными для диагностики криптоспоридоза являются копроскопические методики. При этом наиболее эффективен поиск ооцист во влажном нативном препарате. Затруднение вызывают лишь малый размер ооцист (в основном от 3 до 7 мкм) и полупрозрачный цвет, сливающийся в некоторой степени с цветом жидкой части препарата [6].

Нами была произведена микроскопия *нативного препарата с глицерином по Павласеку И.* Благодаря глицерину ооцисты криптоспоридий поднимались в верхние слои препарата, а детрит и микрофлора оседали в нижнем слое, что облегчало исследование. При этом ооцисты приобретали слегка розовый цвет (рисунок 3), а другие простейшие и разные частицы не меняли свой цвет под влиянием глицерина. Окраска ооцист криптоспоридий исчезала через 30-40 минут после приготовления нативного препарата. В связи с этим исследованию подлежали только свежеприготовленные мазки. Исследование фекалий методами нативного мазка требовало определенных навыков и гарантировало постановку диагноза только при высокой интенсивности инвазии.

При низкой интенсивности инвазии целесообразно использовать *методы обогащения* (флотацию и седиментацию), так как нередко количество ооцист в фекалиях больного может быть настолько незначительным, что их выявление с помощью микроскопии окрашенных мазков представляет трудную задачу.

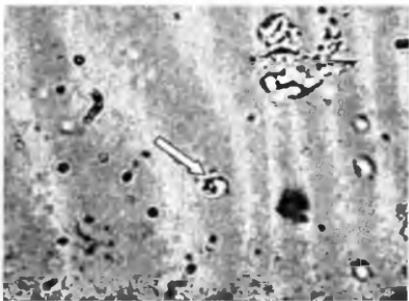


Рисунок 3 – Ооциста *C. parvum*.
Метод нативного мазка с глицерином (увеличение $\times 1000$)

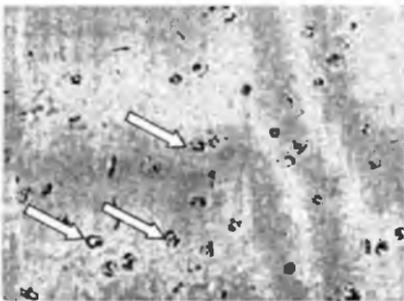


Рисунок 4 – Ооцисты *C. parvum*.
Флотация раствором натрия хлорида (увеличение $\times 600$)

Следует помнить, что чем больше проведено операций, тем значительнее потери при поиске ооцист. Целью копроскопических методик является обогащение пробы и концентрация в препаратах инвазионных начал, достигаемых с помощью флотационных растворов и центрифугирования [6]. При диагностике кокцидиозов с использованием флотационных растворов важно учитывать возможные морфологические и структурные изменения ооцист, особенно криптоспоридий. Ооцисты округлой формы, полупрозрачные с почти бесцветной, сероватой оболочкой, размером $4,5-6,3 \times 3,6-5,4$ мкм, в среднем $5,4 \times 4,6$ мкм. Под влиянием флотационного раствора ооцисты могут приобретать форму полушара и даже контура полукруга [6].

Нами осуществлялись исследования методом *флотации* с применением насыщенных растворов *натрия хлорида* (плотностью $1,2 \text{ мг/см}^3$), *тиосульфата натрия* (плотностью $1,4 \text{ мг/см}^3$), *сахарозы* (плотность $1,25 \text{ мг/см}^3$). Для отмывания фекалий мы использовали 10% формальдегид. Полученную суспензию процеживали сквозь двойной слой марли в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Исследуемый материал (масса навески 1 г) от каждой из 10 исследуемых проб после смешивания с формальдегидом центрифугировали в течение 1–2 мин при 2–3 тыс. об/мин или 3–4 мин при 1500 об/мин. Затем центрифугировали повторно с соответствующими флотационными растворами при том же режиме. Материал собирали металлической петлей, наносили на предметные стекла и микроскопировали при увеличении $\times 400$ и $\times 600$.

При использовании *раствора натрия хлорида* ($1,2 \text{ мг/см}^3$) ооцисты были трудноразличимы по морфологическим признакам, что при низкой степени инвазии значительно затрудняло диагностику (рисунок 4). Достоверной разницы между количеством выделенных ооцист нами не установлено. Оболочка ооцист, флотированных раствором сахарозы (рисунок 5), имела вид четкого контура, окаймляющего морфологические структуры. Ооцисты выглядели как розовые округлые образования. Но при флотации насыщенными растворами значительное количество ооцист задерживалось в пробке нерастворенных фекалий, что не позволяло достоверно установить интенсивность инвазии.

Так же мы проводили выделение ооцист *формалин-эфирным методом*, для чего 1,0 г фекалий от каждой из 10-ти проб смешали с 10–12 мл изотонического раствора хлорида натрия, затем тщательно перемешанную суспензию процеживали через два слоя марли в центрифужные пробирки объемом 15 мл. Осадок дважды промыли изотоническим раствором при центрифугировании, затем тщательно суспендировали в 10 мл 10% раствора формалина, добавляли 3 мл эфира и тщательно перемешивали, предварительно закрыв пробирки пробками. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1,5 тыс. об/мин. Эфир, поверхностный детрит и формалин сливали, а оставшийся на дне пробирок осадок микроскопировали при увеличении $\times 1000$.

Преимущество данного метода заключается в том, что под действием 10% формальдегида в смеси с эфиром непереваренные грубые частицы корма эмульгировали, а жироподобные вещества растворялись. Образовавшаяся эмульсия обладала меньшим удельным весом, чем вода, поэтому фекалии вместе с непереварованными грубыми частицами корма поднимались в виде пробки вверх, а ооцисты – осаждались на дно пробирок. В данном случае биомасса возбудителя содержала гораздо меньше примесей, которые могли бы затруднить диагностику. Однако вместе с ооцистами осадок содержал большое количество микроорганизмов, спор, простейших, населяющих желудочно-кишечный тракт, которые затрудняли диагностику. Морфологически ооцисты были слабодифференцированы.

Нами был предложен комплексный метод *формалин-эфирной седиментации и флотации насыщенным раствором сахарозы*. Исследования проводились по вышеописанной методике, но седиментированный осадок, оставшийся на дне пробирок, смешивали с 4 мл насыщенного раствора сахарозы (1,25 мг/см³). После тщательного размешивания стеклянной палочкой содержимое центрифугировали в течение 5 минут при 1,5 тыс. об/мин. Поверхностную пленку снимали металлической петлей, наносили на предметные стекла и микроскопировали при увеличении $\times 400$, $\times 600$ и $\times 1000$. При данном методе степень очистки препарата была значительно выше. В результате ооцисты криптоспоридий были очищены от непереваренных частиц корма, от микроорганизмов и простейших, населяющих кишечник (рисунок 6). Морфологически ооцисты были легко диагностируемы. При данном методе эффективность выделения ооцист из аналогичной навески фекалий оказалась максимальной.

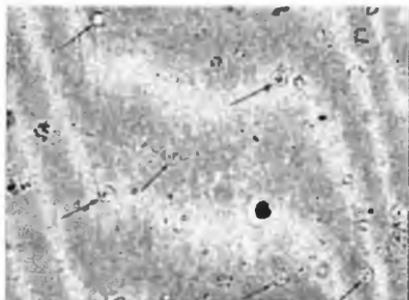


Рисунок 5 – Ооцисты *C. parvum*.
Метод флотации раствором
сахарозы
(увеличение $\times 600$)

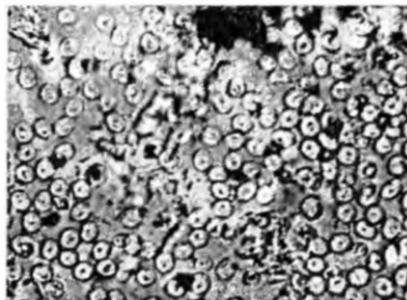


Рисунок 6 – Ооцисты *C. parvum*
Метод формалин-эфирной
седиментации и флотации раствором
сахарозы (увеличение $\times 600$)

Таблица – Сравнительная эффективность методов диагностики криптоспоридиоза поросят (n=10) M±m

Методы диагностики	Количество ооцист <i>Cryptosporidium</i> sp. в 10 п. з. м. (×900)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	в среднем
Флотация растворами:											
- гипосульфита натрия	52,67 ±1,45	24,33 ±2,40	28,33 ±0,88	35,33 ±1,53	48,33 ±2,51	24 ±1,73	21 ±2,31	31,33 ±1,45	28,33 ±5,21	30,67 ±1,76	32,43±3,29
- хлорида натрия	61,33 ±1,85	40,67 ±2,4	34,67 ±0,88	61,67 ±1,76	71,33 ±2,03	44,67 ±3,76	39,33 ±0,88	29,67 ±0,88	63,33 ±1,02	58 ±4,61	50,47±4,52
- сахарозы	61,67 ±4,97	84,33 ±0,33	90,67 ±1,45	59,67 ±2,03	75,33 ±2,40	85,33 ±2,40	101,67 ±2,03	59,33 ±1,33	80,67 ±3,18	65,67 ±7,51	77,63±4,98
- формалин-эфирный метод + флотация сахарозой	380,67 ±0,88	402,67 ±1,45	399,67 ±1,85	381 ±2,08	365,33 ±3,18	359,33 ±1,76	404,67 ±1,85	410,33 ±1,33	429,67 ±0,88	381,33 ±1,15	391,47±6,85

p≤0,05

Данные по эффективности выделения ооцист из одинаковой навески фекалий приведены в таблице 1. Анализируя данные таблицы, можно утверждать, что наиболее оптимальным является предложенный нами комплексный метод формалин-эфирной седиментации и флотации сахарозой. Данный метод эффективнее флотации насыщенным раствором натрия хлорида в 7,75 раза, насыщенным раствором сахарозы – в 5,04 раза, насыщенным раствором гипосульфита натрия – в 12,0 раз.

Заключение. Выбор способа диагностики криптоспоридиоза зависит от поставленной цели. Так, для изучения морфологии ооцист нам более приемлемым является метод окрашивания мазков по Цилю-Нильсену. На основании проведенных нами исследований мы считаем, что впервые примененное нами комплексное использование методов формалин-эфирной седиментации и флотации насыщенным раствором сахарозы значительно обогащает выделение биомассы возбудителя криптоспоридиоза. Выделение ооцист из фекалий комплексным методом седиментации и флотации эффективнее методов флотации в зависимости от используемого насыщенного раствора в 5,04–12,0 раз.

Литература

1. Алиев, А. А. Криптоспоридиоз (диагностика, культивирование *Cryptosporidium parvum* в клетках культуры тканей, экспресс оценка препаратов) : автор. дисс. ... канд. вет. наук : 03. 08. 19. / А. А. Алиев. – Санкт-Петербург, 1993. – 20 с. 2. Анализ проблемы криптоспоридиоза животных и пути решения / А. И. Ятусевич // Ветеринарная медицина Беларуси. – № 1. – 2001. – С. 24 - 26. 3. Бейер, Т. В. Еще раз о кокцидийной природе криптоспоридий (*Sporozoa, Apicomplexa*) / Т.В. Бейер // Паразитология. 2002. – Т. 34. – С.183–195. 4. Васильева, В. А. Зараженность криптоспоридиями свиней и окружающей среды / В.А. Васильева, Н.С. Малахов, Т.Б. Мусаткина // Российский паразитологический журнал. – 2009. – №3. – С.59–61. 5. Воробьева, И. В. Окрашиваемость инцистированных простейших пищеварительного канала и спор грибов карболовым фуксином / И.В. Воробьева, О. С. Мехова, В. М. Мироненко // Материалы VIII Международной научно-практической конференции, г. Витебск, 22-23 мая 2009 года «Биоэкология и ресурсосбережение». – Витебск: УО «ВГАВМ», 2009 г. 6. Никитин, Н. Ф. Копроскопическая диагностика криптоспоридиоза и эймериоза телят / Н.Ф. Никитин // Ветеринария, 2002. – №9 – С.27–31. 7. Решетникова, Т. Н. Патоморфологическая диагностика криптоспоридиоза поросят : автореф. дис... канд. ветеринарных наук: 03.00.19 / Т.Н. Решетникова - Саранск, 2003. - 19 с. 8. Черепанов, А. А. Некоторые аспекты профилактики паразитарных зоонозов, биологии, экологии и таксономии возбудителей / А.А. Черепанов // Ветеринария, 2003. - № 8. – С. 26 - 31. 9. Якубовский, М. В. Паразитарные болезни молодняка животных // Андросик Н. Н., Якубовский М. В., Панковец Е. А. // Справочник по болезням молодняка животных – Минск : Ураджай, 1995. – С. 110–111. 10. Casemore, D. P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis / D.

P. Casemore // *Broadsheet* 128. *J. Clin. Pathol.*, 1991. - 44, - S. 445-451. 11. *Cryptosporidiosis / OIE Terrestrial Manual*, 2008. - Chapter 2.9.4. - S.1192-1215. 12. Joachim, A. *Human Cryptosporidiosis: An Update With Special Emphasis on the Situation of Europe / A. Joachim // Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 51 (6) - 2004. - P.251-259. 13. Pavlasek, I. *Nalezy kryptosporidii ve žlaznatem žaludku u slepic a u volně žijících a exotických ptaků odchycených z volné přírody (Findings of cryptosporidia in the proventriculum of hens and in wild and exotic birds) / I. Pavlasek // Veterinářství*, 2001. - 3,103-108. 14. Smith H. V. *Diagnostics. In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis / H.V. Smith // Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, 1075 Boca Raton, FL, USA, 2008. - 173-208.*

УДК 639.32.091

ПАЗАРИТЫ МОРСКИХ РЫБ И КАЛЬМАРОВ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНУЮ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Мякулич Е. Л.

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»
г. Горки, Республика Беларусь

Приведены результаты исследования некоторых видов морских рыб (сельдь атлантическая, мойва, салака, терпуг, камбала, аргентина, скумбрия, хек, сайра, кефаль черноморская), гольца и кальмаров на предмет обнаружения личиночных стадий нематод (анизакид). В процессе исследований определены экстенсивность и интенсивность инвазии данных видов рыб, проведена оценка жизнеспособности личинок. В результате проведенных исследований было установлено, что личинками анизакид поражены следующие виды рыб: скумбрия, путассу, терпуг, мойва, сельдь атлантическая, хек, сайра, голец и кальмары. Экстенсивность инвазии составила от 20% (мойва и кальмары) до 100% (путассу, сельдь и терпуг), интенсивность инвазии варьировала от 1 личинки (кальмары) до 30 (путассу и терпуг). Кроме того, у терпуга во внутренних органах были обнаружены личинки цестод - нибелиний. Все обнаруженные личинки анизакид оказались нежизнеспособными.

The findings of investigation of some sorts of marine fishes (herring Atlantic, mallotus villosus (muller), sprat, rasp, flounder, argentitis, hardhead, merluccius merluccius, saury, mullet of Black Sea), barbatula barbatula and calamars is adduced for detection of larval stages of nematodes (anisakis). During researches are determined extensiveness and intensity of an invasion of the data of kinds (views) of fishes, the estimation of pot-life of larvas is conducted. As a result of the conducted researches was established, that the