

УДК 619:616.995.132:1-07

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-1-41-46

Диагностика букстонеллеза крупного рогатого скота

Самат Карабаевич Шибитов

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук», 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: samshib@ya.ru

Поступила в редакцию: 24.01.2019; принята в печать: 04.02.2019

Аннотация

Цель исследований: дать анализ методам диагностики букстонеллеза крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Отбор проб фекалий проводили в период с 2013 по 2018 гг. в хозяйствах по выращиванию крупного рогатого с разной технологией содержания (частный сектор, стойлово-выгульное содержание, стойловое содержание). Пробы фекалий массой 10 г отбирали у животных разных возрастных групп из прямой кишки или обычным сбором свежих фекалий в помещениях для содержания животных. Собранный материал консервировали 2% бихроматом калия. Для диагностики использовали паразитологические методы седиментации, флотации, нативные и комбинированные, рекомендуемые для диагностики эндопаразитов. Для микроскопии использовали микроскопы МБС-10 и ZEISS Axio Imager 2.

Результаты и обсуждение. Для диагностики букстонеллеза рекомендованы: метод последовательных промываний (смывов), формалин-эфирный метод и метод нативного мазка. При учете результатов исследований необходимо учитывать особенность букстонелл вызывать диарею у крупного рогатого скота при наличии 1000 и более цист в 1 г фекалий. Для этого необходимо использовать количественные методы, а именно, модифицированный метод МакМастера или специально разработанный автором метод исследования суспензии фекалий в 5%-ном растворе формалина.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, диагностика, протозоозы, инвазированность, цисты, букстонеллез, *Buxtonella sulcata*.

Для цитирования: Шибитов С. К. Диагностика букстонеллеза крупного рогатого скота // Российский паразитологический журнал. 2019. Т. 13. № 1. С. 41–46. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-1-41-46

© Шибитов С. К.

Diagnosics of Cattle Buxtonellosis

Samat K. Shibitov

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a branch of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences", 28, B. Cheremushkinskaya Street, Moscow, Russia, 117218, e-mail: samshib@ya.ru

Received on: 24.01.2019; accepted for printing on: 04.02.2019

Abstract

The purpose of the research is to give an analysis to the methods of diagnostics of cattle buxtonellosis.

Materials and methods. Feces sampling conducted at the farms for cattle growing with different keeping conditions (private housing, stall-outdoor keeping, stall keeping) from 2013 to 2018. Feces specimens with the mass of 10 g were selected from the animals of different age from rectum or standard collection of fresh feces in housing accommodation for animals. Collected material was preserved by 2% potassium bichromate. For diagnostic purposes parasitological methods for sedimentation, flotation, native and combined methods recommended for diagnostics endoparasitosis were used. Microscopes МБС-10 and ZEISS Axio Imager 2 was used for microscopic evaluation.

Results and discussion. For buxtonellosis diagnostics it is recommended: method of sequential irrigation (washout), formalin-ethereous method and direct smear method. Particularity of *Buxtonella sulcata* to cause diarrhea in cattle if 1000 or more cysts is present in 1 g of feces should be taken into account allowing for the results of studies. Quantitative methods should be used for this purpose as follows McMaster's modified method or method of examination feces suspension in 5% solution of formalin specifically developed by author.

Keywords: cattle, diagnostics, protozooisis, infection, cysts, buxtonellosis, *Buxtonella sulcata*.

For citation: Shubitov S. K. Diagnostics of cattle buxtonellosis. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2019; 13(1): 41–46. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-1-41-46

Введение

Паразитологические методы исследования при диагностике кишечных паразитозов животных направлены на выявление яиц и личинок гельминтов, ооцист и цист простейших.

Букстонеллез – распространенная как в России, так и во всем мире протозойная болезнь крупного рогатого скота, вызываемая простейшими рода *Buxtonella*; проявляется диареей, истощением и отставанием в росте [4, 8–13]. Встречается в любом возрасте; наиболее тяжело проявляется у телят до трех месяцев. Букстонеллез оказывает влияние на снижение продуктивности крупного рогатого скота, что, в свою очередь, приводит к экономическим потерям для животноводческой отрасли нашей страны.

Диагноз на букстонеллез устанавливают на основании эпизоотологических данных, клинической картины, микроскопического исследования фекалий количественными методами. Обнаружение единичных букстонелл (цист) у клинически здорового крупного рогатого скота не может служить основанием для установления диагноза.

Букстонеллы у крупного рогатого скота встречаются в двух формах: вегетативной (пролиферативной) форме – трофозоиты и в форме цисты. Тело *Buxtonella sulcata* овоидное, с хорошо заметным желобком, окаймленным двумя гребнями, идущими от одного конца тела к другому; цитостом недалеко от заднего

конца, размер трофозоитов 60–138 × 46–100 (100 × 72) мкм. (рис. 1, 2), цисты тонкостенные, величиной 47–100 мкм (рис. 3) серой или светло-коричневой окраски с заметным макронуклеусом в цитоплазме.

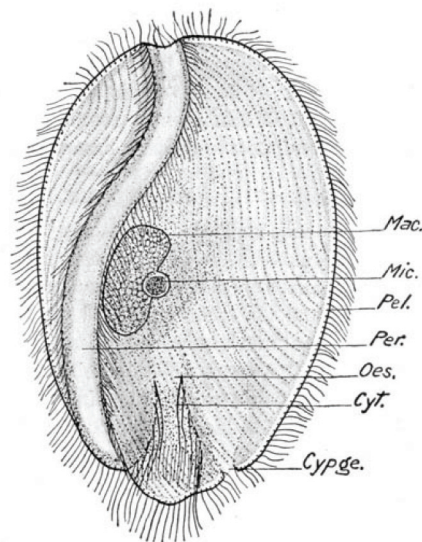


Рис. 1. Морфология *B. sulcata*
(по С. Н. William Rees, 1930)

Букстонеллы поражают слепую кишку толстого отдела кишечника. Как и все цилиофоры, букстонеллы относятся к гетерокариотным (разноядерным) организмам. Они имеют два типа функционально различных ядер. Крупные соматические ядра — макронуклеусы регулируют метаболические процессы.

Мелкие компактные ядра с более или менее конденсированным хроматином — микронуклеусы выполняют генеративные функции. Размножение у букстонелл протекает с участием полового процесса или агамно, чаще путем монотомического (бинарного), реже множественного деления. У некоторых групп размножение осуществляется путем внутреннего или наружного почкования. Двигаются букстонеллы с помощью ресничек. Питается большинство букстонелл путем фаготрофии с помощью ротового аппарата — цитостома, реже транспорт питательных веществ осуществляется пиноцитозом. Пища переваривается в пищеварительных вакуолях. После завершения пищеварения непереваренные остатки удаляются из организма через клеточный анус — цитопрокт или порошицу. В солевом обмене принимают участие сократительные вакуоли [3].



Рис. 2. Vegetативная форма *B. sulcata* (по J. Norman Grim et al., 2015)

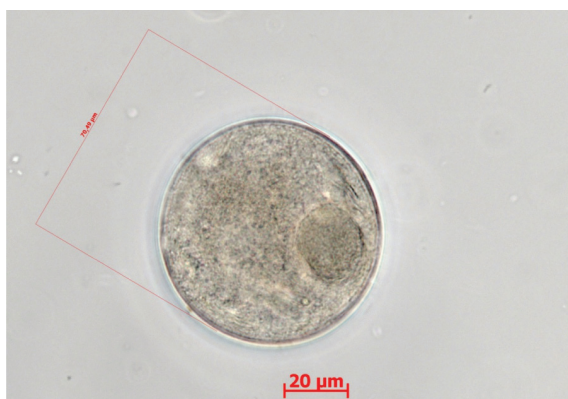


Рис. 3. Циста *B. sulcata* (× 400, оригинал)

Целью наших исследований был анализ методов диагностики букстонеллеза крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Для микроскопического исследования от подозрительного по заболеванию букстонеллезом крупного рогатого скота индивидуально отбирали пробы свежевыделенных фекалий или из прямой кишки [1] и направляли в лабораторию ВНИИП. Материал исследовали в течение 1–2 ч после его взятия, так как вегетативные формы букстонелл быстро разрушаются. Материал консервировали в 2%-ном растворе бихромата калия. Для диагностики использовали паразитологические методы седиментации, флотации, нативные и комбинированные, рекомендуемые для диагностики эндопаразитов [2, 6, 7]. Для микроскопии использовали микроскопы МБС-10 и ZEISS Axio Imager 2.

Результаты и обсуждение

В ходе работы нами были апробировано несколько методов диагностики букстонеллеза, в том числе флотации с солями натрия хлорида, сульфата цинка и сульфата магния. Во всех случаях при флотации цисты букстонелл деформировались и затрудняли диагностику, а нативные, седиментационные и комбинированные методы показали 97–100%-ную эффективность. Необходимо отметить что, в ходе работы была проведена и представлена дифференциальная диагностика при букстонеллезе крупного рогатого скота.

Качественные методы

Метод нативного мазка. Пробу фекалий, при диареях 1–2 капли, помещают на предметное стекло и смешивают с равным количеством теплого физиологического раствора (37 °С), накрывают покровным стеклом и просматривают под малым увеличением микроскопа (7 × 8, 10 × 10). Данный метод легко выполним в условиях хозяйства, где имеется необходимое для микроскопии оборудование.

Метод последовательных промываний. Метод основан на осаждении цист букстонелл в водной взвеси пробы фекалий. В стакан объемом 400 мл кладут примерно 3 г фекалий, вливают небольшое количество воды и размешивают стеклянной палочкой до получения однородной массы. Помешивая массу, порциями добавляют воду до полного объ-

ема стакана. Взвесь фильтруют в другой стакан через металлическое ситечко или марлю и отстаивают до образования осадка. Верхний слой жидкости сливают или отсасывают до осадка спринцовкой (при этом наконечник спринцовки опускают не ниже 1,5–2 см от дна стакана). К осадку добавляют снова такое же количество воды и отстаивают 5 мин, после чего жидкость снова сливают до осадка. Такое промывание повторяют до тех пор, пока надосадочный слой жидкости не станет прозрачным. Последний сливают, а осадок наносят на предметные стекла и микроскопируют.

Формалин-эфирный метод. В центрифужные градуированные пробирки наливают 7 мл 10%-ного раствора формалина и добавляют 1 г фекалий или такое количество фекалий, чтобы раствор в пробирке поднялся до 8 мл. Фекалии тщательно смешивают при помощи индивидуальной для каждого обследуемого палочки с формалином до образования однородной смеси. Процеживают через воронку с металлическим ситечком или двухслойным бинтом в другую центрифужную пробирку, чтобы в новой пробирке процеженного раствора снова было 8 мл; если меньше, то дополнительно можно сполоснуть 10%-ным раствором формалина воронку с бинтом, через который процеживали раствор фекалий. Далее добавляют в эту пробирку 2 мл эфира, т.е. до метки 10 мл, закрывают пробкой и энергично встряхивают в течение 30 с. Встряхивать желательно в вытяжном шкафу, в горизонтальном положении, придерживая при этом пробку. Затем центрифугируют при 3000 об/мин. в течение 1 мин. или в течение 2 мин. при 1500 об/мин. После центрифугирования в пробирке образуется 4 слоя: эфир, «пробка», раствор формалина и на дне осадок, в котором будут содержаться цисты простейших. «Пробку» палочкой отделяют от стенок пробирки и вместе с надосадочной жидкостью выливают, перевернув пробирку вверх дном; с краев пробирки убирают ватным тампоном лишнюю влагу, чтобы она не стекала на дно пробирки, переворачивают пробирку опять дном вниз. Осадок, оставшийся на дне пробирки (весь), наносят на предметное стекло пипеткой или непосредственно из пробирки; капли должны быть небольшими, по 2 капли на одном предметном стекле [6, 7].

Существуют модификации формалин-эфирного метода (готовые коммерческие

наборы), которые нами апробированы в условиях лаборатории и также могут успешно применяться для диагностики букстонеллеза крупного рогатого скота [5].

Количественные методы

Метод МакМастера в модификации Tomczuk. При помощи весов отбирают 5 г фекалий и помещают в 400 мл стаканы, наполненные водопроводной водой, тщательно размешивают. После 20 мин. отстаивания часть воды выливают до «язычка» осадка, процедуру слива повторяют 4 раза до получения осветленного раствора. Далее осадок процеживают через металлическое ситечко в меньшие по объему (50 мл) стаканы и доводят объем суспензии осадка до 30 мл; стаканы помещают на магнитную мешалку, при перемешивании отбирают 0,3–0,4 мл раствора и переносят пипеткой в обе части камеры McMaster до заполнения всех ячеек нарисованных квадратов. Затем подсчитывают под малым увеличением микроскопа все цисты букстонелл в двух квадратах камеры McMaster. Число цист в г/фек. (CPG) рассчитывают по формуле:

$$CPG = \frac{\text{Число цист в обоих квадратах камеры McMaster}}{5 \text{ (общая масса пробы)}} \times 100$$

Исследование суспензии фекалий в 5% формалине с подсчетом цист букстонелл. Заготавливают необходимое число пробирок и наливают в них по 5 мл 5% водного раствора формалина. Фекалии вносят в пробирку в количестве 1 г, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, после чего пробирку закрывают пробкой. Микроскопию можно проводить сразу или через несколько дней, так как материал хранится в таком виде в течение нескольких недель при температуре 2–4 °С. Непосредственно перед исследованием содержимое пробирки тщательно перемешивают и при помощи автоматической пипетки отбирают 100 мкл (0,1 мл). Полученную каплю накрывают покровным стеклом размером 24 × 24 мкм, просматривают всю поверхность раздавленной капли под малым увеличением микроскопа, в которой подсчитывают число цист букстонелл. Умножив подсчитанное число букстонелл в препарате на 50 (объем 5% водного раствора формалина), получают число цист букстонелл в 1 г фекалий.

Необходимо отметить, что выявляемость цист букстонелл зависит от количества взятого 5%-ного раствора формалина. Если берут 5 мл, то число обнаруженных цист умножают на 50, если – 10 мл, то умножают уже на 100. Соответственно порог минимального числа обнаруженных цист в первом случае будет равен 50 цист в 1 г фекалий, а во втором – 100 цист.

Дифференциальная диагностика

При диагностике букстонеллеза необходимо дифференцировать данную инвазию от свободноживущих инфузорий *Oxytricha spp.* попадающих в организм крупного рогатого скота с водой или кормом. При этом учитывают размер цист у окситрих – они мельче (25–40 мкм), имеют золотистый цвет, макронуклеус почти не просматривается под микроскопом (рис. 4).

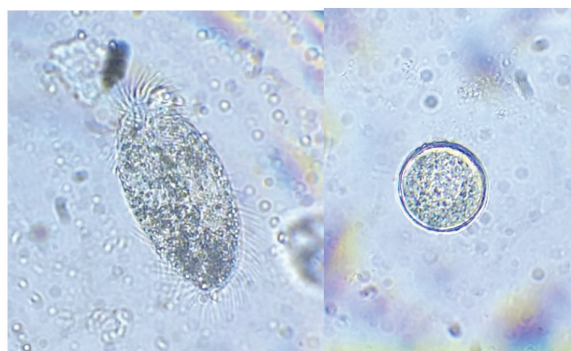


Рис. 4. Вегетативная форма и циста свободноживущей инфузории *Oxytricha spp.* (× 400 из фекалий крупного рогатого скота, оригинал)

Трофозоиты вытянутой формы, подвижные, движения хаотичные. Окситрихи сохраняют жизнеспособность на протяжении долгого времени, тогда как трофозоиты букстонелл быстро разрушаются во внешней среде. При исследовании проб через несколько дней после взятия, окситрихи размножаются в больших количествах, образуя мелкие цисты.

Таким образом, для диагностики букстонеллеза рекомендованы: метод последовательных промываний (смывов), формалин-эфирный метод и метод нативного мазка. При учете результатов исследований необходимо учитывать особенность букстонелл вызывать диарею у крупного рогатого скота при наличии 1000 и более цист в 1 г фекалий [13]. Для этого необходимо использовать количествен-

ные методы, а именно, модифицированный метод МакМастера или специально разработанный автором метод исследования суспензии фекалий в 5%-ном растворе формалина.

Литература

1. Антонова Б. И. Лабораторные исследования в ветеринарии. Биохимические и микологические исследования. Справочник. М.: Агропромиздат, 1991. 286 с.
2. Котельников Г. А., Хренов В. М. Методические рекомендации по диагностике наиболее распространенных гельминтозов сельскохозяйственных животных. М.: Колос, 1980. 34 с.
3. Крылов М. В. Определитель паразитических простейших: человека, домашних животных и сельскохозяйственных растений. С.-Пб.: Наука, 1996. 601 с.
4. Шибитов С. К., Сафиуллин Р. Т. Распространение *Buxtonella sulcata* крупного рогатого скота в Центральной зоне России // Ветеринария. 2016. № 8. С. 36–38.
5. Шибитов С. К., Сафиуллин Р. Т., Качанова Е. О. Сравнительная характеристика гельминтовоо-скопических методов диагностики для выявления цист *Buxtonella sulcata* крупного рогатого скота // Матер. докл. науч. конф. Всерос. о-ва гельминтол. РАН «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 2017. Вып. 18. С. 558–559.
6. Шибитов С. К. Описаторхоз плотоядных животных в условиях Западной Сибири (распространение, патогенез, диагностика, меры борьбы): дис. ... канд. вет. наук. М., 2013. 174 с.
7. Шуляк Б. Ф., Архипов И. А. Нематодозы собак (зоонозы и зооантропонозы). М.: КонсоМед, 2010. С. 223–225.
8. Dianso J. A. et al. Molecular identification of *Buxtonella sulcata* from associated-diarrhea in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. *Annals of parasitology*. 2018; 64(2): 93–100.
9. Ganai A. et al. Incidence of *Buxtonella sulcata* in bovines in RS Pura, Jammu. *Journal of parasitic diseases*. 2015; 39(3): 446–447.
10. Kumar B. et al. Incidence of *Buxtonella sulcata* in Jaffrabadi buffaloes of southwestern Gujarat, India. *Buffalo Bulletin*. 2017; 36(4): 623–628.
11. Hasheminasab S. S. et al. *Buxtonella spp.* like infection in cattle in Sanandaj province, Iran. *Annals of parasitology*. 2015; 61(4): 247–251.
12. Correa O. et al. Presence of the ciliated protozoan *Buxtonella sulcata* (Trichostomatia,

Balantidiidae) in cattle in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 2015; 51(198): 32–37.

13. Tomczuk K. et al. Incidence and clinical aspects of colon ciliate *B. sulcata* infection in cattle. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2005; 49: 29–33.

References

- Antonova B. I. Laboratory studies in veterinary science. Biochemical and mycological studies. Reference book. Moscow. Agropromizdat Publ. 1991: 286. (In Russ.)
- Kotelnikov G. A., Khrenov V. M. Methodological recommendations on diagnostic of the most common helminthosis of live-stock animals. Moscow. Kolos Publ. 1980: 34. (In Russ.)
- Krylov M. V. Field guide of parasitic protozoa: human being, domestic animals and agricultural plants. St. Petersburg. Nauka Publ. 1996: 601. (In Russ.)
- Shibitov S. K., Safiullin R. T. Generalization of *Buxtonella sulcata* of cattle within central zone of Russia. *Veterinariya = Veterinary Science*. 2016; 8: 36–38. (In Russ.)
- Shibitov S. K., Safiullin R. T., Kachanova E. O. Comparative analysis of helminthoovoscopic diagnostics for detecting *Buxtonella sulcata* cysts of cattle. Materials of research and practice conference of All-Russian Helminthologists community of Russian Academy of Sciences “*The theory and practice of protection from parasitic diseases*”. 2017; 18: 558–559. (In Russ.)
- Shibitov S. K. Opisthorchosis of carnivorous animals under the conditions of West Siberia (generalization, pathogenesis, diagnostics, preventive measures). diss. Can. Vet. Sci. Moscow. 2013: 174. (In Russ.)
- Shulyak B. F., Arkhipov I. A. Eelworm disease of dogs (zoonoses and zoonanthroponosis). Moscow. KonsoMed Publ. 2010: 223–225. (In Russ.)
- Dianso J. A. et al. Molecular identification of *Buxtonella sulcata* from associated-diarrhea in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. *Annals of parasitology*. 2018; 64(2): 93–100.
- Ganai A. et al. Incidence of *Buxtonella sulcata* in bovines in RS Pura, Jammu. *Journal of parasitic diseases*. 2015; 39 (3): 446–447.
- Kumar B. et al. Incidence of *Buxtonella sulcata* in Jaffrabadi buffaloes of southwestern Gujarat, India. *Buffalo Bulletin*. 2017; 36 (4): 623–628.
- Hasheminasab S. S. et al. *Buxtonella* spp. like infection in cattle in Sanandaj province, Iran. *Annals of parasitology*. 2015; 61(4): 247–251.
- Correa O. et al. Presence of the ciliated protozoan *Buxtonella sulcata* (Trichostomatia, Balantidiidae) in cattle in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 2015; 51 (198): 32–37.
- Tomczuk K. et al. Incidence and clinical aspects of colon ciliate *B. sulcata* infection in cattle. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2005; 49: 29–33.