

HEMORAGIČNO-NEKROTIČNI ENTERITIS KOD RODITELJA BROJLERA* HAEMORRHAGIC-NECROTIC ENTERITIS IN HEAVY BREEDS BROILERS

Jezdimirović N., Kureljušić B., Ivetić V., Kureljušić Jasna, Cvetojević Đ.,
Maslić-Strižak Danka, Radanović O., Jezdimirović Milanka**

Ispitivanja su imala za cilj da se utvrdi uticaj *Clostridium perfringens* tip A na razvoj patomorfološkog supstrata, njegov intenzitet i distribuciju kod teških roditelja uzrasta petnaest nedelja. Ispitivanje je obavljeno na leševima 8 koka i 7 petlova teških roditelja provenijencije COBB 500. Posle izvršene obdukcije, za histopatološko ispitivanje uzeti su uzorci promenjenih delova jejunuma i jetre, a za bakteriološko i molekularno ispitivanje crevni sadržaj jejunuma.

Kod svih leševa u otvorenoj pleuroperitonealnoj šupljini, već *in situ*, uočava se promenjeni deo jejunuma. On je bio izrazito dilatiran celom dužinom, a njegov zid plavičasto-sive boje sa diseminiranim subseroznim punktfornim krvnim ekstravazatima. Njegovim otvaranjem iz lumena je izlazio polutečni sadržaj u kojem plivaju krvni koagulum i krpičasti delovi nekrotične mukoze. Mikroskopskim pregledom isečaka tkiva tankih creva bojenih HE metodom zapažena je difuzna nekroza crevnih resica. One su destruisane i zamenjene eozinofilnom bestrukturnom masom. Pored toga, uočava se edem submukoze, kongestija kapilara i krvni ekstravazati u mukozi, kao i infiltracija neutrofilnih granulocita u lamini propriji. Navedene mikroskopske alteracije oslikavaju hemoragično-nekrotični enteritis. Mikroskopskim pregledom isečka tankih creva bojenih Brown & Brenn metodom ustanovljene su kolonije bakterija u distalnim delovima submukoze.

Bakteriološkim ispitivanjem u anaerobnim uslovima, izolovana kultura je identifikovana kao *Clostridium perfringens*. Primenom multiplex PCR dobijeni izolat je genotipiziran kao *Clostridium perfringens* tip A.

* Rad primljen za štampu 03. 06. 2013. godine

** Nemanja Jezdimirović, dr vet. med., istraživač saradnik, dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, naučni saradnik, dr sci. vet. med. Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, Jasna Kureljušić, dr vet. med., istraživač saradnik, Đ. Cvetojević, dr. vet. med., istraživač pripravnik, dr sci. vet. med. Danka Malić-Strižak, naučni saradnik, mr sci. vet. med. O. Radanović, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, dr sci. vet. med. Milanka Jezdimirović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

Na osnovu patomorfoloških, bakterioloških i molekularnih ispitivanja može da se zaključiti da infekcija teških roditelja *Clostridium perfringens* tipa A protiče sa slikom difuznog hemoragično-nekrotičnog jejunitisa, da uzročnik duboko penetrira u tkivo jejunuma i da su pšenica i pšenične mekinje činili favorizujući faktor za proliferaciju etiološkog agensa.

Ključne reči: roditelji brojlera, hemoragično-nekrotični enteritis, *Clostridium perfringens* tip A

Uvod / Introduction

Oboljenje domaćih i divljih ptica, u čijoj etiologiji značajnu ulogu imaju različiti tipovi *Clostridium perfringens*, opisano je u literaturi pre pola veka pod nazivom nekrotični enteritis. Prvi ga je opisao Parish 1961. godine. Ovo oboljenje je poznato u literaturi i pod drugim imenima: klostridijalni enteritis, enterotoksemija i „bolest trulih creva“ (Saif, 2008). Najčešće obole pilići uzrasta od 2. do 6. nedelje, mada se bolest zapaža i kod starije živine uzrasta od 22. do 30. nedelja (Wilson i sar., 2005). *Clostridium perfringens*, podeljen je u 6 tipova (A, B, C, D, E i F), a na osnovu proizvodnje i izlučivanja glavnih toksina α , β , ϵ i ι . Međutim, u poslednje vreme otkriveni su novi tokisni (NetB, Beta2 i TpeL) kojima se pridaje značaj u patogenezi ove bolesti (Shojadoost i sar., 2012). U patologiji živine značajnu ulogu imaju tip A i C, stim da je tip A najčešći patogen.

Infekcija *Clostridium perfringens* nastaje preko digestivnog sistema. Obzirom da je *Clostridium perfringens* deo saprofitske mikroflore intestinalnog sistema zdrave živine, pod određenim uslovima oboljenje može da bude prouzrokovano i endogeno. Inače, pojava bolesti često je povezana sa promenom i prekomernim unosom hrane. Predisponirajući faktor za pojavu bolesti je prekomerno unošenje žitarica (raž, ječam, pšenica), ribljeg i mesnog brašna i brašna od perja (Kaldhusdal, 2000; Drew i sar., 2003). Nastanak bolesti pospešuju i crevne parazitoze, kokcidioza i askaridioza (Keyburn i sar., 2006). Isto tako, primena antibakterijskih medikamenata povećava rizik za razvoj oboljenja (Yang i sar., 2009; Keyburn i sar., 2010). U svim ovim slučajevima nastaje poremećaj ravnoteže saprofitske crevne mikroflore, tj. stimuliše se proliferacija klostridija u intestinalnom sistemu, koji proizvode velike količine toksina odgovornih za patogenost.

Cilj rada bio je da se ispituju patomorfološke karakteristike, intenzitet i distribucija kao i etiologija nekrotičnog enteritisa kod roditelja brojlera starosti petnaest nedelja.

Materijal i metode rada / Material and methods

U ovom radu ispitani su leševi 8 koka i 7 petlova teških roditelja provenijencije COBB 500, starosti petnaest nedelja. Uginula živina poreklom je sa farme

iz centralne Srbije, gde je dnevno uginuće u petnaestoj nedelji odgoja prevazilazila vrednost tehnološkog normativa. Jato od 11720 jedinki je odgajano u podnom sistemu, i hranjeno kompletnom krmnom smešom sa udelom pšenice 10,8% i pšeničnih mekinja 18,0%. Posle izvršene obdukcije, za histopatološko, bakteriološko i molekularno ispitivanje uzeti su uzorci promenjenih delova jejunuma, crevni sadržaja i deo jetre. Uzorci jetre i jejunum za histopatološki pregeled fiksirani su u 10% puferizovanom formalinu, procesovani standardnim postupkom, i uklopljeni u parafinske blokove. Parafinski isečci tkiva debljine 5 µm bojeni su hematoksilin-eozin (HE) i Brown i Brenn metodom. Uzorci razmaza sluznice promenjenih delova tankih creva mikroskopski su pregledani na prisustvo kokcidija. Promenjeni delovi tankih creva sa sadržajem zasejani su na Zeissler agar (bioMérieux) i na Tarozzi bujon (bioMérieux) pod anaerobnim uslovima, 48h na temperaturi od 37°C u svrhu izolacije infektivnog agensa. Uzorci su istovremeno zasejani i na krvni agar sa 5% ovčije krvi pod aerobnim uslovima, 24h na 37°C. Za izolaciju *Salmonella* spp. uzorci su stavljani u rastvor za predobogaćenje, inkubirani 18h na 37°C u puferizovanoj peptonskoj vodi (BPW; HiMedia). Za molekularnu tipizaciju toksina *Clostridium perfringens* korišćen je multiplex PCR (Qiagen), i prajmeri (Applied Biosystem) kao što je opisao Van Asten i sar. (2009).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

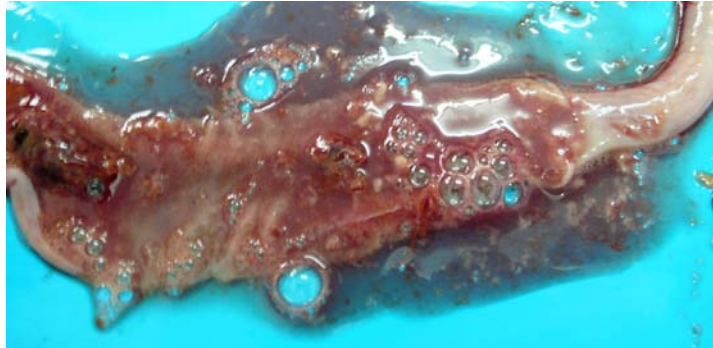
Spoljašnjim pregledom 5 leševa koka i 3 leša petla ustanovljene su anemija kreste, podbradnjaka i kože obraza. Kod 3 koke i 4 petla, u ovim regijama manifestno je i ikterično prebojavanje, odnosno impregnacija tkiva žučnim bojama (slika 1). Nastalo prebojavanje kože, može da se objasni većim prisustvom sadržaja proteina i kolagenih vlakana u ovoj telesnoj regiji (Perišić i sar., 1980). Povećanje koncentracije žučnih boja u krvi živine nastaje zbog hemolitičkog delovanja alfatoksina *Clostridium perfringens* tip A, koji vrši hidrolizu supstanci neophodnih za očuvanje integriteta ćelijskih membrana. Kod svih obdukovanih leševa, u otvorenoj pleuroperitonealnoj šupljini već *in situ* jasno su uočljivi promenjeni delovi tankih creva. Jejunum je celom svojom dužinom izrazito dilatiran i fragilan, zid je plavo-sive boje sa diseminiranim subseroznim punktifornim krvnim ekstravazatima tako da ima izgled creva inficiranog kokcidijama. Ovakva situiranost i distribucija inflamatornog procesa može da se uporedi sa promenama nastalim kod kokcidioze izazvane *Eimeria necatrix* (Knežević i Matejić, 1996; Williams, 2005). Prilikom otvaranja jejunuma iz lumena je izlazio polutečni sadržaj u kojem plivaju krvni koagulum i krpčasti delovi nekrotične mukoze. Slične nekrotične promene u tankom crevu opisuje i Pattison (2002) koji ih čak gradualno diferencira na osnovu njihove debljine. Nekad, nekrotične promene dosežu i dublje, kada se vide preko seroze, a u tom slučaju ponekad se razvija i peritonitis (Knežević i Matejić, 1996; Pattison, 2002). U nekim segmentima creva ovaj polutečni sadržaj pomešan je sa mehurićima gasa, što mu daje penušav izgled (slika 2). Naši rezultati odgovaraju nalazima Vissienon i sar. (1996) koji su opisali morfološke

promene kod pilića starih 26 dana, a koji su bili veštački inficirani *Clostridium perfringens* tip A, u koncentraciji od 5×10^8 CFU. Međutim, ovakve intestinalne alteracije nisu zapažene u našem ispitivanom materijalu. Zašto je jejunum kod ove tokso-infekcije ciljni organ? Razlog verovatno treba tražiti u visokoj koncentraciji bakterije *Clostridium perfringens* u jejunumu i paralitičkom delovanju alfa toksina, slično kao i kod nekrotičnog enteritisa prasadi na sisi (nepublikovani rezultati). Ovom mišljenju idu u prilog i rezultati Cross i sar. (2003) koji su ustanovili da prisustvo *Clostridium perfringens* u sadržaju tankog creva (koncentracija 10^6 /g) povećava mogućnost nastanka nekrotičnog enteritisa kod živine. Pšenica preko svojih neskrbnih polisaharida favorizuje intestinalnu proliferaciju *Clostridium perfringens* kod živine (Kalhusdal, 2000; Drew i sar., 2003). Imajući ovo u vidu, mišljenja smo da su pšenica i pšenične mekinje (udeo od 28,0%) u sastavu kompletne krmne smeše kojom su hranjeni teški roditelji, imali uticaja na proliferaciju *Clostridium perfringens* tipa A i nastanak hemoragično-nekrotičnog enteritisa. Obilna intraluminarna krvavljenja sa nastankom krvnih ugrušaka posledica su povećane permeabilnosti krvnih sudova na koje deluje alfa toksin (Pattison, 2002; Loveland i sar., 2004; Wilson i sar., 2005). Krvni ugrušak nastao na ovaj način, i u ovakvom obimu, može da prouzrokuje opturacione stenoze creva i posthemoragične ishemije koje su vidljive na koži glave.

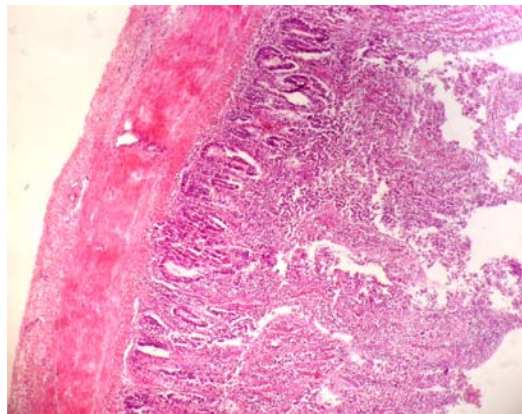


Slika 1. Ikterično prebojavanje glave i podbradnjaka /
Picture 1. Icteric staining of head and podbradnjak

Mikroskopskim pregledom isečaka tkiva jejunuma, bojenih HE metodom zapažena je difuzna nekroza crevnih resica. Crevne resice su destruisane i pretvorene u eozinofilnu bestrukturну masu. Pored toga, uočava se i edem submukoze, kongestija kapilara i krvni ekstravazati u mukozu, kao i infiltracija neutrofilnih granulocita u lamini proprijji. Navedene mikroskopske alteracije oslikavaju hemoragično-nekrotični enteritis (slika 3).



Slika 2. Jejunum – krvni koagulumi i krpičasti delovi nekrotične mukoze sa penušavim crevnim sadržajem /
Picture 2. Jejunum - blood coagulums and patches of necrotic mucosa with foamy intestinal contents

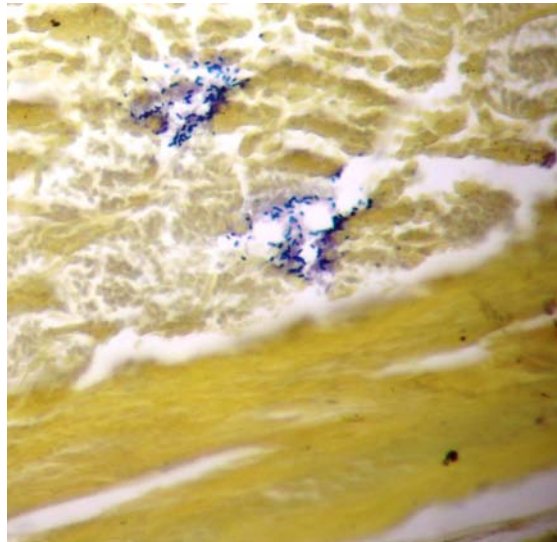


Slika 3. Jejunum – edem submukoze, kongestija kapilara i krvni ekstravazati u mukozi, kao i neutrofilna infiltracija u lamini propriji (HE, X200)
Picture 3. Jejunum - submucose oedema, capillary congestion and blood extravasates in mucosa, as well as neutrophilic infiltration in lamina propria (HE, X200)

U tkivnim isečcima jetre uočena su multifokalna, polimorfna nekrotična ognjišta, u kojima se ne raspoznaje normalna histostruktura. Mikroskopskim pregledom isečaka jejunuma bojeni Brown i Brenn metodom, za dokaz prisustva bakterija, ustanovljene su kolonije bakterija u distalnim delovima submukoze, bliže tunici muskularis (slika 4). Kolonije čini veliki broj plavo obojenih štapičastih bakterija od kojih su mnoge sa slikom međusobne konglutinacije. Mikroskopske nalaze, slične ovim, opisuju i drugi autori (Loveland i sar., 2001). Naši rezultati dobijeni morfološkim ispitivanjima proširuju ranije opisane nalaze i obezbeđuju sigurno postavljanje dijagnoze hemoragično-nekrotičnog enteritisa kod živine.

Bakteriološkim ispitivanjem u anaerobnim uslovima nakon 24 h inkubacije na temperaturi od 37°C, na Zeissler agaru izrasle su konveksne, sivkaste kolonije,

zaobljenih rubova i prečnika oko 1 mm. Oko kolonija formirana je dvostruka zona hemolize. U mikroskopskom preparatu uočeni su Gram-pozitivni štapići. Na osnovu mikroskopskih i kulturelnih osobina i biohemijske aktivnosti izolovana kultura identifikovana je kao *Clostridium perfringens*. U aerobnim uslovima izrasle bakterije tipične su za fiziološku crevnu mikrofloru (*E. coli*).



Slika 4. Jejunum – bakterijske kolonije u distalnim delovima submukoze, bliže tunici muskularis (Brown & Brenn metoda bojenja, X400) /

Picture 4. Jejunum - bacterial colonies in distal parts of submucosa, close to tunica muscularis (Brown & Brenn coloring method, X400)

Primenom multiplex PCR dobijeni izolat je genotipiziran kao *Clostridium perfringens* tip A.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata patomorfoloških, bakterioloških i molekularnih ispitivanja može da se zaključi:

- Infekcija *Clostridium perfringens* tipa A kod teških roditelja brojlera starosti petnaest nedelja, protiče sa slikom difuznog hemoragično-nekrotičnog jejunitisa.
- Uzročnik ove tokso-infekcije duboko penetrira u tkivo jejunuma, i jasno se uočava primenom metode bojenja po Brown i Brenn-u.
- U ovom našem ispitivanju, verujemo da su pšenica i njene mekinje bile favorizujući faktor proliferacije *Clostridium perfringens* tipa A u jejunumu teških roditelja.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je realizovan po projektima III 46009 i TR 31062 koji se finansiraju od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

This work has been realized in the scope of projects III 46009 and TR 31062, financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Barnes HJ, Clostridial diseases in: Saif YM. Disease of poultry 12th edition, Blackwell publishing, 2008, 872-9.
2. Cross DE, Svoboda K, Mc Devitt SG, Acamovic T. The performance of chickens fed diets with and without thymus oil and enzymes. British poultry Sci 2003; 44, 18-19.
3. Drew MD, Van Kessel AG, Maenz DD. Adsorption of methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in conventional and germ free chickens. Poultry Sci 2003; 82, 1149-53.
4. Kaldhusdal MI. Necrotic enteritis as affected by dietary ingredients. J. World Poult 2000; No:6, 42-3.
5. Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson MM, Awad MM, Rood JI, Moore RJ. Alpha toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. Infect Immun 2006; 74:6496-500.
6. Keyburn AL, Yan XX, Bannam TL, Van Immerseel F, Rood JI, Moore RJ. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* expressing NetB. Vet Res, 2010; 41:21.
7. Knežević N., Matejić M. Bolesti pernate živine. Izd. Veterinarski fakultet, Veterinarska komora Srbije, 1996.
8. Lovland A, Kaldhusdal M, Redhead K, Skjerve E, Lillehaug A. Maternal vaccination against sub-clinical necrotic enteritis in broilers. Avian Pathol 2004; 33:81-90.
9. Lovland A, Kaldhusdal M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. Avian Pathol 2001; 30:73-81.
10. Pattison M. Some clinical and pathological features of enteritis in broilers – observations on treatment in U.K. Proceedings of the Poultry Enteritis Conference. Elanco Animal Health, Cambridge, England page C1-10, 2002.
11. Perišić V. Jetra u: Stefanović S. i sar. Specijalna klinička fiziologija, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 1980, 394-464.
12. Shojadoost B, Vince AR, Prescott JF. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. Vet Res 2012; 26; 43(1): 74.
13. Van Asten AJM, CW, van der Wiel, Nikolaou G, Howers DJ, Grone A. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. Veterinary Microb 2009; 136, 3- 4, 411-12.
14. Vissiennon Th, Menger S, Ingrid Langhof. Hepatic and renal ultrastructural lesions in experimental *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia in chicken. Avian Dis 1996; 40(3):720-4.
15. Williams RB. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, intergrated disease management by maintenance of gut integrity. Avian Path 2005; 34:159-80.
16. Wilson J, Tice G, Brash ML, Hilaire SST. Manifestations of *Clostridium perfringens* and related bacterial enteritides in broiler chickens. World's Poult Sci J 2005; 61:435-37.
17. Yang Y, Iji PA, Choct M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in feed antibiotics. World Poul Sci J 2009; 65, 97-114.

ENGLISH

HAEMORRHAGIC-NECROTIC ENTERITIS IN HEAVY BREEDS BROILERS

N.Jezdimirovic, B.Kureljusic, V.Ivetic, Jasna Kureljusic, DJ.Cvetojevic, Danka Maslic-Strizak, O.Radanovic, Milanka Jezdimirovic

The aim of the investigation was to determine the influence of *Clostridium perfringens* type A on the development of pathomorphological substrate, its intensity and distribution in fifteen weeks old heavy breeds broilers. The investigation was carried out on corpses of 8 hens and 7 roosters of heavy breeds of provenance COBB 500. After the completion of the autopsy, samples of altered parts of jejunum and liver were taken for histopathological examination, and jejunum intestinal contents for bacteriological examination.

In all the corpses, in open pleuroperitoneal cavity, even in situ, an altered part of jejunum can be noticed. It was extremely dilated the entire length, and its wall was bluish-gray with disseminated subserous punctiform blood extravasates. When opened, semi-liquid content with blood coagulums and patches of necrotic mucosa went out of it. By microscopic examination of small intestine tissue cuttings, colored by HE method, there was observed a diffuse necrosis of intestinal villi. They were destroyed and replaced by eosinophilic structureless mass. Furthermore, there could be noticed submucose oedema, capillary congestion and blood extravasates in mucosa, as well as infiltration of neutrophilic granulocytes in lamina propria. These microscopic alterations reflect hemorrhagic necrotic enteritis. By microscopic examining of small intestine cuttings colored according to Brown & Brenn method, colonies of bacteria in distal parts of the submucosa were found out.

Using bacteriological tests in anaerobic conditions, there was isolated a culture identified as *Clostridium perfringens*. After applying of multiplex PCR, the obtained isolate was genotyped as *Clostridium perfringens* type A.

On the basis of pathomorphological, bacteriological and molecular examinations, it can be concluded that the infection of heavy breeds with *Clostridium perfringens* type A is manifested by appearance of haemorrhagic-necrotic jejunitis, that the causer penetrates deeply into jejunum tissue and that wheat and wheat bran were a favoring factor for proliferation of the etiological agent.

Key words: heavy breeds broilers, haemorrhagic-necrotic enteritis, *Clostridium perfringens* type A

РУССКИЙ

ГЕМОРРАГИЧЕСКИ-НЕКРОТИЧЕСКИЙ ЭНТЕРИТ У РОДИТЕЛЬСКОГО СТАДА ТЯЖЕЛЫХ ПОРОД

Н. Ездимирович, Б. Курелюшич, В. Иветич, Ясна Курелюшич, Дж. Цветоевич, Дanka Маслич-Стрижак, О. Раданович, Миланка Ездимирович

Целью исследованию было определение влияния *Clostridium perfringens* типа А на развитие патоморфологического субстрата, интенсивность и распространение в родительском стаде тяжелых пород в возрасте пятнадцати недель. Исследование

проведено на трупах 8 кур и 7 петухов родительского стада тяжелых пород кросса СОВВ 500. После проведенного вскрытия для гистопатологического исследования взяты образцы измененных участков тощей кишки и печени, а для бактериологического и молекулярного исследования содержимое тощей кишки.

У всех трупов в открытой плевро-перитонеальной полости уже *in situ* обнаруживается измененный участок тощей кишки. Она заметно расширена на всем протяжении, а ее стенка синевато-серого цвета с диссеминированными субсерозными точечным кровоизлияниями. При его открытии из протока выделялось полужидкое содержимое со сгустками крови и обрывки некротизированной слизистой. При микроскопическом исследовании срезов ткани тонкого кишечника, окрашенных по методу HE, обнаружен диффузный некроз кишечных ворсинок. Они деструктурированы и заменены бесструктурной эозинофильной массой. Кроме того, отмечен отек подслизистой, капиллярный застой и кровяные экстрavasаты в слизистой, а также инфильтрация нейтрофильных гранулоцитов в пластинку слизистой. Указанные микроскопические альтерации дают картину геморрагически-некротического энтерита. При микроскопическом исследовании срезов тонкого кишечника, окрашенных методом Brown & Brenn, установлено наличие колоний бактерий в дистальных участках подслизистой.

При бактериологическом исследовании в анаэробных условиях выделена культура, идентифицированная как *Clostridium perfringens*. Полученный при помощи multiplex PCR изолят генотипирован как *Clostridium perfringens* тип А.

На основе патоморфологических, бактериологических и молекулярных исследований можно сделать вывод о том, что инфекция родительского стада тяжелых пород *Clostridium perfringens* типа А протекает с картиной диффузного геморрагически-некротического энтерита, что возбудитель проникает глубоко в ткани тощей кишки, а также что пшеница и пшеничные отруби стали фактором, благоприятствующим проникновению этиологического агента.

Ключевые слова: родительское стадо тяжелых пород, геморрагически-некротический энтерит, *Clostridium perfringens* тип А