

Моисеева Карина Абдукахоровна

**АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДИАРЕЙ
У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, АССОЦИИРОВАННЫХ
С ТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИМИ ШТАММАМИ
*CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург, 2023 г.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ).

Научный руководитель: **Сухинин Александр Александрович**, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Галиуллин Альберт Камилович**, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии

Спиридонов Геннадий Николаевич, доктор биологических наук, ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», заведующий лабораторией бактериальных патологий животных

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Защита состоится «21» декабря 2023 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.01 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5, тел. (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5., и на официальном сайте <http://spbguvm.ru>.

Автореферат разослан: «___» октября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Кузнецова Надежда Викторовна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Скотоводство является одной из ведущих отраслей животноводства, обеспечивающей население России и мира ценными продуктами питания и сырьем для промышленной переработки. Важным эпизоотическим, эпидемиологическим и экономическим аспектом является сохранение здорового поголовья животных (Безбродова Н.А., 2020; Капустин А.В., Алипер Т.И., 2017; Спиридонов А.Г. и др., 2022).

Среди болезней, сопровождающихся поражением желудочно-кишечного тракта, одно из ведущих мест занимает энтеротоксемия, ассоциированная с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*, широко распространенная на территории Российской Федерации и за рубежом (Супова А.В. и др., 2022; Капустин А.В., 2019; Крамер Ю.Н., 2020; Новгородцева А.К., Плешакова В.И., 2021; Пименов Н.В. и др., 2016; Глотова Т.И. и др., 2023). Возбудитель содержится в биологических жидкостях животных, почве, воздухе, воде, мясе животных (Пилипенко И.В., 2015). Крупный рогатый скот является как источником возбудителя инфекции, так и восприимчивым животным, а содержимое прямой кишки и другие пути выделения возбудителя инфекции в окружающую среду – фактором передачи возбудителя; тем самым периодически или одновременно являясь каждым звеном эпизоотической цепи (Сидорчук А.А. и др., 2021). А-токсин *Clostridium perfringens* повреждает фосфолипидные мембраны, из-за чего его считают одним из сильнодействующих ядов (Uzal F.A. и др., 2018).

Патологический процесс обуславливается комплексным действием токсинов и ферментов *Clostridium perfringens*, ядовитыми продуктами распада бактерий и клеток макроорганизма (Галиуллин А.К. и др., 2022; Спиридонов А.Г. и др., 2022). Экономический ущерб обусловлен летальностью, снижением количества и качества молочной и мясной продукции. Смертность молодняка достигает до 25,0 % (Козлова А.Д. и др., 2017). Данные отечественной и зарубежной литературы свидетельствуют о том, что инфекционные диареи крупного рогатого скота вызваны ассоциацией рота-, корона-, герпесвирусов и токсигенных штаммов бактерий: в условиях скотоводческих хозяйств практически всегда наблюдается смешанная инфекция (Хурамшина М.Т. и др., 2020; Hang В.Р. и др., 2019). В настоящее время недостаточно освещена методология диагностики диарей, вызванных токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*, что относится к актуальным и трудновыполнимым задачам ветеринарной медицины, а продукция скотоводства может быть источником инфекции для людей (Лобзин Ю.В. и др., 2021).

Своевременная диагностика диарей как симптомокомплекса инфекционной болезни, соблюдение алгоритма и выбор оптимального метода диагностики будут способствовать этиологической расшифровке диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* у крупного рогатого скота.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время Сухиной М.А. и соавт. в 2018 году предложен алгоритм лабораторной диагностики *Clostridium difficile* – ассоциированной диареи в эпидемиологии, который широко применяется в медицинской практике. Алгоритм диагностики диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*, отсутствует в ветеринарной практике. В то же время его применение особенно оправдано при лабораторной диагностике этиологии диарей, причиной которых могут быть бактерии, вирусы, паразиты и простейшие.

Цель и задачи исследований. Цель работы – разработать и апробировать на территории Северо-Западного федерального округа алгоритм лабораторной диагностики диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* у крупного рогатого скота.

Для достижения указанной цели поставлены следующие задачи:

1. Установить биологические свойства токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens*, выделенных из биоматериала крупного рогатого скота с диарейным синдромом в Северо-Западном федеральном округе и провести экспресс-индикацию энтеротоксина с помощью иммуноферментного анализа для выявления токсина возбудителя.

2. Определить видовой состав микроорганизмов в патологическом материале от крупного рогатого скота с диарейным синдромом методом секвенирования нового поколения.

3. Синтезировать и апробировать праймеры, кодирующие ген фосфолипазы С α -токсина *Clostridium perfringens*, синтезировать молекулярный зонд с модернизированным гасителем флуоресценции для обнаружения в материале искомой ДНК.

4. Разработать и научно обосновать алгоритм диагностики диарей, вызванных токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* у крупного рогатого скота.

Научная новизна и ценность полученных результатов. По результатам бактериологического метода исследования установлены биологические свойства выделенных изолятов *Clostridium perfringens*, выделенных из патологического материала крупного рогатого скота с диарейным синдромом. Определен характер роста *Clostridium perfringens* на среде системы AnaeroGen W-ZIP Compact для контроля роста анаэробов, преимуществами которой служат стабильность готовой питательной среды и отсутствие специальных условий хранения.

Разработаны, синтезированы и апробированы высокоспецифичные праймеры для детекции гена фосфолипазы С *CPA* для ПЦР-РТ, с использованием модернизированного зонда с измененным гасителем флуоресценции, концентрацией реагентов и режимом амплификации, что обеспечивает воспроизводимость на 99,9%. Проведены бактериологические, иммунологические и молекулярно-генетические исследования штаммов *Clostridium perfringens*, полученных от крупного рогатого скота Северо-Западного региона.

Впервые в Российской Федерации был разработан и научно обоснован алгоритм проведения клинико-лабораторной диагностики диарей, вызванных токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* у крупного рогатого скота, заключающийся в пошаговой идентификации возбудителя. Разработаны методические рекомендации «Алгоритм проведения клинико-лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*» (утверждены Методическим советом ФГБОУ ВО СПбГУВМ 01 февраля 2023 года, протокол №1).

Теоретическая и практическая значимость. Синтезированные и апробированные высокоспецифичные праймеры с модернизированным зондом для детекции гена фосфолипазы С *CPA* методом ПЦР в режиме реального времени позволяют быстро и качественно обнаружить в исследуемом материале данный возбудитель.

Разработанный алгоритм диагностики, заключающийся в последовательной идентификации, позволит ветеринарным врачам и специалистам в области лабораторной диагностики использовать альтернативные методы, необходимые для постановки диагноза.

Результаты исследований по выделению, идентификации и детекции генов токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens*, оптимизации лабораторной диагностики из биоматериала от крупного рогатого скота используются в работе Северо-Западной испытательной лаборатории ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (справка о внедрении результатов научных исследований от 29.05.2023), для проведения лекционных и лабораторно-практических занятий для студентов факультета ветеринарной медицины очной, заочной и очно-заочной форм обучения в курсе ветеринарной микробиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (справка о внедрении в учебный процесс результатов диссертационной работы от 07.02.2023), в производственном процессе при диагностике диарей крупного рогатого скота и планировании противоэпизоотических профилактических мероприятий ЗАО «Предпортовый» (справка о внедрении в производственный процесс результатов диссертационной работы от 23.05.2023). Получен патент на полезную модель «Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных» (RU 204004 U1 от 04.05.2021).

Методология и методы исследований. В работе применены клинический, патологоанатомический, бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический, эпизоотологический, биоинформатический, аналитический и статистический методы. Используются методологические принципы, учитывающие условия содержания крупного рогатого скота на предприятиях, факторы передачи токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens*, схемы вакцинации от анаэробных инфекций.

Объектом исследования служил крупный рогатый скот, от животных брали пробы содержимого рубца и кишечника, ткани прямого кишечника, гноя и

участков ран копыт, содержимого матки коров дойного стада, молозива и молока. Предметом исследования служили бактерии *Clostridium perfringens*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплексный подход исследования биологических свойств изолятов *Clostridium perfringens*, полученных от крупного рогатого скота Северо-Западного федерального округа, индикации токсина иммунологическим методом позволяют дифференцировать токсинпродуцирующие штаммы *Clostridium perfringens* от не продуцирующих токсин штаммов.

2. Высокоспецифичные праймеры для генов, кодирующих фосфолипазу С СРА, позволяют быстро и эффективно обнаружить ДНК токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens* в исследуемом материале.

3. Набор сконструированных праймеров, подобранных концентраций реагентов и режима амплификации при проведении ПЦР в режиме реального времени для обнаружения α -токсина *Clostridium perfringens* обладает воспроизводимостью на 99,9%.

4. Алгоритм диагностики диарей, вызванных токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* у крупного рогатого скота, позволяет быстро, эффективно и экономически выгодно поставить диагноз.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Результаты научных исследований, выводы и предложения обоснованы и базируются на аналитических и экспериментальных данных. Исследования проведены с использованием современных методов анализа и расчёта. Доказана повторяемость полученных данных и их достоверность исследованием 439 проб биоматериала от крупного рогатого скота. Статистическая обработка цифровых показателей проведена с использованием программ Microsoft Excel 2016 и PAST на персональном компьютере. Достоверность различий оценивали с применением t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Материалы исследований диссертационной работы с дальнейшей публикацией результатов были представлены:

- на XIV Международной научно-практической конференции «Current issues of modern science and practice», 2021;

- на X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2021;

- на 24й ежегодной конференции Европейского общества репродукции домашних животных (ESDAR), John Wiley & Sons, 2021;

- на научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии в науке и образовании», ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, 2022;

- на XI международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной году науки и технологий «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2022;

- на Международной научно-практической конференции «Экономически и социально значимые инфекции сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы», ФГБУ «ВГНКИ», Москва, 2022;

- на III национальной премии «Серебряный Микроскоп» в рамках XXXI Московского международного Ветеринарного конгресса, Москва, 2023;

- на Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в медицинской микробиологии: наука, практика, инновации», посвященной 100-летию кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 2023;

- на Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики», посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова, Санкт-Петербург, 2023.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является результатом научных исследований автора в период с 2020 по 2023 гг. Результаты исследований получены автором лично или при его определяющем участии. Личный вклад соискателя заключается в разработке цели, определении задач, проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных результатов, написании статей, диссертационной работы и автореферата. Часть исследований и публикаций проведены и написаны в соавторстве. Соавторы научных публикаций не возражают против использования в диссертации материалов совместных исследований. Личный вклад соискателя в проведенные исследования и их анализ составляет 90%.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, из них 5 работ в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, 7 публикаций в материалах научных и научно-практических конференций, 1 работа опубликована в журнале, индексируемом в международной базе данных Scopus.

Материалы исследований послужили основой для разработки методических рекомендаций и патента.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных: пункты 4, 7, 16.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 136 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, заключение, практические предложения, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования, список сокращений, условных обозначений, список литературы, приложение. Иллюстрационный материал диссертации работы включает 22 рисунка, 12 таблиц. Список использованной литературы включает 216 источников, в том числе 119 источников иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследование проводили в период с 2020 по 2023 годы на базе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ).

В работе использованы клинический, патологоанатомический, бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический, биоинформатический, аналитический и статистический методы исследований.

Всего было отобрано 439 проб у 225 голов крупного рогатого скота на территории 10 хозяйств Ленинградской области, 4 хозяйств Псковской области. Материалом для исследования служил патологический материал, отобранный от животных с диарейным синдромом, ранами и абсцессами, а также жидкость из навозного стока на территории животноводческих комплексов (Таблица 1).

Таблица 1 – Исследуемый материал методами лабораторной диагностики

№	Материал	Метод	Количество исследованных проб
1	Содержимое рубца	Бактериологический, NGS- секвенирование	6
2	Содержимое прямой кишки	Бактериологический, иммунологический, ПЦР-РТ	254
3	Ткани прямой кишки	Бактериологический, ПЦР-РТ	8
4	Гной и содержимое ран, абсцессов	Бактериологический, ПЦР-РТ	42
5	Содержимое матки, шейки матки и влагалища	Бактериологический, ПЦР-РТ	52
6	Молозиво и молоко	Бактериологический, NGS-секвенирование, ПЦР-РТ	57
7	Содержимое навозного стока	Бактериологический, ПЦР-РТ	20

2.1.1 Отбор проб и приготовление мазков для бактериоскопии

Отбор проб проводили с учетом общих правил ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» и методических указаний по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований, согласно методикам и инструкциям по отбору материала для проведения иммуноферментного анализа и ПЦР.

2.1.2 Бактериологический метод идентификации

Clostridium perfringens

Первичный посев проводили в МПБ и на МПА, а также в среду Китта-Тароцци. Для получения чистой культуры использовали элективные и дифференциально-диагностические среды, а именно среду Китта-Тароцци, МПА, МПБ, сахарно-кровяной агар, глюкозо-кровяной агар Цейсслера, среду

Вильсона-Блера, молоко, среды Гисса, среду из системы атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact для контроля роста анаэробов, обеспечивали при росте анаэробные условия с помощью системы атмосферной генерации для *in vitro* диагностики. Идентификацию микроорганизмов, полученных бактериологическим методом, проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Подвижность определяли методом висячей капли.

Для проведения биохимической идентификации *Clostridium perfringens* использовали чистые культуры анаэробных микроорганизмов, выделенные из биологического материала, отобранные в соответствии с характерными свойствами. Дифференциацию от других микроорганизмов проводили при сравнении полученных биохимических и вирулентных свойств возбудителя со справочным материалом (Определитель бактерий Берджи), биологическим методом.

Для проведения микроскопии мазки окрашивали по Граму и методом Романовского-Гимзе, использовали световой микроскоп.

2.1.3 Экспресс-индикация энтеротоксина *Clostridium perfringens* в биологическом материале (в содержимом прямой кишки)

Для диагностики *in vitro* использовали набор RIDASCREEN *Clostridium perfringens* Enterotoxin (C0601, Германия), представляющий собой набор для осуществления иммуноферментного анализа для качественной идентификации энтеротоксина, выделяемого бактериями *Clostridium perfringens*, в 6 пробах содержимого прямой кишки, наличие антигена в которых было подтверждено методом ПЦР. Результат учитывали фотометрически в режиме 450 нм. Использовали иммунологический анализатор Multiskan FC.

2.1.4 Определение наличия *Clostridium perfringens* методом ПЦР в режиме реального времени

ДНК выделяли с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) согласно инструкции. В работе использовали коммерческую тест-систему. Результат исследования экспериментального материала считали положительным при $Ct \leq 35$ по каналу Нех.

2.1.5 Метагеномный анализ микробиома содержимого рубца и молозива

Метагеномные исследования содержимого рубца и молозива выполняли методом секвенирования нового поколения (NGS), путём анализа гена прокариотической 16S-рибосомальной РНК (16S рРНК). Тотальную ДНК из исследуемых проб выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно прилагаемой инструкции. Амплификацию для последующего секвенирования проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью эубактериальных праймеров, фланкирующих участок V1V3 гена 16S рРНК.

Использовали следующий режим амплификации: 3 минуты при 95 °С (1 цикл); 30 секунд при 95°С, 30 секунд при 55°С, 30 секунд при 72°С (25 циклов); 5 минут при 72°С (1 цикл).

Метагеномное секвенирование осуществляли на геномном секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 («Illumina, Inc.», США). Таксономическую принадлежность микроорганизмов до рода определяли в программе RDP Classifier.

Математическую и статистическую обработку результатов проводили с применением программных пакетов Microsoft Office Excel 2016, PAST. Результаты статистического анализа считали значимыми при $p \leq 0,05$.

2.1.6 Разработка праймеров для детекции генов CPA в биологическом материале

В рамках разработки тест-системы для идентификации *Clostridium perfringens* методом ПЦР-РТ был выбран участок гена CPA, кодирующий ген фосфолипазы С α -токсина штамма *Clostridium perfringens* CP322. Информацию об участке гена изучали с помощью GenBank – базы данных генетических последовательностей. За основу взяли последовательность нуклеотидов, подобранную коллективом ученых из Кореи (Chon J.W. и соавт., 2012). Последовательность нуклеотидов, специфичность гена подтверждали с помощью BLAST. Выравненную последовательность нуклеотидов изучали в программе SnapGene с помощью визуализации фрагментов ДНК.

Синтезировали следующие последовательности: прямой праймер – (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3', обратный праймер – (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3'. В экспериментальных целях для наибольшей эффективности реакции и учета результатов в программе гаситель флуоресценции, локализирующийся между праймерами, заменили на BHQ1. Получили зонд 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G-3' BHQ1. Олигонуклеотиды и все реагенты для реакции ПЦР, используемые в исследовании, были синтезированы и приобретены у ООО «Бигль» (Санкт-Петербург, Россия).

С помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) выделяли ДНК из биологического материала согласно инструкции.

Эксперимент состоял в испытании 3 вариантов концентраций. Смесь реагентов вносили в пробирки объемом 0,2 мл белого цвета в стрипах в комплекте с плоскими оптически прозрачными крышками для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Соблюдали следующий температурный режим: 50°С – 2 минуты, 95°С – 10 минут, 40 циклов 95°С – 15 секунд, 60°С – 1 минуту. Исследование проводили на анализаторе ПЦР в реальном времени Roche LightCycler 96 (Швейцария). Обработку данных проводили в соответствующей лицензионной программе Roche LightCycler 96.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Оптимизация отбора проб с применением инструмента для взятия проб фекалий из прямой кишки животных

Предлагаемый инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных имеет преимущества за счет изоляции пробы до момента ее закладки в индивидуальный контейнер для сбора фекалий. За счёт этого достигается высокая точность последующей диагностики, исключая травматический фактор для животного и ветеринарного специалиста, снижая трудовые затраты ветеринарных специалистов.

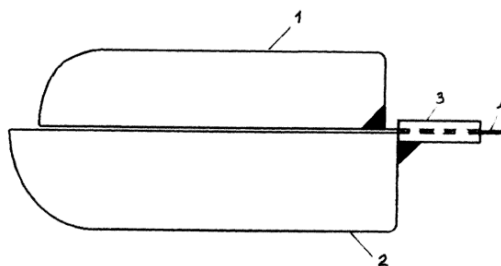


Рисунок 1 - Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных, где 1 – верхняя половина; 2 – нижняя половина; 3 – ручка в виде трубки; 4 – цилиндрический пруток

Получен патент на полезную модель «Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных» (RU 204004 U1 от 04.05.2021).

2.2.2 Идентификация выделенных изолятов *Clostridium perfringens* бактериологическим методом

При окрашивании нативных мазков методом Романовского-Гимзе обнаруживали толстые палочки со слегка закругленными концами, темно-фиолетового цвета и капсулой светло-розового цвета (Рисунок 2).

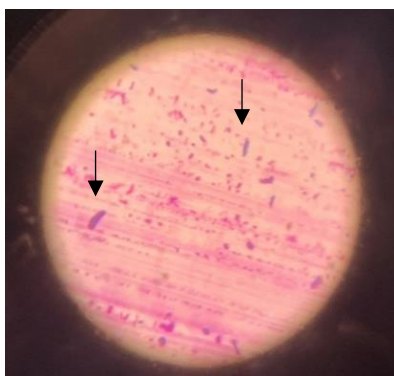


Рисунок 2 – Микрокартина *Clostridium perfringens*, окраска по Романовскому-Гимзе, x100

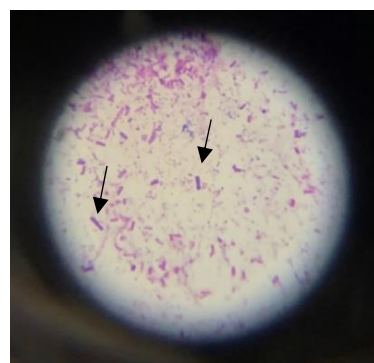


Рисунок 3 – Микрокартина *Clostridium perfringens* из колонии глюкозо-кровяного агара, окраска по Граму, x100

При окрашивании мазков по Граму из среды Китта-Тароцци и из колоний дифференциальных сред в поле зрения регистрировали грамположительные толстые палочки со слегка закругленными концами, расположенные одиночно (Рисунок 3).

Регистрировали рост на среде Китта-Тароцци, сопровождающийся помутнением среды в большей степени в сторону дна пробирки, бурным газообразованием спустя 12 часов культивирования в термостате (Рисунок 4). Регистрировали рост на жидкой среде Вильсона-Блера с черным помутнением и интенсивным газообразованием через 24 часа с момента посева (Рисунок 5).



Рисунок 4 – Рост *Clostridium perfringens* на среде Китта-Тароцци



Рисунок 5 – Рост *Clostridium perfringens* на среде Вильсона-Блера

На глюкозо-кровяном агаре регистрировали круглые, сочные, куполообразные S-колонии, с гладкими ровными краями, серовато-белые, мутные с зоной β -гемолиза (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Колонии *Clostridium perfringens* на глюкозо-кровяном агаре, окруженные зоной β -гемолиза



Рисунок 7 – Колонии *Clostridium perfringens* на среде AnaeroGen W-ZIP Compact

На глюкозо-кровяном агаре Цейсслера колонии округлые, гладкие, выпуклые серовато-зеленые через 48 часов с момента посева, с зоной α -гемолиза. На среде из системы атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact (Рисунок 7), предназначенной для контроля роста анаэробов, регистрировали круглые, сочные, куполообразные S-колонии, с гладкими ровными краями, серовато-белые, мутные.

Из полученных чистых культур микроорганизмов готовили мазки, окрашивали по Граму. *Clostridium perfringens* представляли собой грамположительные палочки размером 0,9-1,3x3,0-9,0 мкм, плохо или не образующие в посевах споры, расположенные субтерминально. Методом висячей капли установили отсутствие подвижности *Clostridium perfringens* в выделенных культурах. Регистрация многочисленных грамположительных

палочек и спор позволяет предположить в исследуемых пробах биологического материала клостридий, морфологически схожих с *Clostridium perfringens*.

В результате определения биохимических свойств выделенных изолятов *Clostridium perfringens* установили ферментативные свойства возбудителя: на 3-5 сутки разжижает желатин, в молоке вызывает быстрое свертывание, сбраживает с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу и галактозу.

В результате исследования были изучены 296 проб содержимого прямой кишки и содержимого с примесью крови ран копыт и межпальцевой щели телят и коров с целью дифференциальной диагностики инфекционных болезней, клинически проявляющихся повышением температуры, отказом от корма, общей интоксикацией, диареей с примесью слизи и крови, обильным газообразованием, ранами с гнойным содержимым, нервными явлениями и др.

В результате дифференциации *Clostridium perfringens* от других анаэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов выделили 95 изолятов облигатных и факультативных анаэробных микроорганизмов: 17,9% *Clostridium perfringens*, 24,2% *Clostridium spp*, 4,2% *Fusobacterium necrophorum*, 30,5% *Escherichia coli*, 9,5% *Streptococcus spp*, 11,6% *Salmonella enterica*, 2,1% *Proteus vulgaris* и их ассоциации, установили биохимические свойства (Таблица 2).

Таблица 2 – Дифференциация выделенных изолятов по биохимическим свойствам (n=95)

Микроорганизм	Биохимические (ферментативные) свойства									
	Желатин	Сероводород	Молоко	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Маннит	Галактоза	Мальтоза	Глицерин
<i>Clostridium perfringens</i> , (n=17)	Разжижает на 3-5 сутки	-	Быстрое свертывание	+	+	+	-	+	+	+/-
<i>Clostridium spp</i> (n=23)	Разжижает на 2-4 сутки	-	Свертывание	+	-	-	-	-	+	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=4)	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> (n=29)	-	-	Свертывание	+	+	-	+	+	+	-
<i>Streptococcus spp</i> (n=9)	Разжижает в виде воронки	+	Свертывание	+	+	+	+	+	-	+
<i>Salmonella enterica</i> (n=11)	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=2)	+	+	Пептонизация	+	-	+	-	-	+	-

В молодой культуре, выделенной из содержимого с примесью крови ран копыт и межпальцевой щели телят и коров, обнаруживали длинные зернистоокрашенные нити, окрашивали карболовым фуксином и метиленовым синим. При проведении биопробы на белых мышах на 3 день наблюдали в окружности инъекции опухоль и нагноение, на 6 день – некроз. На 12 день регистрировали гибель мышей, при патологоанатомическом вскрытии наблюдали некроз мышц конечностей, гнойные очаги в печени, легких, сердце. Мазки-отпечатки с печени проводили на глюкозо-кровяной агар. Через 48 часов регистрировали очень мелкие колонии S-формы, диаметром менее 1 мм, выпуклые, серо-белого цвета с ровными краями. Получили изоляты *Fusobacterium necrophorum*.

2.2.3 Индикация энтеротоксина

Clostridium perfringens иммунологическим методом

Регистрировали среднюю оптическую плотность исследуемых проб $2,06 \pm 0,02$ Б (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты иммуноферментного теста для качественного определения энтеротоксина в пробах (n=6)

№ планшета	1	20220922-CLAS/0316-000001-1			
Референс	Лунка Коорд.	ОП	S/P соотношен	Результат	
Отрицат. контроль	A1	0,052			
Отрицат. контроль	B1	0,052			
Полож. контроль	C1	2,498			
Полож. контроль	D1	2,498			
01	E1	2,296	92 %	P	
02	F1	1,965	78 %	P	
03	G1	2,016	80 %	P	
04	H1	2,254	90 %	P	
05	A2	2,004	80 %	P	
06	B2	1,819	72 %	P	

Установили, что иммунологический метод диагностики позволяет идентифицировать токсинпродуцирующие штаммы *Clostridium perfringens* от возбудителей, не экспрессирующих ген *CPE*.

2.2.4 Результаты детекции генов *Clostridium perfringens*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

С помощью ПЦР идентифицировали штаммы *Clostridium perfringens*. В результате наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции, пороговый цикл по каналу Nex наблюдали в 9 из 16 проб на $26,5 \pm 4,7$ цикле амплификации, что говорит о содержании ДНК *Clostridium perfringens* в исследуемых пробах.

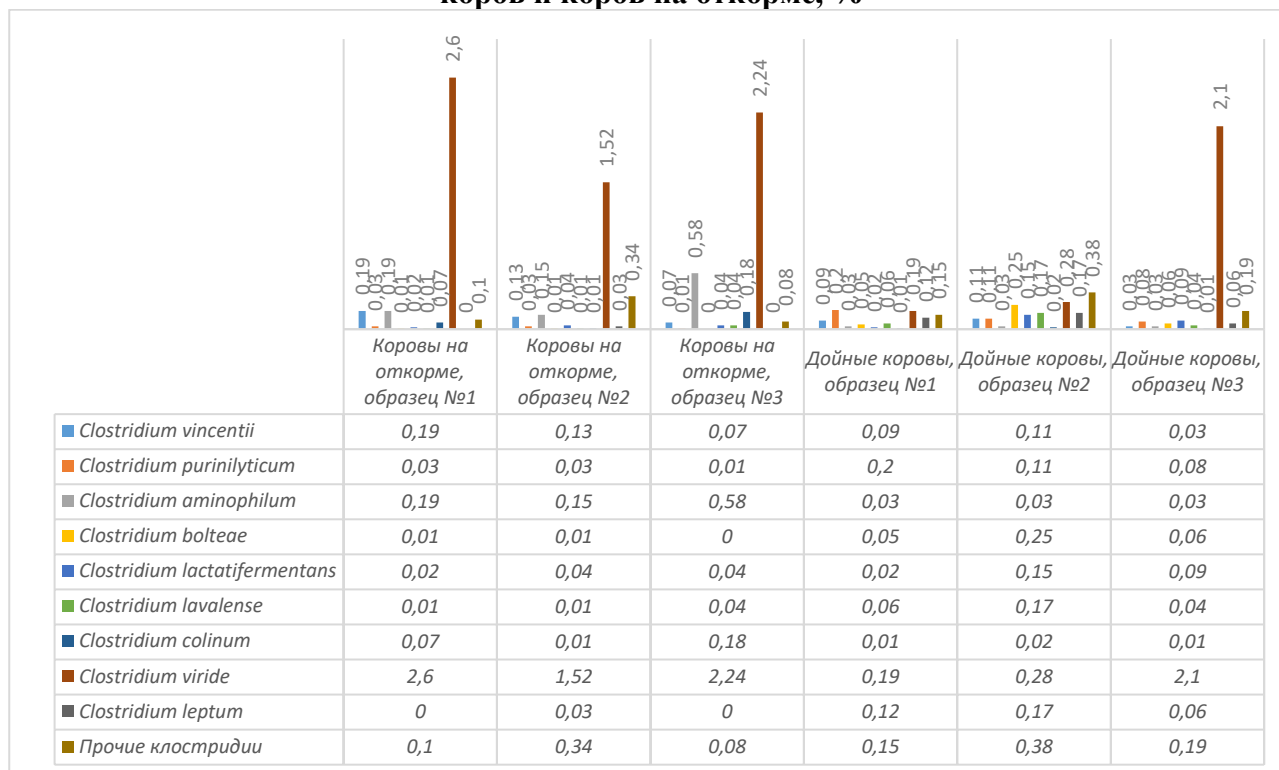
2.2.5 Анализ микробиома содержимого рубца

и молозива с помощью секвенирования нового поколения

По итогам проведенных исследований 2 групп коров с диарейным синдромом (n=3 в каждой группе) – коров дойного стада и коров на откорме – получены следующие результаты: при исследовании проб, полученных от коров на откорме, наиболее часто из семейства Ruminococcaceae регистрировали *Clostridium viride*, содержание которых достигало 2,6%. В пробах, полученных

от дойных коров, количество данных бактерий достигало 2,1% от всех обнаруженных микроорганизмов. Статистические данные приведены в Таблице 4.

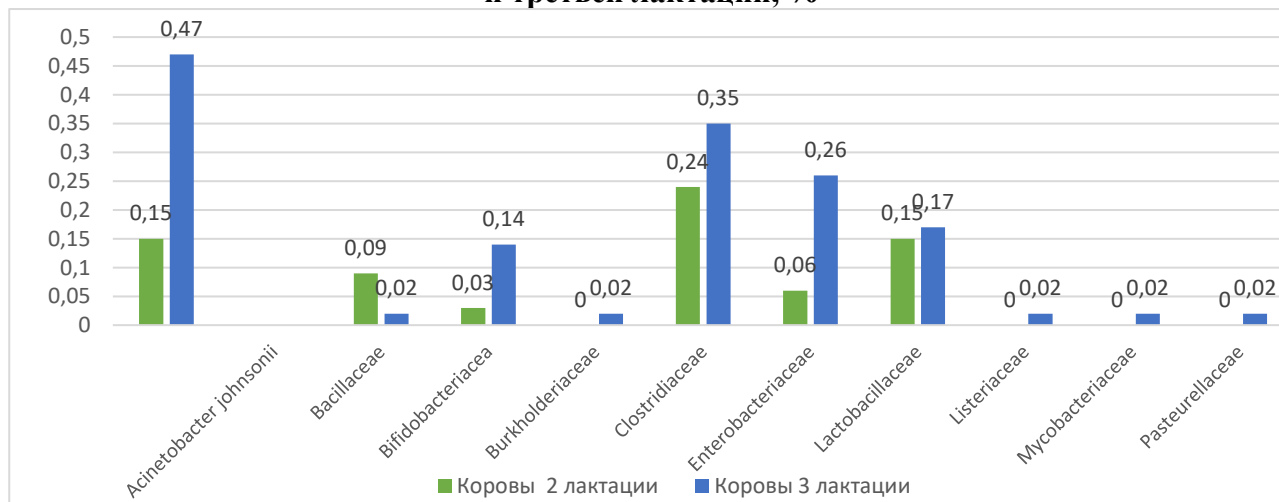
Таблица 4 – Содержание видов клостридий в рубцовом содержимом дойных коров и коров на откорме, %



Установили преобладание клостридий семейства Lachnospiraceae (*Clostridium aminophilum*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium lactatifermentans*, *Clostridium lavalense*, *Clostridium colinum*).

В результате исследования микрофлоры молозива 2 групп коров с диарейным синдромом (n=10 в каждой группе) установили, что микробиальный состав молозива отличался в зависимости от периода лактации. Разнообразие видового состава микробиоты молозива в период третьей лактации было выше, чем во вторую лактацию (Таблица 5).

Таблица 5 – Содержание бактерий различных семейств в молозиве коров второй и третьей лактации, %



Отличие заключалось в содержании патогенных и условно-патогенных бактерий. Было обнаружено, что в третью лактацию содержание *Acinetobacter johnsonii* увеличилось в 3,1 раза. Представительство бактерий семейства Clostridiaceae было выше в 1,4 раза, семейства Enterobacteriaceae в 4,3 раза. В третью лактацию в молозиве были обнаружены представители семейств, отсутствовавшие во вторую — Burkholderiaceae, Listeriaceae, Mycobacteriaceae, Pasteurellaceae. Произошло уменьшение доли представителей семейства Bacillaceae более, чем в 4 раза. В то же время доля представителей семейства Bifidobacteriaceae возросла в 4,7 раза, а количество полезных лактобактерий осталось на том же уровне.

2.2.6 Результаты разработки и апробации праймеров для детекции гена *CPA* в биологическом материале

Учитывая длительность определения микроорганизмов *Clostridium perfringens* общепринятыми методами, ПЦР в режиме реального времени с модифицированным нами зондом является быстрым и эффективным способом идентификации возбудителя.

Был выбран оптимальный состав реагентов для проведения амплификации, приведенный в Таблице 6.

Таблица 6 – Испытуемая концентрация для ПЦР - РТ

№	Компонент	Количество (мкл)
1	ДНК	2
2	Forward - праймер	1
3	Reverse - праймер	1
4	Зонд FAM	1
5	ПЦР - смесь	10
6	Вода деионизованная высокой степени очистки	4,5
7	Тaq-полимераза	0,5
Итого:		20

В результате апробации праймеров установили, что праймеры (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3' и (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3' являются высокочувствительными и специфичными к гену фосфолипазы С *CPA*. Праймеры оказались чувствительными при реакции со всеми тремя экспериментальными испытуемыми концентрациями (Рисунок 8), зонд 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G-3' BHQ1 с гасителем флуоресценции BHQ1 позволяет проводить детекцию результатов по протоколу исследования в программе анализатора ПЦР в реальном времени Roche LightCycler 96 (Швейцария).

Наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции, что говорит о содержании и обнаружении гена фосфолипазы С *CPA* в исследуемых пробах. В стрипе А7 использовали отрицательный контрольный образец выделения пробы, в стрипе В7 отрицательный контрольный образец реакции (Рисунок 9).

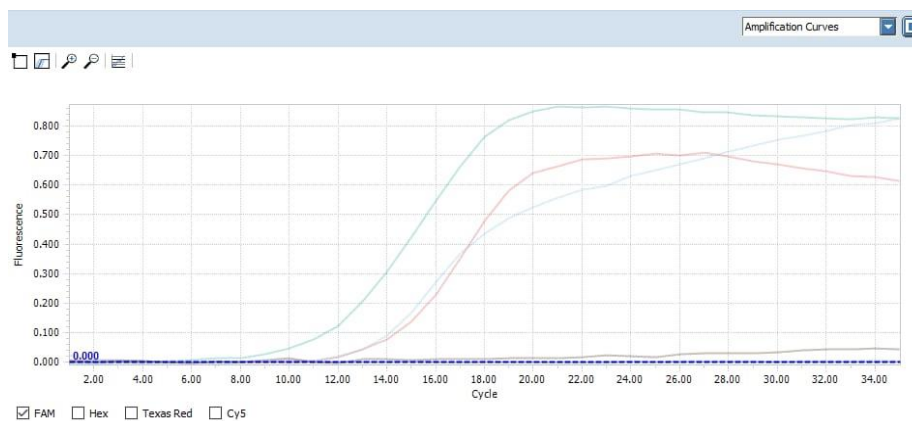


Рисунок 8 – Возрастающая экспонента проб с концентрациями №1, №2, №3 реагентов и ДНК *Clostridium perfringens*

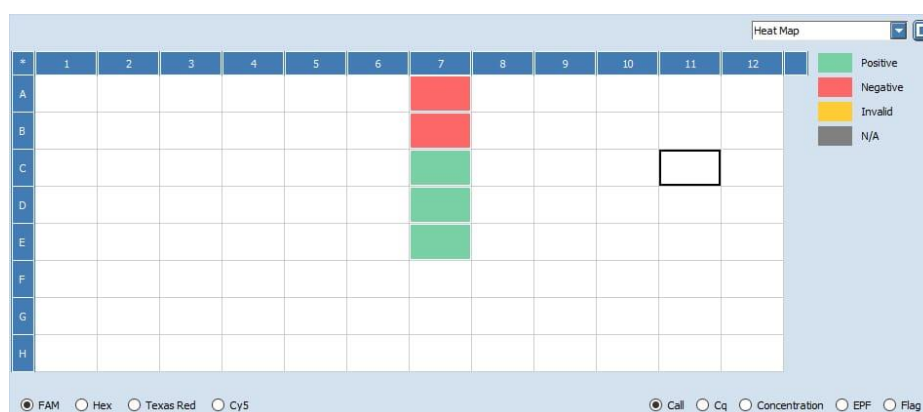


Рисунок 9 – Протокол исследования в программе Roche LightCycler 96

По результатам ПЦР в режиме реального времени установлен экспоненциальный рост флуоресценции в 65 пробах из 383 — пороговый цикл по каналу FAM регистрировали на $26,24 \pm 3,9$ цикле амплификации, что говорит о содержании гена фосфолипазы C *CPA* в исследуемых пробах.

2.2.7 Алгоритм диагностики диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*

Предлагаемый нами алгоритм лабораторной диагностики представляет собой пошаговую систему правил выполнения в определенной последовательности операций (Рисунок 10), обеспечивающих лабораторную диагностику, а именно:

1. Отбор проб проводить с учетом общих правил ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» и методических указаний по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований, используя Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных (патент на полезную модель RU 204004 U1 от 04.05.2021) с целью гигиенического отбора материала, снижения трудозатрат ветеринарного специалиста, исключения травматического фактора для животного.

2. Для повышения достоверности результатов рекомендуется проведение всех 3 методов (бактериологического, иммунологического и молекулярно-генетического) лабораторного исследования одновременно.

3. Бактериологический метод проводить в соответствии с действующими ГОСТами и нормативными актами, включать бактериоскопию, культивирование микроорганизмов на селективных и дифференциально-диагностических средах (Китта-Тароцци, Цейслера, глюкозо-кислотный агар, среда в комплекте к системе атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact для контроля роста анаэробов и др.) и биопробу.

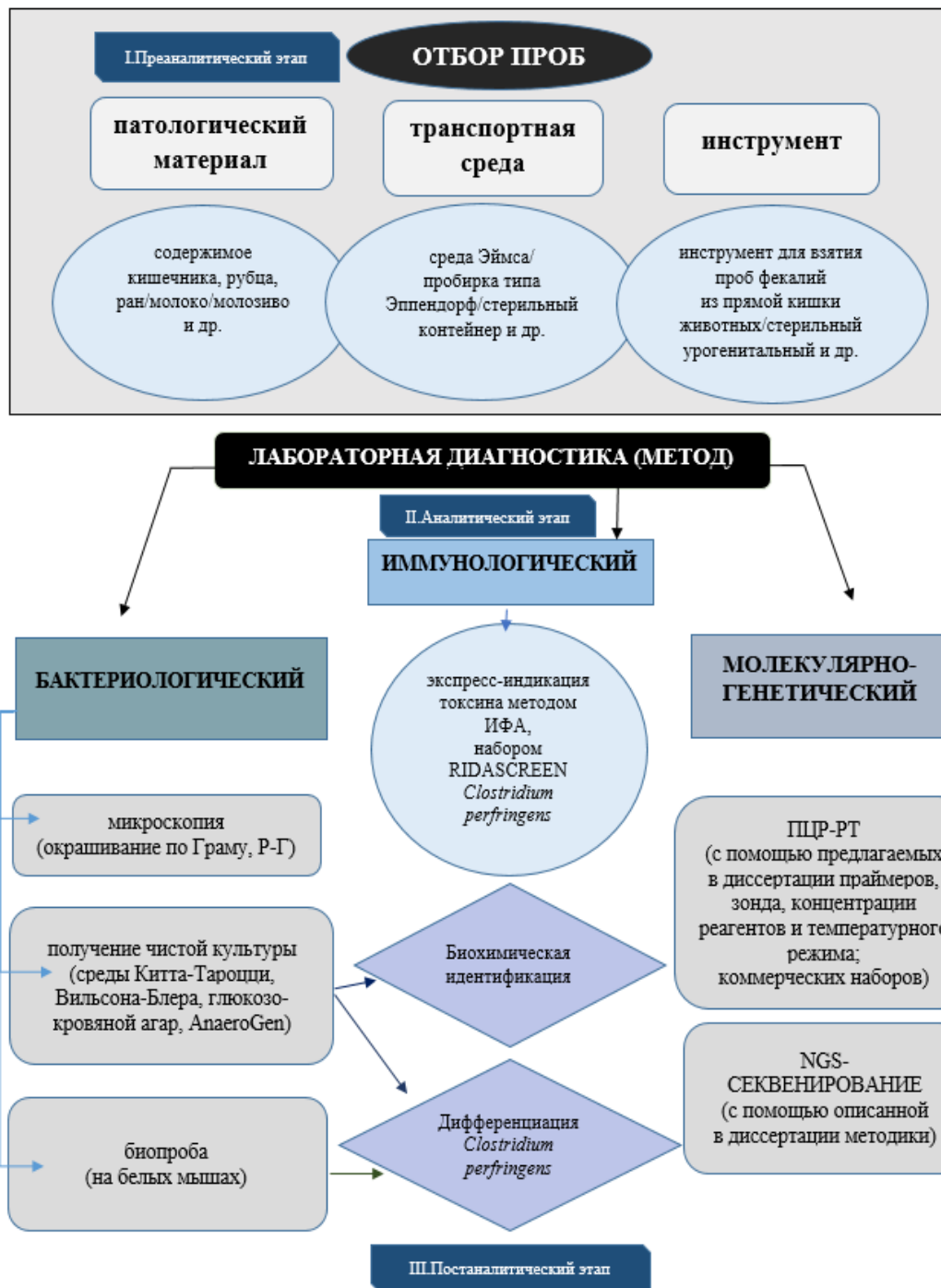


Рисунок 10 - Алгоритм диагностики диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*

4. Иммунологический метод, заключающийся в экспресс-индикации энтеротоксина *Clostridium perfringens* в биологическом материале проводить с помощью набора RIDASCREEN *Clostridium perfringens* Enterotoxin.

5. Молекулярно-генетический метод, заключающийся в постановке ПЦР в режиме реального времени, проводить с использованием предложенной тест-системы – ПЦР-смеси объемом 20 мкл, праймерами (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3' и (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3', модернизированным зондом – 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G-3' BHQ1.

6. Учет полученных результатов проводить строго в соответствии с инструкциями.

7. Диагноз ставить с учетом эпизоотических данных хозяйства, клинических признаков больных животных, патологоанатомических данных павших животных, полученных лабораторных данных.

Таким образом, по своей структуре и доказательности данный алгоритм диагностики определяет современные подходы к эффективной диагностике диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими *Clostridium perfringens*, что позволяет снизить количество случаев с неблагоприятным характером течения заболевания.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлены биологические свойства штаммов *Clostridium perfringens*, полученных от крупного рогатого скота с диарейным синдромом в Северо-Западном федеральном округе, которые характерны для данного микроорганизма вне зависимости от локализации. Проведена экспресс-индикация энтеротоксина с помощью иммуноферментного анализа, позволяющая дифференцировать токсинпродуцирующие штаммы *Clostridium perfringens* от не продуцирующих токсин штаммов.

2. Определен видовой состав микроорганизмов в патологическом материале от животных с диарейным синдромом методом секвенирования нового поколения: в содержимом рубца преимущественно обнаруживали клостридии семейства Ruminococcaceae, вида *Clostridium viride* (содержание достигало 2,6% у коров на откорме и 2,1% у коров дойного стада); семейства Lachnospiraceae, вида *Clostridium aminophilum* (содержание достигало до 0,5% у коров на откорме и 0,03% у коров дойного стада). Видовой состав микробиоты в период третьей лактации был выше, чем во вторую лактацию за счет патогенных и условно-патогенных бактерий: *Acinetobacter johnsonii* в 3,1 раза, Clostridiaceae в 1,4 раза, Enterobacteriaceae в 4,3 раза; были обнаружены представители семейств, отсутствовавшие во вторую (Burkholderiaceae, Listeriaceae, Mycobacteriaceae, Pasteurellaceae).

3. Праймеры для определения *Clostridium perfringens*, кодирующие ген фосфолипазы С α -токсина чувствительны и специфичны, зонд с модернизированным гасителем флуоресценции для обнаружения в материале искомой ДНК комплиментарен искомой последовательности-мишени;

соблюдение условий проведения реакции (концентрации реагентов и температурный режим) обуславливает воспроизводимость на 99,9%.

4. Алгоритм диагностики диарей, заключающийся в пошаговой идентификации возбудителя, позволяет увеличить процент выявления токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens* в материале от крупного рогатого скота.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Основные научные положения работы и ее результаты рекомендуется использовать на современных предприятиях по содержанию крупного рогатого скота, в работе ветеринарных специалистов, в учебном процессе для студентов, аспирантов, научных работников, а также на курсах повышения квалификации и при профессиональной переподготовке кадрового состава зоотехнического и ветеринарного профиля, в научно-испытательных лабораториях.

Методические рекомендации «Алгоритм проведения клинико-лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*», утвержденные Методическим советом ФГБОУ ВО СПбГУВМ 01 февраля 2023 года (протокол №1), рекомендуются для специалистов в области лабораторной диагностики.

Практикующим ветеринарным врачам и специалистам хозяйств для оптимального по зооигиеническим и микробиологическим параметрам отбора проб из прямой кишки крупного рогатого скота предлагается к применению патент на полезную модель «Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных» (RU 204004 U1 от 04.05.2021).

5. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

На основании вышеизложенного можно выделить следующие перспективы дальнейшей разработки темы:

- разработка и изучение молекулярно-генетических методов диагностики токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens* и бактерий кишечной группы для мультиплексной ПЦР, которые позволят повысить экономическую эффективность диагностики, лечения и профилактики анаэробных инфекций;

- изучение распространения других штаммов *Clostridium perfringens*, способных продуцировать токсины на территории Северо-Западного федерального округа;

- определение механизмов антибактериальной резистентности *Clostridium perfringens*;

- создание питательных сред для культивирования анаэробных микроорганизмов, не требующих специальных условий хранения и обладающих высокой устойчивостью и сохранением питательного субстрата в условиях лаборатории.

6. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах согласно перечню ВАК Российской Федерации:

1. Моисеева, К. А. Повышение сохранности поголовья цыплят-бройлеров при применении комплекса дополнительного питания "Пробиоцид®-Ультра" в условиях заражения *Clostridium perfringens* / Н. В. Тарлавин, В. В. Веретенников, Э. Д. Джавадов, К. А. Моисеева [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 4. – С. 24-28. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2021.4.24.

2. Моисеева, К. А. Разнообразие форм клостридий в рубцовом содержимом дойных коров и коров на откорме / К. А. Моисеева, Н. В. Тарлавин, В. В. Веретенников [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 1. – С. 205-208. – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.1.205.

3. Как защитить птицу от клостридиоза? / Е. А. Ёылдырым, Г. Ю. Лаптев, Н. И. Новикова, К. А. Моисеева [и др.] // Птицеводство. – 2021. – № 12. – С. 35-38.

4. Моисеева, К. А. Идентификация изолятов *Clostridium perfringens* и *Fusobacterium necrophorum* / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин, М. Р. Попова // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2023. – № 2. – С. 42-45. – DOI 10.52419/issn2782-6252.2023.2.42.

5. Моисеева, К. А. Разработка и апробация тест-системы для полимеразной цепной реакции с целью выявления альфа-токсина *Clostridium Perfringens* / К. А. Моисеева // Международный вестник ветеринарии. – 2023. – № 2. – С. 48-54. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2023.2.48.

Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:

1. Моисеева, К. А. Технология идентификации штаммов *Clostridium perfringens*, продуцирующих энтеротоксин / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин, А. С. Кветная // Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны : Материалы X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной году науки и технологий, Санкт-Петербург, 23–24 ноября 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 243-244.

2. Моисеева, К. А. Идентификация изолятов *Clostridium perfringens* с использованием бактериологического и молекулярно генетического методов / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин, С. А. Макавчик // Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии в науке и образовании : материалы международной научно-практической конференции, Рязань, 25–26 мая 2022 года. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2022. – С. 96-99.

3. Моисеева К. А., Сухинин А. А. Роль токсинов *Clostridium perfringens* в развитии инфекций человека и животных // The XIV International Science Conference «Current issues of modern science and practice», Rome, Italy May 17 – 19, 2021. – С.219-221.

4. Моисеева, К. А. ПЦР-диагностика штаммов *Clostridium perfringens* в исследуемом материале крупного рогатого скота / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин // Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны : материалы XI международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Санкт-Петербург, 24–25 ноября 2022 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2022. – С. 275-276.

5. Моисеева К. А. Цитопатогенное действие энтеротоксинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens* у крупного рогатого скота / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин, А. С. Кветная [и др.] // Экономически и социально значимые инфекции сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы : материалы Международной научно-практической конференции / Под. общ. ред. Л.К. Киша, А.Н. Панина. — М.: Издательство «Сельскохозяйственные технологии», 2022. – С. 166-175.

6. Моисеева К. А. Методика подбора и оптимизации праймеров для типизации А-токсина *Clostridium perfringens* / К.А. Моисеева, М.Р.Попова //Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики : материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова / редкол.: Л.Ю. Карпенко, А.А. Бахта, А.И. Козицына [и др.]; МСХ РФ, СПбГУВМ. – Санкт-Петербург, 2023. – С. 211-213.

7. Моисеева, К. А. Современные методы проведения лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин, А. С. Кветная // Микробиология военной медицины и здравоохранению. Современные технологии: наука, практика, инновации : Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня основания кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 11–12 мая 2023 года / Под редакцией Б.Ю. Гумилевского. – Санкт-Петербург: Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова, 2023. – С. 111-114.

Статьи, опубликованные в журналах, включенных в международные базы цитирования Scopus:

1. Comparison of colostrum microflora in second and third lactation in Holstein cows / A. Belikova, K. Moiseeva, N. Tarlavin [et al.] // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2022. – Vol. 57. – No S1. – P. 120. – DOI 10.1111/rda.14052.

Патенты на полезную модель:

1. Патент на полезную модель № 204004 U1 Российская Федерация, МПК А61D 7/00. Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных: № 2020136875: заявл. 09.11.2020: опубл. 04.05.2021 / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин, Е. И. Приходько [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины.