

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

Моисеева Карина Абдукахоровна

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

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Сухинин Александр Александрович

Санкт-Петербург, 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	11
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Биологические свойства и эпизоотологические сведения о штаммах <i>Clostridium perfringens</i>	11
1.2 Антигенная структура и факторы патогенности <i>Clostridium perfringens</i>	16
1.3 Клинические признаки и патогенез при энтеротоксемии крупного рогатого скота, вызванной токсинпродуцирующими штаммами <i>Clostridium perfringens</i>	23
1.4 Методы лабораторной диагностики диарей, вызванных штаммами <i>Clostridium perfringens</i> в биологическом материале.....	25
1.5 Методы профилактики и лечения болезней, вызванных <i>Clostridium perfringens</i>	30
1.6 Детекция генов <i>Clostridium perfringens</i> методом ПЦР.....	34
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1 Материалы и методы исследований.....	39
2.1.1 Отбор проб и приготовление мазков для бактериоскопии	40
2.1.2 Бактериологический метод идентификации <i>Clostridium perfringens</i>	43
2.1.3 Экспресс-индикация энтеротоксина <i>Clostridium perfringens</i> в биологическом материале (в содержимом прямой кишки).....	45
2.1.4 Определение наличия <i>Clostridium perfringens</i> методом ПЦР в режиме реального времени.....	46
2.1.5 Метагеномный анализ микробиома содержимого рубца и молозива ...	48
2.1.6 Разработка праймеров для детекции генов <i>CPA</i> в биологическом материале	51
2.2 Результаты исследований.....	56
2.2.1 Оптимизация отбора проб с применением инструмента для взятия проб фекалий из прямой кишки животных	56
2.2.2 Идентификация выделенных изолятов <i>Clostridium perfringens</i> бактериологическим методом.....	58
2.2.3 Индикация энтеротоксина <i>Clostridium perfringens</i> иммунологическим методом	68
2.2.4 Результаты детекции генов <i>Clostridium perfringens</i> методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....	69

2.2.5 Анализ микробиома содержимого рубца и молозива с помощью секвенирования нового поколения	70
2.2.6 Результаты разработки и апробации праймеров для детекции гена <i>CPA</i> в биологическом материале	74
2.2.7 Алгоритм диагностики диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами <i>Clostridium perfringens</i>	78
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	82
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	96
РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	97
БЛАГОДАРНОСТИ	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	100
ПРИЛОЖЕНИЯ	128

ВВЕДЕНИЕ

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 [4, 28, 83].

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 [9, 30, 39, 57, 71, 97]. Возбудитель содержится в биологических жидкостях животных, почве, воздухе, воде, мясе животных [69]. 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 [79]. А-токсин *Clostridium perfringens* повреждает фосфолипидные мембраны, из-за чего его считают одним из сильнодействующих ядов [204].

Патологический процесс обуславливается комплексным действием токсинов и ферментов *Clostridium perfringens*, ядовитыми продуктами распада бактерий и клеток макроорганизма [61, 83]. Экономический ущерб обусловлен летальностью, снижением количества и качества молочной и мясной продукции. Смертность молодняка достигает до 25,0 % [35]. 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 [93, 134]. В настоящее время недостаточно освещена методология диагностики диарей, вызванная токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*, что относится к актуальным и трудновыполнимым задачам

ветеринарной медицины, а продукция скотоводства может быть источником инфекции для людей [42].

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 [88]. 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) [66].

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 *CPA*, 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: обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, заключение, практические предложения, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов, 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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологические свойства и эпизоотологические сведения о штаммах *Clostridium perfringens*

«*Clostridium perfringens* - грамположительная, спорообразующая, анаэробная палочковидная бактерия, ранее известная как *Bacillus aerogenes capsulatus*, *Bacillus perfringens*, *Bacillus welchii*, *Clostridium welchii*», как сообщают Kiu R., и Hall L.J. (2018), Р. Беркли и др. (1997) [42, 63, 145]. По сведениям Терентьевой Т.Е., Гловой Т.И., Котеневой С.В. и др. (2016), Uzal, F. A., Navarro, M. A., Li, J. и др. (2018), «*Clostridium perfringens* распространена повсеместно в окружающей среде: в почве, продуктах питания, сточных водах, материале гниения растительных или животных продуктов и кишечнике условно здоровых людей, животных и птиц» [42, 91, 204].

Бактерия *Clostridium perfringens* часто приводит к «...анаэробной энтеротоксемии - острой токсикоинфекции, характеризующейся расстройством деятельности пищеварительного тракта, диареей, повышенной температурой тела, общей интоксикацией организма, поражением почек и нервными явлениями» [39] «...у людей, крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, свиней и других животных, в том числе птицы» [32, 34, 42, 58, 74, 110].

Как утверждают Rood J. Adams V., Lacey J., и др. (2018), *Clostridium perfringens* вызывает множество различных гистотоксических и энтеротоксических заболеваний у людей и животных в результате своей способности продуцировать сильнодействующие белковые токсины, многие из которых являются внеклеточными [185]. «Вирулентность *Clostridium perfringens* в большей степени объясняется возможностью продуцировать более 20 различных токсинов и факторы патогенности, а именно протеиназы, лецитиназу, гиалуронидазу, коллагеназу и другие...» [42, 146]. Штаммы *Clostridium perfringens* распространены

в почве, растительности, пресной воде, мясе животных и птиц, кишечнике животных, экскрементах, морских отложениях [50, 59, 99, 120, 189].

По информации ФБУ здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве», «...*Clostridium perfringens* при заражении человека способна вызывать, наряду с пищевым отравлением, некротический энтерит, сопровождающийся омертвением тканей тонкого кишечника и смертью больных более, чем в 30% случаев» [72].

Впервые бактерия была выделена и идентифицирована в 1891 году Уильямом Х. Уэлчем при вскрытии 38-летнего мужчины, у которого в инфицированных кровеносных сосудах были обнаружены пузырьки газа. Эта газообразующая черта характеризует первоначальное название *Bacillus aerogenes capsulatus, aerogenes* буквально означает «производящий воздух» на латыни, позже была связана с симптомами газовой гангрены, наблюдавшимися у британских и французских солдат, по сведениям Welch W.H. и Nuttall G.H.F (1891) [212].

Действующая схема классификации изолятов была завершена в 1960-х годах и основана на их способности продуцировать комбинацию четырех типизирующих токсинов – *CPA, CPE, ETX* и *ITX* - для разделения штаммов *Clostridium perfringens* на токсинотипы от А до Е. Однако эта схема в настоящее время устарела, как сообщают Лобзин Ю.В., Кветная А.С., Скрипченко Н.В. и др. (2021), поскольку она не принимает во внимание открытие других токсинов: *Clostridium perfringens* типа F состоит из изолятов, которые продуцируют *CPE* [42]. Штаммы типа F будут включать штаммы, ответственные за пищевое отравление человека, опосредованное *Clostridium perfringens*, и диарею, связанную с антибиотиками. *Clostridium perfringens* типа G включает изоляты, которые продуцируют токсин *NETB* и вызывают некротический энтерит у кур [58, 59, 100, 112, 182].

Clostridium perfringens исторически, по исследованиям Awad M.M., Johanesen P.A. и др. (2014), подразделялся на 5 токсинотипов (А, В, С, D и Е) на основании его способности кодировать 4 типизирующих токсина: *CPA, CPB, ETX* и йота *ITX* [101]. Однако недавно к этой системе типирования были добавлены два

дополнительных типа, включая *Clostridium perfringens* типа F и G. Как сообщают Ohtani K., Shimizu T. (2015), с 1970-х годов было высказано предположение, что у *Clostridium perfringens* существует специфический регулирующий механизм производства токсинов [176].

Лобзин Ю. В., Кветная А.С., Скрипченко Н.В. и др. (2021) утверждают, что анаэробная энтеротоксемия, вызванная *Clostridium perfringens* и их ассоциациями с бактериями и вирусами, относится к актуальной проблеме здравоохранения и ветеринарии. *Clostridium perfringens* вызывает газовую гангрену и пищевое отравление, а также вырабатывает внеклеточные ферменты и токсины, которые, как считается, действуют синергетически и способствуют развитию патологических и гистохимических процессов.

Способность продуцировать до 23 факторов патогенности *Clostridium perfringens* выражена белковыми токсинами, ферментами агрессии и другими факторами патогенности, исходя из исследований Лобзина Ю. В., Кветной А. С. и др., (2021), Fernandez-Miyakawa M.E. и Fisher D.J. (2007) [42, 123].

В 21 веке проблема анаэробной инфекции, вызванной *Clostridium perfringens* и их ассоциациями с другими бактериями, вирусами и грибами, относится к актуальной проблеме здравоохранения и ветеринарии.

Как утверждают Kiu R., и Hall L.J. (2018), возбудитель *Clostridium perfringens* распространен повсеместно, включая почву, продукты питания, сточные воды, и как член микробного сообщества желудочно-кишечного тракта, т. е. микробиоты как больных, так и здоровых людей и животных [147]. Примечательно, что: «...возбудитель был связан с людьми на протяжении тысячелетий, о чем свидетельствует недавняя идентификация *Clostridium perfringens* с использованием технологии секвенирования следующего поколения (NGS) в мумифицированном желудочно-кишечном тракте неолитического «тирольского ледяного человека» возрастом более 5000 лет (также известного как как Ötzi), найденный в альпийском леднике в 1991 году» [146].

Бактерия *Clostridium perfringens*, являясь почвенной инфекцией, распространена повсеместно, что подтверждают результаты исследований Yadav

J.P., Kaur S., Dhaka P. (2022), и др. [95, 122, 214]. Общая распространенность *Clostridium perfringens* в Индии среди домашних животных с клиническими симптомами в анамнезе и среди здоровых животных составила 65,8% - 508 положительных из 772 исследованных и 42,8% - 493 положительных из 1152 исследованных соответственно. Возбудитель также был обнаружен у диких животных с клиническими проявлениями (75%), здоровых диких животных (35,4%) и содержащихся у промышленных условиях птиц (24,5%). Выявление *Clostridium perfringens* среди птиц, больных некротическим энтеритом среди здоровой птицы – 66,8%. Обнаружение патогена среди проб мяса, молока, рыбы, продуктов их переработки, и проб из окружающей среды показало распространенность 20,8% - 325 из 1562 исследуемых проб. Однако было обнаружено, что распространенность *Clostridium perfringens* среди людей с диареей в анамнезе и среди здоровых людей составляет 25% - у 70 пациентов из 280 исследуемых [214].

По исследованиям Komatsu H., Inui A., Sogo T., и др. (2012), в Японии *Clostridium perfringens* занимает пятое или шестое место среди возбудителей болезней пищевого происхождения [149].

Как утверждают Д.А. Васильев, А.А. Щербаков, Л.В. Карпунина и др. (2004), «...термоустойчивые споры серотипов В и D погибают при кипячении в течение 15-30 минут, а споры типов А и С более устойчивы и выживают при кипячении и даже автоклавировании в течение 1-6 часов [3, 8]. Чаще всего способность к спорообразованию происходит в почве, кишечнике, а *in vitro* споры можно получить на щелочных средах, богатых белком и не содержащих утилизируемых углеводов. Спорообразование стимулирует прогревание при 75°C в течение 10-15 минут» [3].

По результатам исследований И. В. Пилипенко (2015), инфекционная доза — более 10⁸ вегетативных клеток [44]. Значительно распространенные повсеместно бактерии вида *Clostridium perfringens* занимают одно из первых мест среди рода *Clostridium*: из проб почвы их выделяют в 90—100 % случаев. Возбудитель выявляется в пыли, воздухе помещений, инвентаре для животных, подстилке. В

воде штаммы *Clostridium perfringens* встречаются редко, обнаружение свидетельствует о включении в воду фекалий и почвы [69]. Считается, что по крайней мере, 7 % пищевых отравлений связаны с заражением пищевых продуктов *Clostridium perfringens*, как сообщают Пилипенко И. В. (2015), Персианова, И. П. (2010), McClane, В. А. (2001) и др. [68, 69, 89, 166].

По результатам исследования Н. В. Литусова (2017): «...кlostридии являются факультативными или облигатными анаэробами: оптимальной для роста является температура 35-37°C, pH 7,2-7,4. На плотных питательных средах формируют колонии S-формы с ровным краем и гладкой поверхностью или R-формы с неровным краем и шероховатой поверхностью, в глубине агар колонии напоминают комочки ваты или зерна чечевицы. На кровяном агаре кlostридии образуют колонии, окруженные зоной полного или частичного гемолиза» [44].

«На среде Вильсона-Блера в процессе роста *Clostridium perfringens* сернокислый натрий восстанавливается с образованием сернистого железа, тем самым образуя черные колонии и газ. В среде Китта-Тароцци рост кlostридий сопровождается помутнением среды и активным газообразованием. В молоке рост кlostридий сопровождается створаживанием молока и образованием губкообразного сгустка – «штормовая реакция». На желточном агаре в результате разложения лецитина лецитиназой вокруг колоний наблюдается зона опалесценции. По сахаролитической и протеолитической активности разные виды кlostридий различаются друг от друга. Наиболее характерным признаком для них является способность вызывать масляно-кислое брожение и анаэробный распад углеводов с образованием масляной кислоты и газов» [14, 41, 55, 58, 78].

Терентьева Т.Е., Глотова Т.И., Котенева С.В., и др. (2016) установили, культивирование бактерий *Clostridium septicum* и *Clostridium perfringens* на тиогликолевой среде сопровождалось равномерным, разной степени выраженности помутнением и обильным выделением газа, последующим ее просветлением через 24-48 часа [91].

1.2 Антигенная структура и факторы патогенности *Clostridium perfringens*

Литературные данные свидетельствуют о большом разнообразии клинических форм болезней, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* у людей, животных и птиц [7, 44, 45, 58, 83, 90, 103, 105, 107, 113, 115, 116, 125, 154, 156, 158]. Патогенность возбудителя определяется совокупностью факторов – штамма бактерии, вырабатываемого ей токсина, способности образовывать капсулу, общего иммунного статуса животного, комплекса зоогигиенических, профилактических и лечебных мероприятий.

Цитопатогенное действие на клетки кишечника животных обусловлено токсином, контролируемым как хромосомным, так и плазмидным генами [133, 162]. Дальнейший интерес к исследованиям заключается в установлении факторов, условий и причин, индуцирующих процесс токсинообразования *Clostridium perfringens* в организме.

Полный анализ генома исследователями Myers G., Rasko D. (2006), Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H. (2002), показывает, что у *Clostridium perfringens* отсутствуют многие гены, необходимые для биосинтеза аминокислот [171, 194]. Чтобы получить необходимые питательные вещества в инфекционных условиях, *Clostridium perfringens* должны выделять токсины и ферменты, которые разрушают макромолекулы в организме хозяина, что имеет решающее значение для выживания бактерий в организме хозяина. Необходима глобальная система регуляции экспрессии генов кодирующих токсинов, чтобы управлять инфекционным процессом и быстро и эффективно получать питательные вещества из ткани хозяина – человека, крупного рогатого скота, птицы и др.

Исследования Ohtani K. и Shimizu T. в 2015 году показали, что экспрессия гена токсина регулируется двухкомпонентной регуляторной системой и каскадом регуляторных РНК «VirR/VirS-VR-РНК» [176]. Система VirR/VirS первоначально была обнаружена в штамме типа А, затем авторы убедились, что она также важна

для регуляции гена токсина в других типах штаммов. Два типа межклеточной передачи сигналов, а именно система и передача сигналов AI-2 также важны для регуляции генов токсинов. Несколько регуляторных систем, независимых от системы VirR/VirS, включая *virX*, орфанную гистидинкиназу *ReeS* и регулятор орфанного ответа *RevR*, участвуют в регуляции генов токсинов. Кроме того, экспрессия генов токсинов активируется после контакта с клетками Caco-2. *Clostridium perfringens* имеет сложную регуляторную сеть для экспрессии гена токсина, поэтому координация экспрессии гена токсина важна для запуска инфекционного процесса [159, 176, 183].

Как утверждают Uzal, F. A., Navarro, M. A., Li, J. и др. (2018), отдельные штаммы каждого токсинотипа могут также продуцировать перфринголизин O, бета2-токсин (*CPB2*) и другие цитотоксины [204].

Бактерии регулируют экспрессию генов в ответ на плотность популяции клеток. Это явление известно как чувство кворума, как утверждают Fuqua W., Winans S. и Greenberg E. (1994) и др. [128]. Бактерии производят и выделяют сигнальные молекулы - аутоиндукторы, концентрация которых увеличивается по мере роста бактерий. Если концентрация аутоиндуктора достигает пороговой концентрации, бактерии обнаруживают сигнал, что запускает экспрессию гена.

По результатам исследований Kiu R. и Hall L.J. (2018), *Clostridium perfringens* представляет собой быстрорастущий патоген, который, как известно, выделяет более 20 вирулентных токсинов, чаще всего связан с кишечными заболеваниями как у животных, так и у людей на протяжении всего прошлого века. Последние достижения в области геномного анализа и экспериментальных систем позволяют своевременно повторно диагностировать этот важный патоген для эпидемиологии и эпизоотологии, включая антимикробные потенциалы и секретируемые токсины этого кишечного патогена [139, 148]. Важным вопросом по мнению авторов является биологическая роль в патогенезе нескольких важных кишечных заболеваний, связанных с человеком и животными, включая преждевременный некротический энтероколит [146, 147].

Генотипирование изолятов *Clostridium perfringens* в исследованиях Yadav J.P., Kaur S., Dhaka P. (2022) показало, что токсин типа А оказался наиболее распространенным генотипом [214]. Наряду с геном *CPA*, *CPB*, *ETX*, *ITX*, *CPE*, *CPB2* и токсины *NETB* также были обнаружены в различных комбинациях.

По исследованиям Prescott J.F., Menzies P.I., Fraser R.S. (2016), Uzal F. A., Navarro M. A., Li J. и соавт., (2018) и др., *Clostridium perfringens* типа А, ассоциированный с кишечными синдромами, а именно энтероколитом у свиней и лошадей, энтеротоксемией и абомазитом у крупного рогатого скота и овец продуцируют α -токсин и энтеротоксин [138, 141, 142, 143, 181, 202, 204]. Не продуцирующие токсин штаммы часто встречаются в окружающей среде, кишечнике клинически здоровых людей и животных, по мнению Uzal F.A., Songer J.G. (2016) [205]. По результатам исследований авторов, цитопатогенное действие α -токсина заключается в том, что он повреждает фосфолипидные мембраны, вызывая нарушение обменных процессов клетки, токсемию [108, 189, 204]. «Очаговые некрозы тонкого кишечника ухудшают усвояемость корма», по результатам исследования Новиковой О.Б. (2014) и др. [24, 58, 59, 192, 202, 203].

«Энтеротоксин *Clostridium perfringens* типа А (*CPE*) — самый распространенный токсин среди токсинотипов. *CPE* является порообразующим токсином, контролируемым хромосомным и плазмидным генами (*CPE*), ответственным за развитие различных желудочно-кишечных заболеваний, связанных с пищевыми и непищевыми факторами» [42]. По данным Awad M.M., Johanesen P.A., Carter G.P. и др. (2014), Blackwell T.E., Butler D.G., Prescott J.F. и др. (1991), Busch K., Suchodolski J.S., Kühner, K.A. и др. (2015), «...ген *CPE* находится в хромосоме у большинства штаммов *Clostridium perfringens* типа А, вызывающих пищевые отравления: продукция и действия *CPE* контролируются в основном геном *CPE*, расположенным в хромосоме [75, 106, 110]. По результатам исследования Ohtani K., Shimizu T. (2016), известно, что *CPE* вызывает пищевые отравления и гастроэнтерит непищевого происхождения» [177]. Исследователями сообщается, что до 70% случаев пищевых отравлений вызываются штаммами *Clostridium perfringens* типа А [177, 182, 187]. Brynestad S. и Granum P.E. (2002)

сообщают, что пищевое отравление *Clostridium perfringens* типа А является одним из наиболее распространенных в промышленно развитых странах у людей [108].

Sayeed S., Uzal F.A., Fisher D.J. и др (2008), Uzal F.A., Songer J.G. (2016), Uzal F.A., McClane B.A. (2011) утверждают, что *Clostridium perfringens* типа В кодирует *CPB* и *ETX* токсины, которые рассматривают два основных фактора вирулентности штаммов типа В. *CPB* - это олигомеризационный, ~ 35 кДа пор, образующий токсин, который вызывает гибель и лизис клеток [191, 206, 208]. Поры, образованные *CPB* в клеточной мембране, позволяют проникнуть Ca^{2+} , Na^{+} и Cl^{-} в ячейки и оттоку K^{+} . Следствием этих ионных обменов является отек клеток, что приводит к некрозу, по результатам исследований Nagahama M., Shibutani M., Seike S. и др. (2013) [173]. *ETX* - это токсин ~ 33 кДа, который связывается с эндотелиальными клетками, олигодендроцитами, как сообщает Poroff M. R. (2011) [180]. Токсин на клеточном биохимическом уровне приводит к вводу Cl^{-} и Na^{+} в клетки и потере внутриклеточного K^{+} [166, 180].

Как сообщают Uzal F.A., Songer J.G. (2008), клостридиальная инфекция типа В чаще встречается у мелкого рогатого скота, где она вызывает некрогеморрагический энтерит и очаговый симметричный некроз на Ближнем Востоке, в Европе и Южной Африке [205]. Как утверждают Fernandez-Miyakawa M.E., Fisher D.J., Poon R. и др. (2007), патогенез этих инфекций не был полностью выяснен, хотя считается, что поражения кишечника продуцируются *CPB*, а поражения мозга продуцируются *ETX* [123]. Для активации *ETX* необходима активация протеаз, в то время как *CPB* чувствителен к действию этих ферментов. Из - за этого предполагается, что в разных клинических случаях преобладает действие *ETX* или *CPB* и, в зависимости от того, какие из этих токсинов оказывают свое основное действие, клинические признаки и поражения могут быть разными, по результатам исследований Poroff, M. R. (2011) [180].

Clostridium perfringens типа С продуцируют *CPA*, *CPB*, *CPB2* и *CPE* токсины, как сообщают Sayeed S., Uzal F.A., Fisher D.J. и др. (2008) [191]. Токсемия, ассоциированная с *Clostridium perfringens* типа С у людей и животных, характеризуется некротизирующим, некрогеморрагическим энтеритом и

энтероколитом. Заболевание чаще всего встречается у новорожденных телят, овец, свиней и птиц, по наблюдениям Diab S.S., Kinde H., Moore J. (2012) [117]. Большинство клинических признаков и болезней, ассоциированных *Clostridium perfringens* типа С является следствием действия *CPB* - основным фактором вирулентности токсинотипа. Как сообщают Diab S.S., Kinde H., Moore J. (2012) и Uzal F. A., Navarro M. A., Li J. (2018), *CPB* чрезвычайно чувствителен к трипсину и химотрипсину: новорожденные животные в среде, контаминированной *Clostridium perfringens* типа С, особенно подвержены риску заболевания [117, 204]. Считается, что эта предрасположенность связана с ингибирующим действием молозива на трипсин, за счет предотвращения протеолитического распада иммуноглобулина в первые дни жизни, что также защищает *CPB* [151, 160, 193]. На основании экспериментальных результатов Ma M., Gurjar A., Theoret J.R., и др. (2014) лабораторным методом биопробы на кроликах было доказано синергическое действие токсинов *CPB* а *CPE* при кишечных инфекциях [159].

По исследованиям McClane B.A., Uzal F.A., Miyakawa M.E. (2006), *Clostridium perfringens* типа D кодируют *CPA* и *ETX*, а отдельные изоляты также кодируют *CPE* и перфринголизин, вызывает энтеротоксемию у мелкого и крупного рогатого скота, после нарушения питательных элементов в рационе, а именно переизбытка быстро ферментируемых углеводов, комплексно с высокой паразитической инвазией, что подтверждают исследования Uzal F.A., Songer J.G. (2008) [167, 205]. При инфекциях типа D токсин *ETX* вырабатывается в кишечнике в виде прототоксина, который при контакте с трипсином и другими протеазами, включая хемотрипсин и карбоксипептидазы, теряет аминокислоты на С-конце и активируется, как сообщают Freedman J.C., Li J., Uzal F.A. (2014) [127]. При активации под воздействием определенных факторов *ETX* в кишечнике, токсин, попадая в кровь распространяется в паренхиматозные органы. Органы-мишени, а именно эндотелиальные клетки головного мозга, сердца, легких, почек обретают повышенную проницаемость, вызывая отек этих органов и накопление жидкости в организме [126, 159]. В головном мозге *ETX* также проникает через

гематоэнцефалический барьер и оказывает прямое действие на нейроны и олигодендроциты, как сообщают Ma M., Gurjar A., Theoret J.R. (2014) [159].

Clostridium perfringens типа E кодирует в основном CPA и ETX отдельные штаммы - CPE или CPE2. ETX представляет собой бинарный токсин, который включает ферментный компонент (Ia) и связывающий компонент (Ib). Nagahama M., Shibutani. M, Seike. S. (2013), утверждают, что так называемый липолиз-стимулируемый липопротеиновый рецептор (LSR) является рецептором для Ib: после связывания с этим рецептором Ib встраиваются в клеточную мембрану и образуют функциональные каналы, что обеспечивает эндоцитоз [173]. Richard J.F, Mainguay G., Gibert M. и др. (2002) сообщают, что Ia приводит к АДФ-рибозилированию актина, вызывая деполимеризацию актина, увеличение количества мономеров G-актина, что приводит к дезорганизации межклеточных соединений и морфологическим изменениям клеток, митохондриальной дисфункции, и как следствие некрозу [183].

Fernandez-Miyakawa M.E., Fisher D.J., Poon R. и др. (2007) и Uzal F. A., Navarro M. A., Li J. (2018) сообщают, что *Clostridium perfringens* типа F характеризуются патогенетическим действием токсинов гены токсинов CPA и CPE при спорообразовании [123, 204]. Заболевания, вызванные этими штаммами, известны как токсигенные инфекции, связанные с пищевыми продуктами у животных и людей, что в своих публикациях показывают Busch K., Suchodolski J.S., Kühner K.A. (2015) [110]. По данным McClane B.A., Uzal F.A., Miyakawa M.E. (2006), CPE - положительные штаммы типа F составляют от 3 до 15% желудочно-кишечных заболеваний непищевого происхождения у людей [167]. По информации Smedley 3rd J.G., Uzal F.A., McClane B.A. (2007), CPE представляет собой монополипептид длиной ~35 кДа, состоящий из 319 аминокислот, который высвобождается из кишечного тракта во время спорообразования [131, 138, 195]. CPE связывается со специфическими рецепторами клаудина в эпителии кишечника, начиная с кончиков ворсинок тонкой кишки. После образования комплекса CN-1 он встраивается в цитоплазматическую клетку и образует пору, которая увеличивает проницаемость мембраны. Это в свою очередь, следует

приток Ca^{2+} , который затем активирует пути апоптотической или онкотической смерти [173]. Повреждение клеток, возникающее при начальной поре, обнажает базолатеральную клеточную поверхность клеток, что приводит к образованию *CPE* ~ 600 кДа. *CPE* -индуцированная гибель эпителиальных клеток способствует жидкостным и транспортным изменениям с конечным результатом накопления жидкости в кишечнике, что приводит к диарее [204, 211]. *In vitro* низкие дозы *CPE* вызывают апоптоз, а высокие дозы вызывают онкоз [176, 194, 211].

Бактерии *Clostridium perfringens* типа G определены недавно. Штаммы типа G характеризуются продукцией токсинов *CPA* и *NETB*. Штаммы типа G вызывает некротический энтерит чаще домашней птицы по всему миру, животных и людей. β -порообразующий токсин *NETB* является основным фактором вирулентности для типа G [162, 180]. В естественных условиях наиболее частым предрасполагающим фактором является кишечная инфекция эймериями, а экспериментально заболевание можно спровоцировать при кормлении птиц высокобелковым рационом [44, 58, 109, 162].

Nakamura M, Kato A, Tanaka D, и др. (2004) сообщают о том, что штаммы *Clostridium perfringens*, связанные с пищевыми отравлениями, несут свой ген энтеротоксина *CPE*, на хромосоме, в то время как штаммы *Clostridium perfringens*, выделенные от болезней непещевого происхождения, а именно антибиотикоассоциированной и спорадической диарей, несут *CPE* на плазмиде [174].

Энтеротоксин, продуцируемый любым токсинотипом *Clostridium perfringens*, проявляет токсическую функцию в тонком кишечнике, вызывая деструкцию слизистой оболочки, характеризующуюся десквамацией эпителия, атрофией и некрозом ворсинок, по результатам исследований Лобзина Ю.В., Кветной А.С., Скрипченко Н.В. и др. (2021) и Uzal, F. A., Navarro, M. A., Li, J. (2018) и, что клинически у крупного рогатого скота проявляется угнетением, диареей, нарушениями работы органов и систем [42, 204].

По исследованиям Freedman J.C. (2014), штаммы *Clostridium perfringens* несут плазмиды, которые часто кодируют ассоциированные с вирулентностью

белки, включая токсины и противомикробные препараты [127]. Токсины, связанные с болезнью, в том числе *CPE*, *ETX*, *ITX*, *NETB*, *CPB2* и *BEC* были обнаружены на плазмидах *Clostridium perfringens*, как показывают исследования Kiu R., Caim S., Alexander S., и др. (2017) и Li J. (2013) [145]. Результаты исследований Wisniewski J.A. и Rood J.I. (2017) и J. I. Rood, V. Adams, J. Lacey (2018) доказывают, что горизонтальный перенос генов плазмид между штаммами происходит через локус конъюгации *tcp*, который существует в большинстве плазмид [145, 185].

Условия и факторы, вызывающие экспрессию генов широко распространенного токсина — энтеротоксина, весьма разнообразны. Это - конъюгативный процесс переноса генов энтеротоксина, процессы совместимости и несовместимости плазмид при существовании плазмид в одной клетке *Clostridium perfringens*, клональные процессы в хромосоме микроорганизма, диета, антибиотики и различные физические факторы [48, 111, 124, 159, 168, 179, 185, 216].

1.3 Клинические признаки и патогенез при энтеротоксемии крупного рогатого скота, вызванной токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*

Клинически клостридиозы могут проявляться повышением температуры, общим угнетением, гистотоксическими явлениями, нарушением функций желудочно-кишечного тракта, что связано алиментарным фактором передачи. Патогенез обусловлен пищевой токсикоинфекцией, а именно энтеритом, токсемией, нарушением обменных процессов в клетке, оксидативным стрессом и др. [5, 12, 31, 36, 40, 42, 98, 101, 147, 157, 207].

«Бактерии *Clostridium perfringens* необходимо не только попасть в пищевой продукт, но еще и размножиться в нем в большом количестве для достижения заражающей дозы ($>10^5$ микробных клеток в 1 г пищевого продукта), выделив термостабильный экзотоксин, вызывающий болезнь» [72]. Важнейшие

патогенетические явления представляют септицемию, токсемию и иные общие инфекционно-токсические процессы за счет бактериальных токсинов, распространяющихся через циркулирующие системы [4, 28, 97].

В своих исследованиях Макарова В. В., Петрова А. К., Васильева Д. А. (2018) утверждают, что кроме местных повреждений, воспалительные процессы способны вызывать общие, системные патогенетические реакции на уровне всего организма, непосредственно распространяясь на окружающие ткани или вызывая дистанционные эффекты, которые могут развиваться за счет распространения возбудителя и генерализации инфекции либо иных факторов инфекционного процесса [45]. Токсикоинфекция, вызываемая *Clostridium perfringens*, клинически проявляется диареей с включениями крови, абдоминальными судорогами у молодняка, атонией рубца, коликами и др., что сопровождается высокой летальностью [39, 142].

При анаэробной энтеротоксемии с молниеносным и острым течением клинические признаки не успевают проявиться, возникает внезапно, животное погибает за несколько часов [6, 10, 182]. Основные клинические признаки вызваны системным распространением этих токсинов в крови и тканях. Энтеротоксемия может быть острой или острой, и внезапная смерть часто сообщается у быстро растущего, клинически здорового крупного рогатого скота [152]. Клиническая картина «...характеризуется общим токсикозом организма с признаками поражения нервной системы и желудочно-кишечного тракта, стационарностью, значительным охватом поголовья и высокой летальностью (до 60-100%)» [42, 94]. Болезнь сопровождается такими признаками, как вздутие рубца, смещение сычуга, снижение перистальтики кишечника, отсутствие аппетита и общее угнетение [19, 71]. У стельных коров клостридиоз может вызвать замирание плода [28, 69, 197].

Russell W.R., Hoyles L., Flint H.J, и др. (2013) и Ussar S., Griffin N.W, Bezy O. (2015) доказали, что: «увеличение количества *Clostridium perfringens* приводит к поражению тканей кишечника, развитию воспаления и повышенной кишечной проницаемости, а потребление введения в рацион корма, богатого жирами так же приводит к увеличению протеолитических бактерий и снижению концентрации

короткоцепочечных жирных кислот, что способствует снижению моторики кишечника с замедлением кишечного транзита» [187, 203]. «Благодаря этому, бактерии класса Firmicutes извлекают больше энергии из питательных веществ с её последующим сохранением, что вносит дополнительный вклад в развитие жировых дистрофий...», по результатам исследования Ley R. E., Backhed F., Turnbaugh P.J. (2005) [153].

1.4 Методы лабораторной диагностики диарей, вызванных штаммами *Clostridium perfringens* в биологическом материале

На сегодняшний день существует множество методов лабораторной диагностики анаэробных инфекций, условно разделить которые можно на 3 группы: бактериологический, иммунологический и молекулярно-генетический [11, 43, 44]. При лабораторной диагностике *Clostridium perfringens* ветеринарные врачи руководствуются ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» [14]. «Исследуемым материалом при клостридиальной анаэробной инфекции служат пораженные и некротизированные ткани, взятые из раны на границе со здоровыми тканями, экссудат, гной, раневое отделяемое, кровь, содержимое прямой кишки, рубца, молоко и молозиво. От павших животных исследуют кусочки мышц, печени, селезенки; кровь из сердца, раневое отделяемое. При пищевых токсикоинфекциях исследуют рвотные массы, фекалии, кровь, продукты» [41, 62].

Главным образом, степень патогенности зависит от вырабатываемого палочкой *Clostridium perfringens* токсина. По мнению Козлова А. Д., Горбачева Н. С., Клименковой О. В. И др. (2017): «...определение токсинов, вырабатываемых конкретным штаммом *Clostridium perfringens* является важным для прогнозирования течения заболевания [35]. Типирование *Clostridium perfringens* является актуальной задачей для понимания эпизоотологического процесса и может быть полезным при разработке эффективных вакцин», по результатам исследований Капустина А. В. (2011) и Пименова Н.В. (2014) [29, 70].

Бактериологический метод нацелен на обнаружение морфологических и тинкториальных свойств бактерии. *Clostridium perfringens* - это грамположительные, крупные, размером от 0,8–1,5 до 4–8 мкм, полиморфные, неподвижные палочки, способные к токсино- и спорообразованию [7, 28, 41, 44, 48, 63, 108, 146, 181].

В качестве инструмента для диагностики токсигенного заболевания, связанного с *Clostridium perfringens*, исследователями Marks S.L., Rankin S.C., Burne V.A. и др. в 2011 году был предложен подсчет фекальных эндоспор в мазках, окрашенных по Райту или по Граму (≥ 3 спор в поле зрения при большом увеличении), но в нескольких исследованиях сообщалось: «...отсутствие связи между количеством фекальных эндоспор и наличием диареи или между количеством спор и обнаружением бактерий в пробах фекалий спорообразованию» [164].

Как утверждают Спиридонов А.Г. (2013), Д.А. Васильев, А.А. Щербаков, Л.В. Карпунина и др. (2004): «...споры *Clostridium perfringens* крупные, овальные, расположены центрально, у *Clostridium perfringens* типа А — субтерминально, клетка-спорангий практически не деформируется» [8, 85].

«Традиционно типирование *Clostridium perfringens* проводится методом нейтрализации токсинов с использованием антитоксических сывороток на лабораторных животных и методом ИФА, однако эти методы имеют ряд ограничений что приводит к необходимости альтернативных методов диагностики. Высокий уровень энтеротоксина *Clostridium perfringens* появляется только в момент споруляции, поэтому требуются особые условия культивирования. Использование молекулярно-генетических методов является более простым, быстрым и точным способом типирования *Clostridium perfringens*» [33, 84].

Эффективным методом дифференциальной диагностики смешанных инфекций, выделения чистой культуры для дальнейшего типирования *Clostridium perfringens* применяют бактериологический метод [41, 44, 55, 93, 136].

«Культуральный метод предусматривает посев исследуемого материала в жидкую питательную среду Китта-Тароцци для накопления бактерий с

последующим пересевом культуры на плотные среды - агар Цейсслера, сахарный кровяной агар, среда Вильсона-Блера. Посевы инкубируют в анаэроостате при температуре 37°C. Культуру идентифицируют по морфологическим и биохимическим свойствам» [41, 69, 91, 198].

«Биологический метод основан на реакции нейтрализации токсинов (фильтратов бульонных культур или центрифугатов исследуемого материала) специфическими антитоксическими сыворотками с последующим заражением белых мышей или морских свинок. Кроме результатов лабораторных исследований в диагностике клостридиальной анаэробной инфекции важное значение имеет характерная клиническая картина заболевания, общая интоксикация организма, рентгенологическое исследование» [8, 33, 41, 45, 82]. Биологический метод является альтернативным, при дифференциальной диагностике смешанных инфекций, например, при некробактериозе [170].

По исследованиям Sterne M. и Batty I. (1975), диагноз «энтеротоксемия» обычно основывается на анамнезе, клинических признаках и результатах патологоанатомических данных. Лабораторный анализ необходим для подтверждения присутствия основных летальных токсинов, продуцируемых *Clostridium perfringens*, такие как CPB и ETX: наиболее часто используемым тестом для обнаружения этих токсинов в клиническом материале является тест нейтрализации токсинов с последующим заражением белых мышей [198]. Однако этот анализ требует много времени, громоздок и неудобен, поскольку требует большого количества лабораторных животных и помещений. Как утверждают Kozaki, S., Dufrenne, J., Hagenars, A.M. и др. (1979) и Henderson (1984), биологический метод диагностики обладает такими недостатками, такими как изменчивость чувствительности животных, неспецифическая токсичность, вызываемая другими веществами, которые могут присутствовать в клиническом материале, особенно в содержимом кишечника [137, 150].

Из тестов *in vitro*, используемых для обнаружения *Clostridium perfringens* в кишечном содержимом бета и эпсилон-токсинов, применяется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) [84, 119, 120, 137, 211].

Использование тестов *in vitro* для обнаружения инфекционных агентов в биологическом материале в настоящее время популярно в клинических лабораториях: оценивается диагностическая применимость набора ELISA, объединяющего два двойных сэндвич-анализа. С помощью этих анализов Ahmed H. El Idrissi и Gilbert E. Ward (1992) исследовали пробы кишечника животных, внезапно умерших от энтеротоксемии [119]. Результаты сравнивали с общепринятыми лабораторными тестами, используемыми для диагностического подтверждения энтеротоксемий.

Спиридонов А.Г. в 2018 году разработал и испытал в производственных условиях иммуноферментную тест-систему для диагностики анаэробной энтеротоксемии животных и иммунологического мониторинга вакцинированного поголовья [84].

Сегодня существует множество коммерческих тест-систем для обнаружения токсинов клостридий в культурах клеток и биологических жидкостях (содержимое тонкой кишки, перитонеальная жидкость и т.п.) всех видов животных методом ИФА.

«Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале (пробе)» [64]. Существует несколько вариантов технологии ПЦР, а именно, в режиме реального времени, с обратной транскрипцией, гнездовая, асимметричная, метод молекулярных колоний, групп-специфическая, с быстрой амплификацией концов кДНК и другие. Моисеева К.А. (2022) утверждает, что: «...процедура подготовки материала состоит из лизиса микроорганизмов, обязательной очистки от посторонних примесей – ингибиторов амплификации, и экстракции ДНК» [63].

Метод обнаружения ДНК *Clostridium perfringens* методом ПЦР в реальном времени применяется в различных исследованиях, с использованием содержимого кишечника животных как исследуемый материал [16].

По исследованиям Miyamoto K., Li J., McClane B.A. (2012), успехи в понимании генетики энтеротоксигенных *Clostridium perfringens*, включая полногеномное секвенирование хромосомного штамма *CPE* и секвенирование нескольких крупных плазмид, несущих *CPE*, привели к разработке молекулярных подходов для более точного исследования изолятов, вызывающих желудочно-кишечные заболевания человека, и изолятов, присутствующих в окружающей среде [63, 169].

В результате исследований Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y. и др. (2012) пришли к выводу, что ПЦР в реальном времени является эффективным и чувствительным инструментом предполагаемого скрининга *Clostridium perfringens* в различных видах пищи, дополняя стандартные лабораторные методы [63, 114, 169]. Анализ ПЦР в реальном времени является вариантом обеспечения качества для выполнения стандартных диагностических тестов лабораторий, учитывая специфичность обнаружения и эффективность экономии времени.

Анализ методом дуплексной ПЦР с целью индикации генов кодирующих *CPE* в изолятах *Clostridium perfringens* и анализ методом мультиплекс-ПЦР для обнаружения генов, кодирующих токсины *Clostridium perfringens* проводили такие исследователи, как Оссипранди М.-К., Зербини Л. и Болдыревой Е.М. (2013). Авторы доказывают, что молекулярное генотипирование токсинов бактерий рода *Clostridium* послужит определяющим фактором для того, чтобы поставить окончательный диагноз. Исследователи утверждают, что именно благодаря типизации токсина можно в полной мере оценить эпидемиологическое и эпизоотическое значение распространения инфекции, особенно, в пробах для диагностики здоровых животных [63, 65, 169].

«Особенно активное развитие метод ПЦР получил благодаря международной программе «Геном человека». Были созданы современные лазерные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК)» [64]. «...это в свою очередь способствовало значительному росту информационных баз данных, содержащих последовательности ДНК биологических объектов» [64, 205].

Червякова Н.С. и Осин А.В. (2017) отмечают, что: «...в ряде случаев для правильной видовой идентификации требуется расширить перечень используемых субстратов с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 (Bio-Mérieux, Франция), позволяющего одновременно изучать более 60 различных биохимических свойств бактерий» [96].

1.5 Методы профилактики и лечения болезней, вызванных *Clostridium perfringens*

Спиридонов А.Г., Махмутов А.Ф., Спиридонов Г.Н., Хурамшина М.Т., Дуплева Л.Ш., Насертдинов Д.Д. (2022) утверждают, что: «...при разработке лечебно-профилактических мероприятий необходимо учитывать биологические свойства возбудителя болезни, в том числе его серотип». Лечение при анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота, вызванной токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* проводится комплексно [30, 39, 70]. Залогом эффективной терапии является своевременность лечения и мер по профилактике распространению инфекционных болезней. Одним из часто применяемых и эффективных методов при грамотном подходе лечения является антибиотикотерапия. Нередко используют антибактериальные препараты таких групп, как аминогликозиды, фторхинолоны, цефалоспорины, макролиды, пенициллины и тетрациклины [39, 83].

Исходя из анализа литературных данных, наибольшей эффективностью обладают антибактериальные препараты пенициллиновой группы: амоксиклав в форме болюсов, бициллин – 3, бициллин – 5, амоксициллин [2, 28, 29, 39, 43, 44, 60, 92, 140, 214]. Из группы цефалоспоринов применяют кобактан, группы фторхинолонов – 5% энроксил, группы амфениколов – левомецетин, группы макролидов – фармазин в сочетании с селеном.

По исследованиям Крамер Ю.Н. (2020) и Пименова Н. В. (2020), чувствительными культуры *Clostridium perfringens* оказались к антибактериальным препаратам групп цефалоспоринов (кобактан) и пенициллинов (амоксиклав).

«Суточные культуры *Clostridium perfringens* авторы тестировали на чувствительность к 16 антибактериальным препаратам групп: макролиды, аминогликозиды, фторхинолы, цефалоспорины, пенициллины (в том числе усиленные) и тетрациклины. Высокое антибактериальное действие на культуры *Clostridium perfringens* оказали препараты: кобактан (4-ое поколение цефалоспоринов) – 71,1 % чувствительных изолятов, амоксиклав (пенициллиновая группа, усиленная клавулоновой кислотой) – 56,1 %. Пенициллиновые β -лактамы проявили уровень чувствительности 43,6-50 %. К остальным антибиотикам групп макролидов, аминогликозидов, фторхинолов, цефалоспоринов, и тетрациклинов культуры преимущественно проявляли резистентность либо низкую чувствительность. Множественную антибиотикорезистентность к 3 и более группам Крамер Ю.Н. и Пименов Н.В. регистрировали у всех тестируемых патогенных штаммов» [39, 71].

По мнению Литусова Н.В. (2017) «...нейтрализацию клостридиальных токсинов проводят с помощью антитоксических сывороток против *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum*. Антибактериальная терапия предусматривает введение максимальных доз антибиотиков, чаще пенициллина, тетрациклина» [41].

Для поддержания гомеостаза микрофлоры желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота авторы рекомендуют также использовать смешанные культуры пропионовокислых бактерий с ацидофильной палочкой: «...ацидофильно-бульонную культуру, пропионово-ацидофильную бульонную культуру, ацидофильное молоко, сухой ацидофилин, ацидофильную простоквашу, пробиотики» [39]. Согласно ГОСТ Р 56139-2014, «к основным пробиотическим микроорганизмам относят бактерии родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, стрептококки вида *Streptococcus thermophilus*, бактерии рода *Lactococcus*...», в составе многокомпонентных препаратов и кормовых добавок - диалакт, биофлор, фармафлор, биолатик (Biolatic) G-500 [39, 43, 44, 70, 73, 90].

К опасным клостридиозам крупного рогатого скота стоит относить: эмфизематозный карбункул, вызванный *Clostridium chauvoei*, злокачественный

отек, вызванный чаще ассоциацией *Clostridium novyi* тип А, *Clostridium septicum*, и *Clostridium sordellii*, бациллярную гемоглобинурию крупного рогатого скота, вызванную бактерией *Clostridium novyi* тип D. Кроме того, к клостридиозам, сопровождающихся высокой летальностью, относят общие инфекции для животных и человека: столбняк, вызываемый штаммами *Clostridium tetani*, ботулизм, вызываемый бактериями *Clostridium botulinum*. Для крупного рогатого скота наибольшую опасность представляет анаэробная энтеротоксемия, вызванная бактериями видов *Clostridium perfringens* тип А, С, D, Е, браздзотоподобные инфекции крупного рогатого скота, вызываемые *Clostridium septicum*, *Clostridium oedematiens* [4, 28, 33, 41, 79]. Бактерии семейства Clostridiaceae – возбудители болезней, обуславливающие значительный экономический ущерб за счет выбраковки животных, повсеместного и быстрого распространения токсинпродуцирующих штаммов, значительного процента летальности. Наиболее из эффективных способов профилактики клостридиозов является вакцинопрофилактика [24, 27, 39, 70, 77, 81, 82]. Наилучшим способом специфической профилактики служит применение схем вакцинаций, а именно применение ассоциированных и поливалентных вакцин, что в своих исследованиях отмечали Пулотов Ф.Х. (2020), Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Гулюкина А.И. (2016); Скляр О.Д., и др. (2017) и др. [27, 67, 74, 76, 80, 86]. В результате исследований Пулотова Ф.Х., Девришова Д.А., и Исматова И.А. (2020) установлено, что: «...все штаммы, кроме *Clostridium perfringens* типа А, вызывают 100%-ной иммунитет у иммунизированных лабораторных животных, только *Clostridium perfringens* тип А вырабатывал иммунитет в 80% случаев» [74, 75].

Как сообщает Спиридонов А.Г. (2013): «В Российской Федерации разработаны и выпускаются биологической промышленностью вакцины против энтеротоксемии овец и поросят, такие как «Концентрированная поливалентная гидроокисьалюминиевая вакцина против браздзота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека и дизентерии ягнят», содержащая в своем составе антигены *Clostridium perfringens* типов В, С и D; «Поливалентный анатоксин против клостридиозов овец» на основе анатоксинов *Clostridium perfringens* типов С и D;

«Вакцина ассоциированная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиоза поросят», на основе микробных клеток бактерий *Clostridium perfringens* типа С и эшерихий 7 серологических групп» [85].

«Вакцину против анаэробной энтеротоксемии телят и свиней, которая содержит концентрированные анатоксины *Clostridium perfringens* типов А, С, В, D в соотношении 100:200:200:200 ЕС, сорбированные на гидрате окиси алюминия...» в 1992 году разработал микробиолог Алешкевич В. Н. [2, 39].

По исследованиям Ю.Н. Краймер, Н.В.(2020), Пименова (2020) и др.: «...в Российской Федерации зарегистрированы и используются с целью профилактики клостридиозов такие вакцины, как «Клостбовак-8» против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная, «АНТОКС-9» против клостридиозов сельскохозяйственных животных; «Миллениум», против эмкара, газовой гангрены, энтеротоксемии, бактериальной гемоглобинурии и столбняка, предназначенная для крупного рогатого скота, овец и свиней, «ТОКСИПРА ПЛЮС», против клостридиозов крупного рогатого скота, «ВанШотУльтра 8» против клостридиозов и пастереллеза крупного рогатого скота, «Скоугард 4КС» против рота- и коронавирусов, эшерихиоза, клостридиоза крупного рогатого скота, «Мультикрос» против клостридиозов крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота и кроликов» [12, 22, 23, 26, 27, 29, 39, 70, 80, 81]. Кроме того, на территории Северо-Западного федерального округа ветеринарные врачи предприятий используют инактивированные вакцины «Ультрачойс 8» и «Коглавакс» [20, 21].

По наблюдениям Капустина А.В. и др.: «...в связи с широким распространением возбудителей *Clostridium perfringens* в окружающей среде, острым или сверхострым течением болезни, тяжестью поражения тканей организма, лечение животных почти в 100 % случаев неэффективно. Основным способом предотвращения болезней анаэробной этиологии является специфическая профилактика» [26, 27, 28, 29, 80].

Профилактика клостридиозов сельскохозяйственных животных – комплексное мероприятие, состоящее из соблюдения зоогигиенических правил содержания крупного рогатого скота, сбалансированного кормления, соблюдения

оптимальных зоогигиенических параметров содержания животных в зависимости от возраста и физиологического состояния, обеспечения эпизоотического благополучия местности, на территории которой находится хозяйство, соблюдение противоэпизоотических мероприятий.

1.6 Детекция генов *Clostridium perfringens* методом ПЦР

Исследователями Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y. и др. в 2012 году специально для обнаружения *Clostridium perfringens* в мясе и овощах был разработан метод ПЦР в реальном времени, который авторы сравнивали с культуральным методом. Предел обнаружения ПЦР в реальном времени в фосфатно-солевом буфере составил 10^2 КОЕ/мл. Анализ ПЦР в реальном времени является вариантом для лабораторий обеспечения качества для выполнения стандартных диагностических тестов, учитывая его способность обнаружения и эффективность экономии времени [114].

Wu S.B., Rodgers N., Choct M. в 2011 году сравнили результаты количественного определения *Clostridium perfringens* в подвздошной кишке, полученные методами ПЦР в реальном времени и культуральными методами у цыплят-бройлеров в модели заражения некротическим энтеритом. Оценка относительных стандартных отклонений (RSD) показала, что ПЦР в реальном времени дает меньшее стандартное отклонение и, следовательно, является более точным, чем культуральный метод [213]. Количественный анализ ПЦР в реальном времени проводился по методу Уайза и Сирагузы. Авторы сделали вывод, что ПЦР в реальном времени может заменить метод культивирования для количественного определения *Clostridium perfringens* в кишечном тракте цыплят-бройлеров [213].

В 2008 году Albini S., Brodard I., Jaussi A., и др. типировали штаммы *Clostridium perfringens* с помощью определения генов токсинов методом ПЦР, что оказалось надежным методом диагностики энтеротоксемии у различных видов животных. Авторы сообщают об установлении и проверке трех флуоресцентных

(TaqMan) мультиплексных ПЦР в реальном времени для обнаружения генов *CPA*, *CPB*, *CPB2*, *ETX*, *CPE* и *ITX* токсинов *Clostridium perfringens*. Состав реагентов для проведения ПЦР был выбран с учетом надежности анализов и для повышения чувствительности по сравнению с обычными симплексными ПЦР. Комбинация зондовых красителей, выбранных для анализа в реальном времени (FAM/TAMRA, Cy-5/BHQ-2 и VIC/TAMRA), а также положительный контрольный образец, которым служила проба с содержанием гена *CPA* позволили исследователям создать высокоспецифичные и чувствительные, а также эффективные по времени и стоимости праймеры для проведения ПЦР, что является важным звеном для детекции [85]. Было протестировано 103 штамма *Clostridium perfringens*, выделенных в Швейцарии в результате энтеротоксемии у 10 различных видов животных. Генотипы токсинов гормонизировались как в обычных ПЦР, так и в недавно разработанных мультиплексных ПЦР. Кроме того, ПЦР в реальном времени, проводимая как симплекс, позволила Albin S., Brodard I., Jaussi A. и др. (2008) количественно определить число копий, переносимых плазмидой генов токсина по отношению к расположенному в хромосоме гену *CPA* [100].

Uzal F.A., Plumb J.J., Blackall L.L. и др. в 1997 году для детекции генов, кодирующих основные токсины *Clostridium perfringens* в фекалиях коз, использовали ПЦР. При получении чистых культур *Clostridium perfringens* типов А, В, С, D и Е использовали в качестве матриц в ПЦР, ампликоны наблюдали на агарозном геле в виде полос примерно на 247 (*CPA*-праймеры), 1025 (*CPB*-праймеры), 403 (*ETX*-праймеры) и 298 (*ITX*-праймеры) уровнях пар нуклеотидов ДНК-маркера. Для детекции генов различных типов *Clostridium perfringens* в пробах, искусственно обогащенных бактериями, с помощью ПЦР было обнаружено всего $1-1,5 \times 10^2$ КОЕ/мл пяти типов *Clostridium perfringens* [207]. Метод ПЦР позволил исследователям типировать *Clostridium perfringens* в фекалиях коз без использования других методов, например, таких как тест на нейтрализацию на мышах – биопробы.

В своих исследованиях Grant K.A., Kenyon S., Nwafor I. и др. в 2008 году описали валидацию ПЦР в реальном времени для идентификации *Clostridium*

perfringens и оценки способности вызывать диарею, а также исследование геномной локализации генов *CPE* в изолятах, выделенных из проб от животных с диарейным синдромом, вызванным *Clostridium perfringens*. Авторы с помощью ПЦР в реальном времени исследовали 253 пробы, содержащих ДНК *Clostridium perfringens*, где результаты согласовывались с результатами, полученными при использовании подвижных нитратных и лактозо-желатиновых сред, реакции Наглера и обычного блочного ПЦР-анализа. Ген *CPE* был обнаружен в 223 из 253 культур *Clostridium perfringens*, выделенных в связи с желудочно-кишечными заболеваниями человека. Подмножество *CPE*-положительных изолятов *Clostridium perfringens*, связанных с отдельными случаями диарейного заболевания, авторы исследовали дополнительно на плазмидную или хромосомную локализацию гена *CPE* с использованием анализа мультиплексной ПЦР [132, 207].

Исследователи из Университета г. Пармы и Российского университета дружбы народов (Москва) Оссипранди М.-К., Зербини Л., и Болдырева Е. М. в 2013 году изучили энтеротоксигенность изолятов *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота, с использованием метода ПЦР [65, 207]. С помощью культурального метода было изучено 119 проб материала (фекалии после дефекации и фекалии из прямой кишки), полученного от крупного рогатого скота. Все изоляты *Clostridium perfringens* исследовались на токсинотип. Штаммы *Clostridium difficile* подвергались анализу ПЦР на выявление генов *tcdA/tcdB* и *cdtA/cdtB*. Из всех проб, полученных от крупного рогатого скота, 53 были положительными: 37 на *Clostridium perfringens* и 16 на *Clostridium difficile*. Авторы использовали «...дуплексную ПЦР для выявления генов, кодирующих фосфолипазу С и *CPE*, в изолятах *Clostridium perfringens*. Все изоляты *Clostridium perfringens* и референтный штамм АТСС 12917 были исследованы в ПЦР на наличие генов, кодирующих фосфолипазу С и *CPE*. Амплифицированные продукты подвергали электрофорезу в 1,5%-м агарозном геле (120 вольт, 1 час), затем окрашивали их бромидом этидия и исследовали визуально при ультрафиолетовом освещении. Мультиплекс-ПЦР для выявления генов, кодирующих токсины *Clostridium perfringens* авторы применяли с целью

выявления генов, кодирующих токсины *CPA*, *CPB*, *ETX*, *CPE* и *CPB2*. Продукты реакции подвергали электрофорезу в агарозном геле, как описано выше» [65]. Исследователи пришли к выводу, что: «надлежащий учет разнообразия токсигенных штаммов *Clostridium perfringens* будет способствовать лучшему пониманию патогенеза вызываемых ими заболеваний у крупного рогатого скота и разработке эффективных методов профилактики и контроля вспышек болезней, вызванных клостридиями» [65, 207].

Кроме использования готовых коммерческих тест-систем, например таких, как РеалБест-Вет ДНК *Clostridium perfringens* токсин Alpha / Beta, Enterotoxin, ETX/ITX («Вектор-Бест», г. Новосибирск), РеалБест-Вет ДНК *Clostridium difficile/Clostridium perfringens* («Вектор-Бест», г. Новосибирск), EХOone *Clostridium perfringens* Enterotoxin oneMIX («Цинтиво», г. Москва) и др., интерес для специалиста лабораторной диагностики представляет оптимизированная тест-система, с учетом преобладания токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens* на определенной территории [87]. По мнению Козловой А.Д., Горбачевой Н.С., Клименковой О.В. (2017), использование молекулярно-генетических методов является более простым, быстрым и точным способом типирования *Clostridium perfringens* [35]. Авторы выбрали «...5 пар праймеров, амплифицирующих фрагменты генов токсинов *CPA*, *CPB*, *ETX*, *ITX* и *CPE* длиной 465 п.н., 864 п.н., 404 п.н., 263 п.н. и 370 п.н. соответственно» [35]. В результате предложенные праймеры обладали 100% специфичностью, которую подтверждали на штаммах разных видов клостридий (*Clostridium botulinum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium gigas*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium oedematiens*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*), видовая принадлежность которых была подтверждена изучением нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК.

Современные методы диагностики основываются на классических методах бактериологического исследования и молекулярно-генетических методах. В результате исследований ученых в области лабораторной диагностики показана актуальность и необходимость разработки наиболее эффективных, быстрых и

качественных методов диагностики в области бактериологии, ПЦР в режиме реального времени, и получения сведений о генетически обоснованных факторах патогенности *Clostridium perfringens*, доступных для ветеринарных врачей [25, 35, 65, 100, 108, 126, 137, 163, 167, 172, 175, 184, 185, 186, 207, 213]. Описанные выше исследования об актуальности проведения диагностики послужили основанием для проведения настоящей работы.

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 такие методы исследований, как клинический, патологоанатомический, бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический, биоинформатический, аналитический и статистический.

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). Всего было отобрано 439 проб у 225 голов крупного рогатого скота на территории 10 хозяйств Ленинградской области, 4 хозяйств Псковской области.

Таблица 1 – Исследуемый материал и методы его исследования

№	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

Бактериологические и патологоанатомические исследования проводили в лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», биохимические исследования проводили в отделе медицинской микробиологии и молекулярной микробиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, иммунологические и молекулярно-генетические исследования проводили в Научно-исследовательском консультационно-диагностическом центре по птицеводству ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», секвенирование нового поколения проводили на базе бактериологической лаборатории ООО «Биотроф».

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 методическими указаниями по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований [4, 13, 14, 15, 17, 18].

Патологический материал — содержимое прямой кишки для ПЦР - диагностики телят, нетелей и коров дойного стада отбирали стерильным урогенитальным зондом, помещали в пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл со стерильным физиологическим раствором (Рисунок 1 а,б).

Для бактериологического исследования содержимое прямой кишки массой 50-100 г отбирали инструментом для взятия проб фекалий из прямой кишки животных, не соприкасаясь с кожным покровом и инвентарем. Полученное содержимое помещали в стерильный контейнер для биоматериала объемом 120 мл.



Рисунок 1 а – Отбор проб содержимого прямой кишки в среду Эймса



Рисунок 1 б – Отбор проб содержимого прямой кишки стерильным уrogenитальным зондом в пробирку типа Эппендорф

Отбор проб рубцового содержимого коров дойного стада массой 10-50 г от коров проводили вручную, с использованием стерильного зонда в соответствии с общепринятыми методиками [18].

Ткани грудных и тазовых конечностей с гнойно-некротическими поражениями коров дойного стада отбирали стерильными пинцетом и скальпелем в контейнер для биоматериала, доставляли в лабораторию для бактериологического исследования в изотермической таре при температуре $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Молозиво отбирали из соска вымени коров дойного стада в стерильный контейнер для биоматериала, доставляли в лабораторию для бактериологического исследования в изотермической таре при температуре $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Секционный патологический материал — участок прямого кишечника коров дойного стада лигировали по периферии. В лаборатории мазки фекалий, отпечаток стенки кишечника фиксировали, окрашивали по Романовскому-Гимзе.

Часть содержимого прямой кишки телят, нетелей, стельных коров и коров дойного стада с диарейным синдромом, гипотонией рубца, нервными явлениями, токсемией, предположительно вызванных токсинообразующими штаммами *Clostridium perfringens*, наносили на предметное стекло стерильным урогенитальным зондом, высушивали, фиксировали и окрашивали в лаборатории по Граму и по Романовскому-Гимзе.

Для последующего посева патологического материала на элективные и дифференциально-диагностические среды использовали технику отбора материала из прямой кишки в полимерную пробирку с наполнителями — зондом и транспортной средой (Эймса).

Для проведения микроскопического метода исследования нативные мазки наносили на предметное стекло и высушивали в хозяйстве, фиксировали и окрашивали в лаборатории Романовскому-Гимзе.

Лабораторные исследования проводили в день отбора биологического материала. Исследования проводили в соответствии с ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» [14].

2.1.2 Бактериологический метод идентификации

Clostridium perfringens

Первичный посев проводили в МПБ и на МПА, а также в среду Китта-Тароцци, используемую для культивирования анаэробных микроорганизмов стерильной бактериологической петлей. Перед посевом пробирки выдерживали в кипящей водяной бане в течение 15—20 минут для удаления растворенного в среде воздуха, а затем охлаждали их путем постепенного добавления холодной воды в водяную баню. Посевы выдерживали в термостате при температуре 37—38 °С в течение 72 часов [14]. Далее, для получения чистой культуры использовали элективные и дифференциально-диагностические среды для культивирования строгих и облигатных анаэробов, а именно среду Китта-Тароцци, МПА, МПБ, сахарно -кровяной агар, глюкозо - кровяной агар Цейсслера, молоко, среды Гисса, среду из системы атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact для контроля роста анаэробов, обеспечивая при росте анаэробные условия с помощью системы атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact. Атмосферу, необходимую для культивирования анаэробов, создавали с помощью химических газогенерирующих пакетов на дне анаэроостата, культивировали в термостате 48 часов при температуре 37°С [48]. Учет проводили каждые 6, 12, 24, 48, 72 часа. Исследования проводили в соответствии с ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» [14].

Изучение характерных для *Clostridium perfringens* колоний проводили микроскопическим методом с помощью светового микроскопа при увеличении x100 под иммерсией. Из среды Китта-Тароцци и колоний на сахарно-кровяном агаре, глюкозо-кровяном агаре Цейсслера и среды в комплекте к системе атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact для контроля роста анаэробов мазки окрашивали по Граму.

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 и определителем Берджи [63]:

среда Китта-Тароцци – из толщи помутнения среды и активного газообразования;

плотные питательные среды (сахарно-кровяного агара, среды в комплекте к системе атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact) – серовато-белые, круглые, сочные, куполообразные колонии S-формы с ровным краем и гладкой поверхностью, мутные, окруженные зоной β – гемолиза;

глюкозо-кровяной агар Цейсслера – округлые, гладкие, выпуклые серовато-зеленые колонии S-формы с ровным краем, окруженные зоной α – гемолиза;

среда Вильсона-Блера – колонии черного цвета.

Для постановки теста использовали цельное молоко и набор полужидких питательных сред с добавлением соответствующих углеводов (сахаров – глюкозы, лактозы, сахарозы, маннита, галактозы, мальтозы) или многоатомных спиртов (глицерина), пробирки с желатином, МПБ.

Исследуемую культуру пересевали бактериологической петлей уколом в среду Роберта для изучения подвижности и редукции нитратов. Посев термостатировали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов.

Исследуемую культуру пересевали бактериологической петлей уколом в среды Гисса и лактозо-желатиновую среду для определения способности к ферментации лактозы и разжижению желатина. Посев термостатировали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 18-24 часов.

Подвижность, редукцию нитратов, разжижение желатина определяли путем посева 6-8 часовой культуры на среду Роберта (лактозно-желатиновая среда). Среду перед работой прогревали 20 минут на кипящей водяной бане, охлаждали до

застывания в холодильнике. В подготовленную среду посев проводили уколом, согласно ГОСТ Р 51446-99 [15]. Посевы инкубировали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов, после этого пробирки помещали на 20 минут в холодильник.

Дифференциацию *Clostridium perfringens* от других бактерий и их ассоциаций проводили такими методами лабораторной диагностики, как бактериологический, микроскопический, определение биохимических свойств выделенных микроорганизмов, изучение вирулентности методом биопроба, молекулярно-генетический – ПЦР в режиме реального времени. Дифференциацию от других микроорганизмов проводили при сравнении полученных биохимических и вирулентных свойств со справочным материалом [63].

Бактериоскопию проб материала – содержимого прямой кишки, мазков-отпечатков и др. проводили на базе лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ и в отделе медицинской микробиологии и молекулярной микробиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России.

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 (Рисунок 2). Использовали иммунологический анализатор Multiskan FC. Погрешность прибора составляла 1% согласно характеристике прибора Multiskan FC.



Рисунок 2 – Проведение ИФА

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

Современным и эффективным методом молекулярно-генетической идентификации микроорганизмов был выбран метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Real-time).

ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-АМ» – комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) согласно инструкции.

При проведении исследования происходила деструкция клеточных мембран и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК *Clostridium perfringens* в присутствии лизирующего раствора связывалась с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного материала оставались в растворе и удалялись при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходил переход ДНК с

поверхности силики в раствор, который отделялся от частичек сорбента центрифугированием.

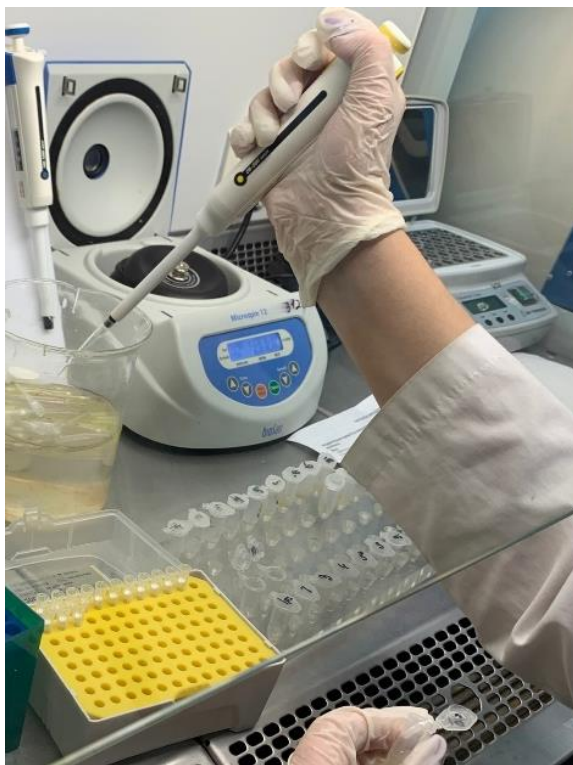


Рисунок 3 – Выделение ДНК *Clostridium perfringens* в лабораторных условиях

В результате указанной процедуры получался высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что в дальнейшем обеспечило высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования в режиме реального времени (Рисунок 3) [64].

В работе использовали коммерческую тест-систему, состоящую из праймеров, Taq-полимеразы, смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, буфера; положительного контрольного образца (ПКО), отрицательного контрольного образца (ОКО), внутреннего контрольного образца (ВКО) для получения достоверных результатов.

Детекцию флуоресцентного сигнала проводили с учетом базовой линии (сигнал не превышал предела детектирования прибора); экспоненциальной амплификации; плато. Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастал пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала

позволял построить кинетическую кривую реакции, при этом момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового – так называемый пороговый цикл (Ct) – зависел от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в пробе, тем раньше наблюдалось начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Интерпретацию результатов в исследуемых пробах проводили только при правильном прохождении ВКО и ОКО; прохождении ПКО Ct ≤ 35 . Результат исследования экспериментального материала считали положительным при Ct ≤ 35 по каналу Нех.

2.1.5 Метагеномный анализ микробиома содержимого рубца и молозива

Метагеномные исследования выполняли методом секвенирования нового поколения (NGS-секвенирования), путём анализа гена прокариотической 16S-рибосомальной РНК (16S рРНК).

1. Материал исследования – содержимое рубца коров 2 групп (n=3 в каждой группе).

В первую группу вошли коровы дойного стада, во вторую – коровы на откорме. Тотальную ДНК из исследуемых проб выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно прилагаемой инструкции (Рисунок 4). Анализ основан на селективном детергентно-опосредованном осаждении ДНК из субстрата с применением растворов для лизиса клеточных стенок, осаждения ДНК, раствора 1,2 М хлорида натрия, хлороформа. Амплификацию для последующего NGS-секвенирования проводили на ДНК-амплификаторе Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью эубактериальных праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTСТААТ-3') фланкирующих участок V1V3 гена 16S рРНК. Использовали следующий режим амплификации: 3 минуты при 95 °С (1 цикл); 30

секунды 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). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2x300 п.н. Химерные последовательности исключали из анализа с помощью программы USEARCH 7.0 (<http://drive5.com/usearch/>).



Рисунок 4 – Набор MiSeq Reagent Kit v3 для проведения метагеномного исследования

Обработка полученных ридов с помощью биоинформатической платформы CLC Bio GW 7.0 («Qiagen», Нидерланды) включала в себя перекрывание, фильтрацию по качеству ($QV > 15$), триммирование праймеров. Таксономическую принадлежность микроорганизмов до рода определяли в программе RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Погрешность прибора MiSeq, на котором проводили NGS-секвенирование составляла до 5%.

Исследование микрофлоры рубца проводили на базе ООО «БИОТРОФ» методом NGS-секвенирования на секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США).

2. Материал исследования – молозиво коров дойного стада в периоды второй и третьей лактаций. Объектом исследования являлись две группы коров (n=10 в каждой группе) голштинской породы периодов второй и третьей лактаций.

Тотальную ДНК из исследуемых проб выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas, Inc.», Литва) согласно прилагаемой инструкции. Анализ основан на селективном детергентно-опосредованном осаждении ДНК из субстрата с применением растворов для лизиса клеточных стенок, осаждения ДНК, раствора 1,2 М хлорида натрия, хлороформа. Амплификацию для последующего NGS-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). Максимальная длина полученных последовательностей составила 2x300 п.н. Химерные последовательности исключали из анализа с помощью программы USEARCH 7.0 (<http://drive5.com/usearch/>).

Обработка полученных ридов с помощью биоинформатической платформы CLC Bio GW 7.0 («Qiagen», Нидерланды) включала в себя перекрывание, фильтрацию по качеству (QV > 15), триммирование праймеров. Таксономическую принадлежность микроорганизмов до рода определяли в программе RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Погрешность прибора MiSeq, на котором проводили NGS-секвенирование составляла до 5%.

Исследование микрофлоры молозива проводили на базе ООО «БИОТРОФ» методом NGS-секвенирования на секвенаторе MiSeq («Illumina, Inc.», США).

Математическую и статистическую обработку результатов проводили с применением программных пакетов Microsoft Office Excel 2013, PAST.

Результаты статистического анализа считали значимыми при $p \leq 0,05$.

2.1.6 Разработка праймеров для детекции генов *CPA* в биологическом материале

Технология разработки праймеров для детекции генов *CPA* в биологическом материале опубликована в статье «Разработка и апробация тест-системы для полимеразной цепной реакции с целью выявления альфа-токсина *Clostridium perfringens*» [52].

В рамках разработки тест-системы для детекции генов *Clostridium perfringens* методом ПЦР-РТ был выбран участок гена, кодирующий ген фосфолипазы С α -токсина (plc) штамма *Clostridium perfringens* CP322. Информацию об участке гена изучали с помощью GenBank – базы данных генетических последовательностей (Рисунок 5).

The screenshot shows the GenBank entry for Clostridium perfringens strain CP322 phospholipase C alpha-toxin (plc) gene, complete cds. The entry includes the following information:

- Accession:** MH900563.1
- Locus:** MH900563 26 bp DNA Linear OCT 24-OCT-2019
- Definition:** Clostridium perfringens strain CP322 phospholipase C alpha-toxin (plc) gene, complete cds.
- Accession:** MH900563 REGION: 4..29
- Version:** MH900563.1
- Keywords:** -
- Source:** Clostridium perfringens
- Organism:** Clostridium perfringens; Bacteria; Bacillota; Clostridia; Eubacteriales; Clostridiales; Clostridium.
- Reference:** 1 (bases 1 to 26) Matsuda, A., Aung, M. S., Urushibara, N., Kawaguchiya, M., Sumi, A., Nakamura, M., Horino, Y., Ito, M., Hasegawa, S., and Kobayashi, N. Prevalence and Genetic Diversity of Toxin Genes in Clinical Isolates of Clostridium perfringens: Coexistence of Alpha-toxin Variant and Binary Enterotoxin Genes (bec/cplie) Toxins (Basel) 11 (6): E206 (2019)
- Journal:** 11172364
- PubMed:** Publication Status: Online-Only
- Remark:** 2 (bases 1 to 26) Matsuda, A., Aung, M. S., Urushibara, N., and Kobayashi, N. Direct Submission Submitted (13-SEP-2018) Department of Hygiene, Sapporo Medical University School of Medicine, 5-1, H-17, Chuoku, Sapporo 060-8556, Japan
- Comment:** ##Assembly-Data-START## Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing ##Assembly-Data-END##
- Features:**
 - source** Location/Qualifiers
 - 1..26
 - /organism="Clostridium perfringens"
 - /mol_type="genomic DNA"
 - /strain="CP322"
 - /isolation_source="venous blood"
 - /db_xref="taxon:1302"
 - /country="Japan"
 - /collection_date="31-Mar-2017"
 - /note="genotype: ST8"
 - 1..26
 - gene="plc"
 - 1..26
 - gene="plc"
 - /codon_start=1
 - /transl_table=1
 - /product="phospholipase C alpha-toxin"
 - /protein_id="AV044388.1"
 - /translation="MRRELKALICALATLSLMAAGCTVYVMDGKEDGTGTWPIVDTQQGSLLENQSPKSPESVSNALFLKENHQLQLGSLTYDQVKNAYDLVQHFHNPDTDMWFKDMSWLYLSPDTGESQLRFKFSALARYEKQWYKQATFYLGEMHYFGDITPPHFAWYVDSGAGWVETFALENKQYVINTAGCKTMDYADLNKDFNAGCKEYVQFAKQGLSYDPSGDFHAKDQWVAVYTLRQDGTADYFVFLRDEYSGDPSVGNKVELVAVY15TSGKDAQTDYVYVGIKTKDQKTEQEMEPVQDFRIGSKDTVYFLKVDENLK1DDIQMKEKRYVAFPOAVKPKENLILANGKVVVDKIDNEKMSIGNSTVKE"
- ORIGIN**

```
1 aaagaaga tttgtaaggc gcttat
```

Рисунок 5 – Данные CP322 в базе данных генетических последовательностей GenBank

За основу взяли последовательность нуклеотидов, подобранную коллективом ученых из Кореи - Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y., Park C., Song K.Y., Hong K.W., Hwang I.G., Kwak H.S., Seo K.H. в 2012 году:

(F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3',
 (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3' [114].

Последовательность нуклеотидов, специфичность гена подтверждали на веб-сайте <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22534301/> (Рисунок 6) с помощью BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

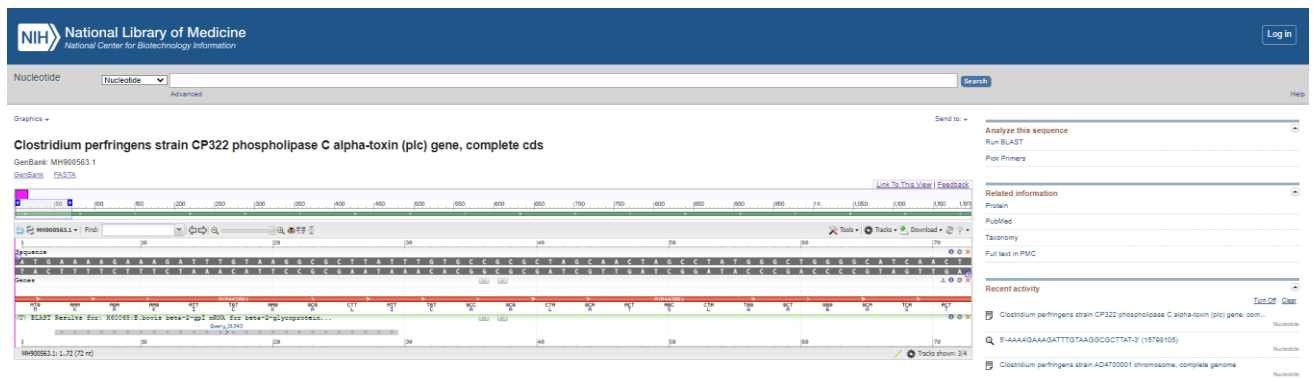


Рисунок 6 – Ген фосфолипазы C CPA (plc) штамма *Clostridium perfringens* CP322

Выравненную последовательность нуклеотидов изучали в программе SnapGene с помощью визуализации фрагментов ДНК (Рисунок 7).

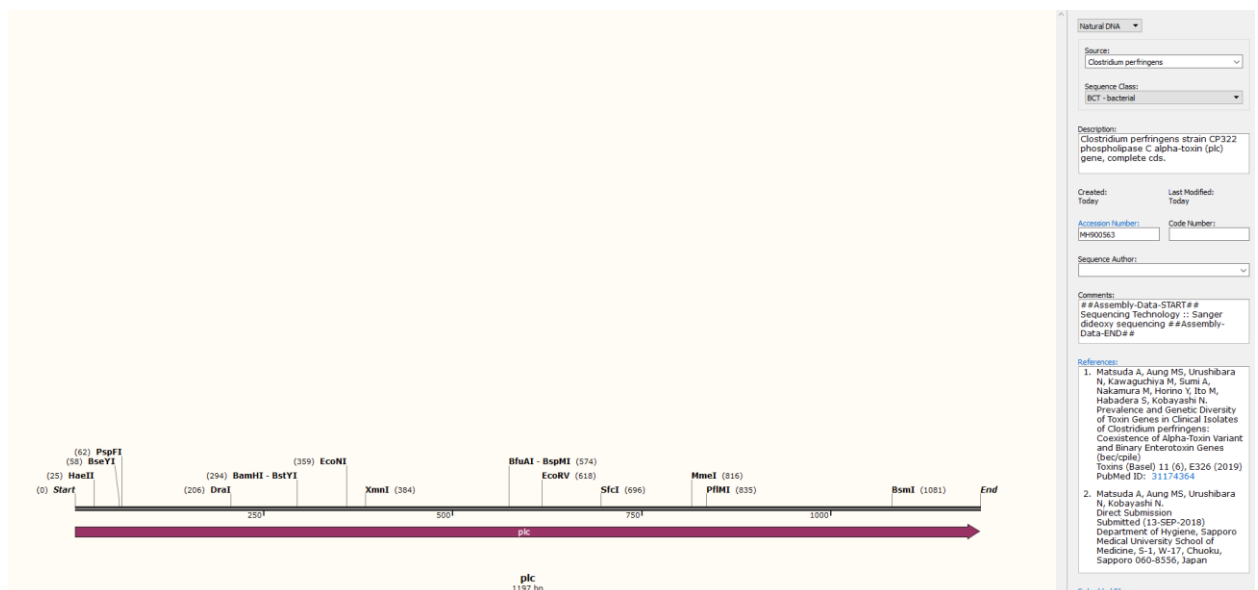


Рисунок 7 – *Clostridium perfringens* strain CP322

Синтезировали следующие последовательности: прямой праймер - Forward (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3', обратный праймер – Reverse (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3' [17].

В экспериментальных целях для наибольшей эффективности реакции и учета результатов в программе гаситель флуоресценции, локализирующийся между праймерами, заменили на ВНQ1. Гаситель флуоресценции представляет собой молекулу, спектр поглощения которой лежит в области длин волн спектра испускания флуорофора. Тушение флуоресценции происходит благодаря безызлучательному переносу энергии от молекулы флуорофора к молекуле гасителя и рассеиванию энергии. Получили зонд 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G-3' ВНQ1. 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.

Подготавливали реакционную смесь из следующих компонентов:

1. Анализируемая ДНК *Clostridium perfringens*, которая служила матрицей для многократного копирования искомого участка гена фосфолипазы С СРА;
2. Синтезированные праймеры — прямой праймер - Forward (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3', обратный праймер – Reverse (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3', модернизированный зонд - 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G-3' ВНQ1;
3. ПЦР-смесь, состоящая из:
 - дезоксинуклеотидтрифосфатов (нуклеотидов);
 - буфера — раствора, содержащего различные ионы для поддержания нужного рН, соли магния, необходимые для работы Таq-полимеразы, и неионный

детергент Tween-20 в сочетании с BSA (бычьим сывороточным альбумином) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки.

4. Вода деионизованная высокой степени очистки — высокой степени очистки (I типа), удельное сопротивление – не более 18.2 МОм·см, не содержащая нуклеаз и ДНК;

5. Термостабильная Taq-полимераза — фермент, строящий комплементарную матричную цепь ДНК *Clostridium perfringens*.

Эксперимент состоял в испытании 3 вариантах концентраций, из которых был выбран наиболее оптимальный состав для проведения амплификации (Таблица 2, Таблица 3, Таблица 4). Материал представленный в таблице 2, таблице 3, таблице 4 опубликован в статье «Разработка и апробация тест-системы для полимеразной цепной реакции с целью выявления альфа-токсина *Clostridium perfringens*» [52].

Таблица 2 – Испытуемая концентрация №1 для ПЦР – РТ

№	Компонент	Количество (мкл)
1	ДНК	2
2	Forward - праймер	2,5
3	Reverse - праймер	2,5
4	Зонд FAM	2,5
5	ПЦР - смесь	10
6	Вода деионизованная высокой степени очистки	5
7	Taq-полимераза	0,5
Итого:		25

Таблица 3 – Испытуемая концентрация №2 для ПЦР – РТ

№	Компонент	Количество (мкл)
1	ДНК	5
2	Forward - праймер	2,5
3	Reverse - праймер	2,5
4	Зонд FAM	2,5
5	ПЦР - смесь	7
6	Вода деионизованная высокой степени очистки	5
7	Taq-полимераза	0,5
Итого:		25

Таблица 4 – Испытуемая концентрация №3 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

Смесь 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.

Положительным контрольным образцом послужила ранее выделенная ДНК с олигонуклетидной последовательностью, соответствующей искомой объемом 2 мкл. Отрицательным контрольным образцом послужила деионизованная вода высокой степени очистки объемом 2 мкл.

Соблюдали следующий температурный режим: 50°C – 2 минуты, 95°C – 10 минут, 40 циклов 95°C – 15 секунд, 60°C – 1 минуту.

Исследование проводили на анализаторе ПЦР в реальном времени Roche LightCycler 96 (Швейцария) с возможностями абсолютного количественного анализа, относительного количественного анализа, генотипирования «по конечной точке», анализа кривых плавления, анализа кривых плавления высокого разрешения (HRM), качественного анализ. Обработку данных проводили в соответствующей лицензионной программе Roche LightCycler 96.

2.2 Результаты исследований

В данном разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в научных трудах: [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 104], которые были уточнены, расширены и содержат новые сведения.

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

При дифференциальной диагностике болезней с помощью лабораторного метода для достижения достоверных результатов необходимо отбирать пробы исключая травматический фактор для животного и ветеринарного специалиста, предупреждая контаминацию исследуемого материала посторонней микрофлорой.

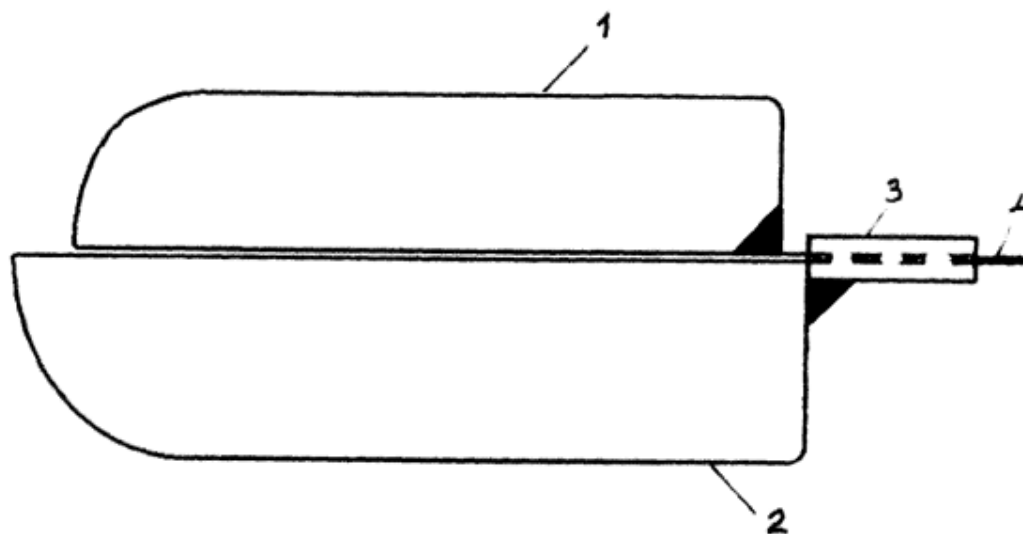


Рисунок 8 - Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных, где 1 – верхняя половина; 2 – нижняя половина; 3 – ручка в виде трубки; 4 – цилиндрический прут.

Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных состоит из ручки, соединенной с заборным элементом, выполненным с округлым концом, состоящим из двух цилиндрических половинок: нижней и верхней (Рисунок 8) [66]. Нижняя половина соединена с ручкой, выполненной в виде трубки, а верхняя половина - с цилиндрическим прутком, размещенным внутри трубки с

возможностью вращения последнего в отверстии торца нижней половины. Длина и диаметр верхней цилиндрической половины меньше длины и диаметра нижней цилиндрической половины для обеспечения возможности размещения верхней цилиндрической половины в нижней цилиндрической половине.

Принцип работы с инструментом состоит в следующем:

1. Для взятия проб фекалий из прямой кишки животного инструмент фиксируют между двумя пальцами за ручку (трубку 3), прутком 4 приводят прибор в закрытое состояние: нижняя 2 и верхняя 1 цилиндрические половины находятся одна над другой, и при котором инструмент имеет форму цилиндра.

2. Зафиксированному животному отводят в сторону хвост, а инструмент вводят плавным движением в прямую кишку на необходимую глубину.

3. Достигнув нужной глубины прутком 4 приводят прибор в открытое состояние, делают плавное движение вперед без смещения центра на величину длины прибора, после чего прутком 4 приводят прибор в закрытое состояние (нижняя 2 и верхняя 1 цилиндрические половины находятся одна над другой), и осторожно вынимают, удерживая прибор за ручку (трубку 3), и извлекают из прямой кишки через анальное отверстие сфинктеров, строго следя за надежностью фиксации нижней 2 и верхней 1 цилиндрических половин инструмента.

4. С учетом того, что длина и диаметр верхней цилиндрической половины меньше длины и диаметра нижней цилиндрической половины для обеспечения возможности размещения верхней цилиндрической половины в нижней цилиндрической половине, то при повороте цилиндрического прутка 4 происходит перемещение верхней цилиндрической половины 1 во внутрь нижней цилиндрической половины 2.

Пробу фекалий после упаковывают в контейнер, либо приготавливают необходимое количество мазков на предметных стеклах, при необходимости проводится консервация проб.

Предлагаемый инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки имеет ряд преимуществ по сравнению с прототипом:

1. Пробу (порцию) берут сразу необходимого объема и надежно изолируют до момента ее закладки в индивидуальный контейнер для сбора фекалий, чем достигается высокая точность последующей диагностики.

2. Инструмент за счет физиологически обоснованной формы легко вводится в прямую кишку, а затем легко вынимается без травмирования сфинктеров анального отверстия животного, за счет физиологически обоснованной цилиндрической формы корпуса (цилиндрическая форма инструмента дает возможность не повреждать анальное отверстие сфинктеров при их сокращении, за счет равномерного давления мускулатуры сфинктера на цилиндрический корпус инструмента).

3. При использовании инструмента снижаются трудовые затраты ветеринарного специалиста.

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

Результаты текущего этапа исследования опубликованы в работах «Идентификация изолятов *Clostridium perfringens* с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов», «Современные методы проведения лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*» и «Идентификация изолятов *Clostridium perfringens* и *Fusobacterium necrophorum*» [47, 48, 54].

При окрашивании нативных мазков методом Романовского-Гимзе обнаруживали толстые палочки со слегка закругленными концами, темно-фиолетового цвета и капсулой светло-розового цвета (Рисунок 9). Микроскопию проводили с помощью светового микроскопа при увеличении x100 под иммерсией.

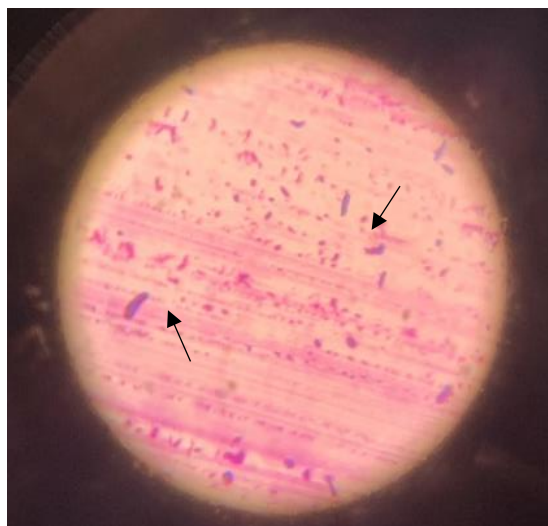


Рисунок 9 – Микрокартина *Clostridium perfringens*, нативный мазок из прямой кишки, окраска по Романовскому-Гимзе, x100

При окрашивании мазков по Граму из среды Китта-Тароцци и из колоний дифференциальных сред, среды Вильсона-Блера и глюкозо-кровяного агара Цейсслера, в поле зрения регистрировали грамположительные толстые палочки со слегка закругленными концами, расположенные одиночно (Рисунок 10).

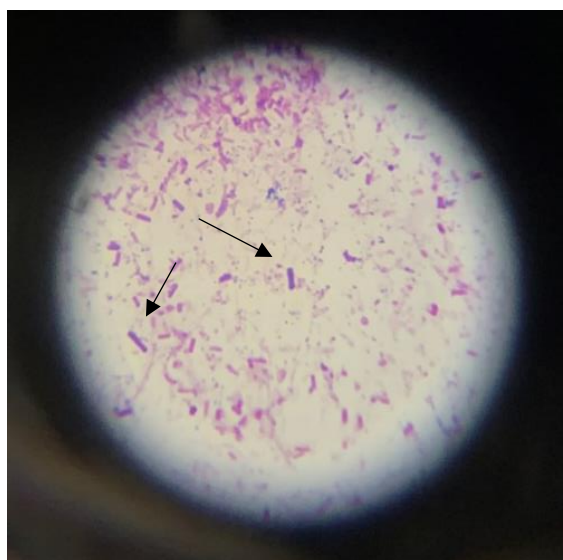


Рисунок 10 – Микрокартина *Clostridium perfringens* из колонии глюкозо-кровяного агара, окраска по Граму, x100

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 11).



Рисунок 11 – Рост *Clostridium perfringens* на среде Китта-Тароцци

Регистрировали рост на жидкой среде Вильсона-Блера с черным помутнением и бурным интенсивным газообразованием через 24 часа с момента посева (Рисунок 12).

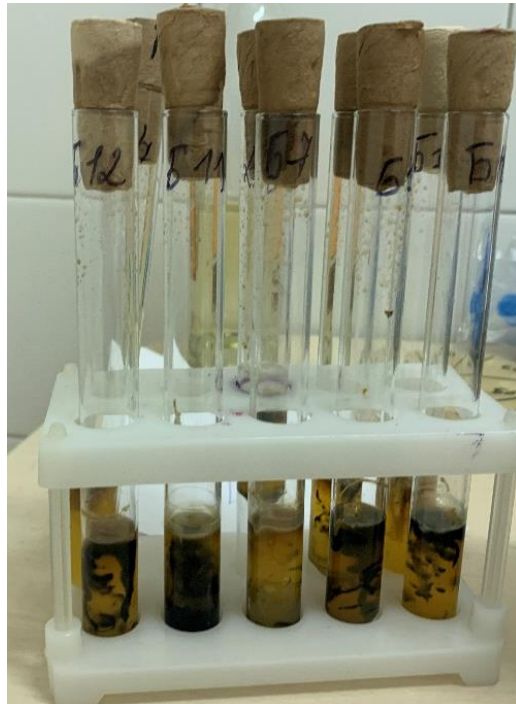


Рисунок 12 – Рост *Clostridium perfringens* на среде Вильсона-Блера

На глюкозо-кровяном агаре регистрировали круглые, сочные, куполообразные S-колонии, с гладкими ровными краями, серовато-белые, мутные с зоной β -гемолиза (Рисунок 13 а, б).



Рисунок 13 а, б – Колонии *Clostridium perfringens* на глюкозо-кровяном агаре, окруженные зоной β-гемолиза

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 14), предназначенной для контроля роста анаэробов, регистрировали круглые, сочные, куполообразные S-колонии, с гладкими ровными краями, серовато-белые, мутные (Рисунок 15).



Рисунок 14 – Чашки Петри в анаэроостате Anaerobic MLAB 3,0л

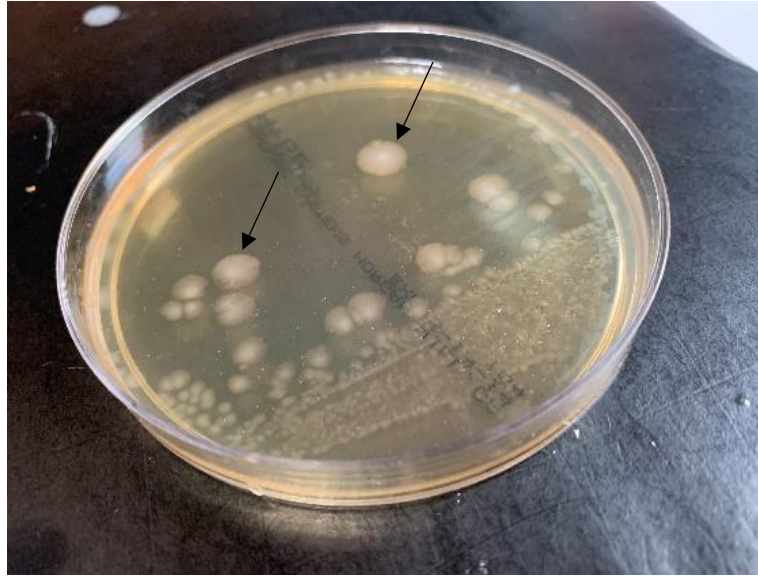


Рисунок 15 – Колонии *Clostridium perfringens* на промышленной готовой среде из системы атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact

Из посевов чистых культур готовили мазки, окрашивали по Граму. *Clostridium perfringens* представляют собой грамположительные палочки размером 0,9-1,3x3,0-9,0 мкм, плохо или не образующие в посевах споры, расположенные субтерминально. Палочки с закругленными концами располагаются в одиночку, попарно, в виде цепочек или скоплений.

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* (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты бактериологического метода лабораторной диагностики

№	Материал	Количество исследованных проб	Абсолютное количество положительных проб	% положительных проб
1	Содержимое рубца	6	-	-
2	Содержимое прямой кишки	254	144	56,7%

3	Ткани прямой кишки	8	4	50,0%
4	Гной и содержимое ран, абсцессов	42	6	14,3%
5	Содержимое матки, шейки матки и влагалища	52	4	7,7%
6	Молозиво и молоко	57	-	-
7	Содержимое навозного стока	20	20	100,0%

В результате определения биохимических свойств выделенных изолятов *Clostridium perfringens*, установили, что проведение теста с лакмусовым молоком *Clostridium perfringens* вызвало бурную ферментацию лактозы с образованием газа, редукцию лакмуса, коагуляцию молока с последующим его свертыванием и образованием губчатого сгустка красновато-сиреневого цвета в верхней части пробирки и просветлением сыворотки.

В ходе изучения подвижности и редукции нитратов определили, что палочка *Clostridium perfringens* неподвижна, культура растет по ходу линии посева, не вызывая помутнения всей среды. После учета подвижности в эту же пробирку вносили реактив на нитриты. Проводили учет редукции нитратов: культура *Clostridium perfringens* давала сильную и немедленную реакцию – стойкий красный цвет столбика пробирки.

О ферментации лактозы судили по образованию желтого окрашивания среды и выделения пузырьков газа в толще среды. После учета ферментации лактозы пробирки с посевом выдерживали при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Регистрировали разжижение желатина. Культура *Clostridium perfringens* на среде Роберта образовала прямую, красную линию, превращая среду в желеобразное состояние.

Результаты исследования биохимических свойств оценивали ежедневно в течение 7 суток в соответствии с критериями, приведенными в Таблице 6.

+ полная ферментация;

+/- непостоянная или частичная ферментация; ферментация отсутствует.

Таблица 6 – Ферментативные свойства *Clostridium perfringens*

Питательные среды, реактивы, многоатомные спирты и др.										
Желатин	Сероводород	Молоко	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Маннит	Глицерин	Салацин	Мальтоза	Галактоза
Разжижает на 3-5 сутки	Не выделяет	Быстрое свертывание	+	+	+	-	+/-	-	+	+

Установлены биохимические (ферментативные) свойства: разжижает на 3-5 сутки желатин, в молоке вызывает быстрое свертывание, сбраживают 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 7). Дифференцировали выделенные культуры в соответствии с определителем Берджи [63].

Выделенные изоляты бактерий *Clostridium perfringens* обладали высокой сахаролитической активностью, ферментировали с образованием кислоты и газа глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, маннит, проявляли протеолитическую активность - разлагали желатин и казеин.

Таблица 7 – 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	+	-	+	-	-	+	-

Выделенные изоляты бактерий *Clostridium perfringens* обладали высокой сахаролитической активностью, ферментировали с образованием кислоты и газа

глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, маннит, проявляли протеолитическую активность - разлагали желатин и казеин.

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 (Рисунок 16).

Для дифференциации от возбудителя некробактериоза, заражали лабораторных животных, поскольку наиболее чувствительны к возбудителю некробациллеза кролики и белые мыши [55].

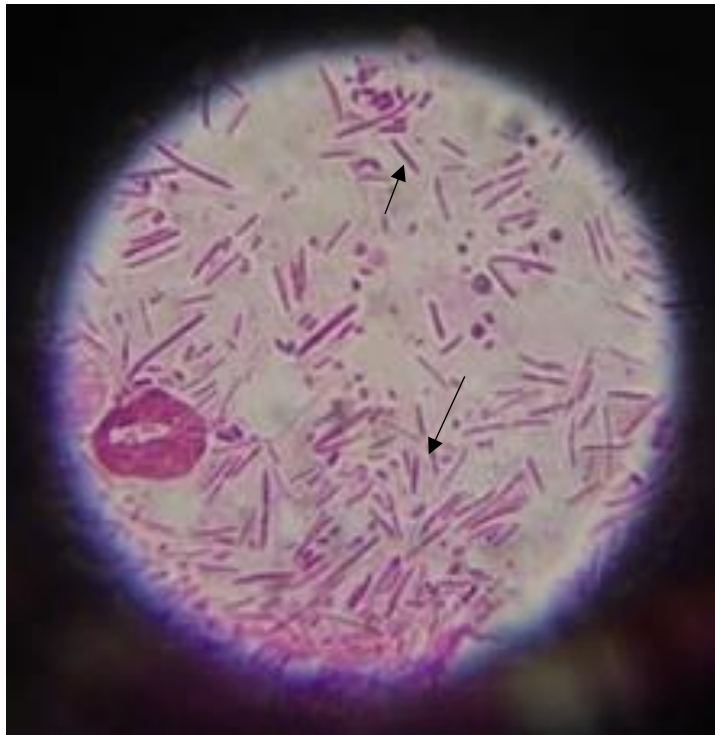


Рисунок 16 – *Fusobacterium spp.*, x100

Белых мышей заражали эмульсией из патологического материала – суспензии из содержимого ран копыта и межпальцевой щели на физиологическом растворе. Заражение проводили под кожу хвоста в дозе 0,4 мл. На 3 день наблюдали в окружности инъекции наблюдали опухоль и нагноение, на 6 день – некроз.

На 12 день регистрировали гибель мыши, при патологоанатомическом вскрытии наблюдали некроз мышц конечностей, гнойные очаги в печени, легких, сердце, откуда получили чистую культуру (Рисунок 17).



Рисунок 17 – Вскрытие белой мыши, зараженной эмульсией из патологического материала

На 12 день регистрировали гибель мыши, при патологоанатомическом вскрытии наблюдали некроз мышц конечностей, гнойные очаги в печени, легких, сердце, откуда получили чистую культуру (Рисунок 17). Мазки-отпечатки с печени проводили на глюкозо-кровоном агаре, культивировали по вышеупомянутой технологии (Рисунок 18). Через 48 часов регистрировали очень мелкие колонии S-формы, диаметром менее 1 мм, выпуклые, серо-белого цвета с ровными краями.



Рисунок 18 – Колонии *Fusobacterium spp.* на глюкозо-кровоном агаре

В молодой культуре, из колоний среды Китта-Тароцци, при посеве содержимого прямой кишки телят и коров, обнаруживали грамположительные,

овальные, толстые палочки, расположенные одиночно, по морфологии схожих с *Clostridium perfringens* (Рисунок 19).

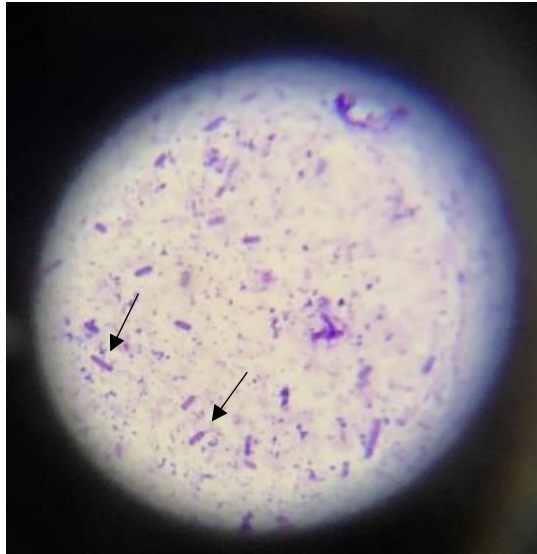


Рисунок 19 – *Clostridium spp.*, x100

На сахаро-кровяном агаре регистрировали серовато-белые, круглые, сочные, куполообразные S-колонии, с гладкими ровными краями, мутные с зоной β – гемолиза.

2.2.3 Индикация энтеротоксина

***Clostridium perfringens* иммунологическим методом**

Результаты текущего этапа исследования частично опубликованы в статье «Современные методы проведения лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*» [47].

Результаты исследования проб прямой кишки, положительных при экспресс-индикации энтеротоксина методом иммуноферментного анализа, представлены в Таблице 8.

Установили среднюю оптическую плотность $2,06 \pm 0,02$ Б. Согласно инструкции, уровень отсечения (cut-off) рассчитывали, прибавляя 0,15 единиц оптической плотности к измеренной оптической плотности отрицательного контроля: cut-off = оптическая плотность отрицательного контроля + 0,15. Пробы

считались положительными, если значение их оптической плотности более чем на 10% выше рассчитанного cut-off.

Таблица 8 – Результаты иммуноферментного теста для качественного определения энтеротоксина в пробах (n=6)



НКЦ ПО ПТИЦЕВОДСТВУ ФГБОУ ВО СПБГУВМ
Тел: 8 (981) 877-87-69, 8 (981) 843-03-53

Отчет анализа		ХОЗЯЙСТВО	
Кол-во образцов	: 6	№ файла	: 20220922-4
		Специалист	: ADMIN
		Длина волны	: 450 NM
		Дата тестирования	: 22.09.2022
		<i>Все протоколы</i>	
		Код продукта	:
		№ серии	: NGY-23
		Срок годности	: 02/2024
		Границы Cut-off	:

№ 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

Результаты этого этапа исследования частично опубликованы в статьях «Идентификация изолятов *Clostridium perfringens* с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов», «ПЦР-диагностика штаммов *Clostridium perfringens* в исследуемом материале крупного рогатого

скота» и «Современные методы проведения лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами» [48, 50, 54].

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастал пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволял построить кинетическую кривую реакции, при этом момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового (пороговый цикл) зависел от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в материале, тем раньше наблюдали начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

В результате наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции, пороговый цикл по каналу Nех наблюдался в 9 из 16 проб на $26,5 \pm 4,7$ цикле амплификации, что говорит о содержании ДНК *Clostridium perfringens* в исследуемых пробах. Результаты исследования приведены в Таблице 9.

Материал представленный в таблице 9 опубликован в статье «ПЦР-диагностика штаммов *Clostridium perfringens* в исследуемом материале крупного рогатого скота» [50].

Таблица 9 – Значения порогового цикла в исследуемых пробах

№ пробы	1	4	5	8	9	11	12	13	16
цикл	23,8	24,6	27,6	21,8	24,8	30,4	27,6	29,8	28,2

2.2.5 Анализ микробиома содержимого рубца

и молозива с помощью секвенирования нового поколения

Результаты данного этапа исследования частично опубликованы в статьях «Разнообразие форм клостридий в рубцовом содержимом дойных коров и коров на откорме» и «Comparison of colostrum microflora in second and third lactation in Holstein cows» [51, 104].

По итогам проведенных исследований 2 групп коров (n=3 в каждой группе) - коров дойного стада и коров на откорме - с диарейным синдромом получены следующие результаты: при исследовании проб, полученных от коров на откорме, наиболее часто был зарегистрирован представитель семейства Ruminosoccaceae, бактерия *Clostridium viride*, содержание которой достигало 2,6% от всех микроорганизмов, обнаруженных в содержимом рубца коров.

В пробах, полученных от дойных коров, количество данных бактерий также было велико (достигало 2,1% от всех обнаруженных микроорганизмов).

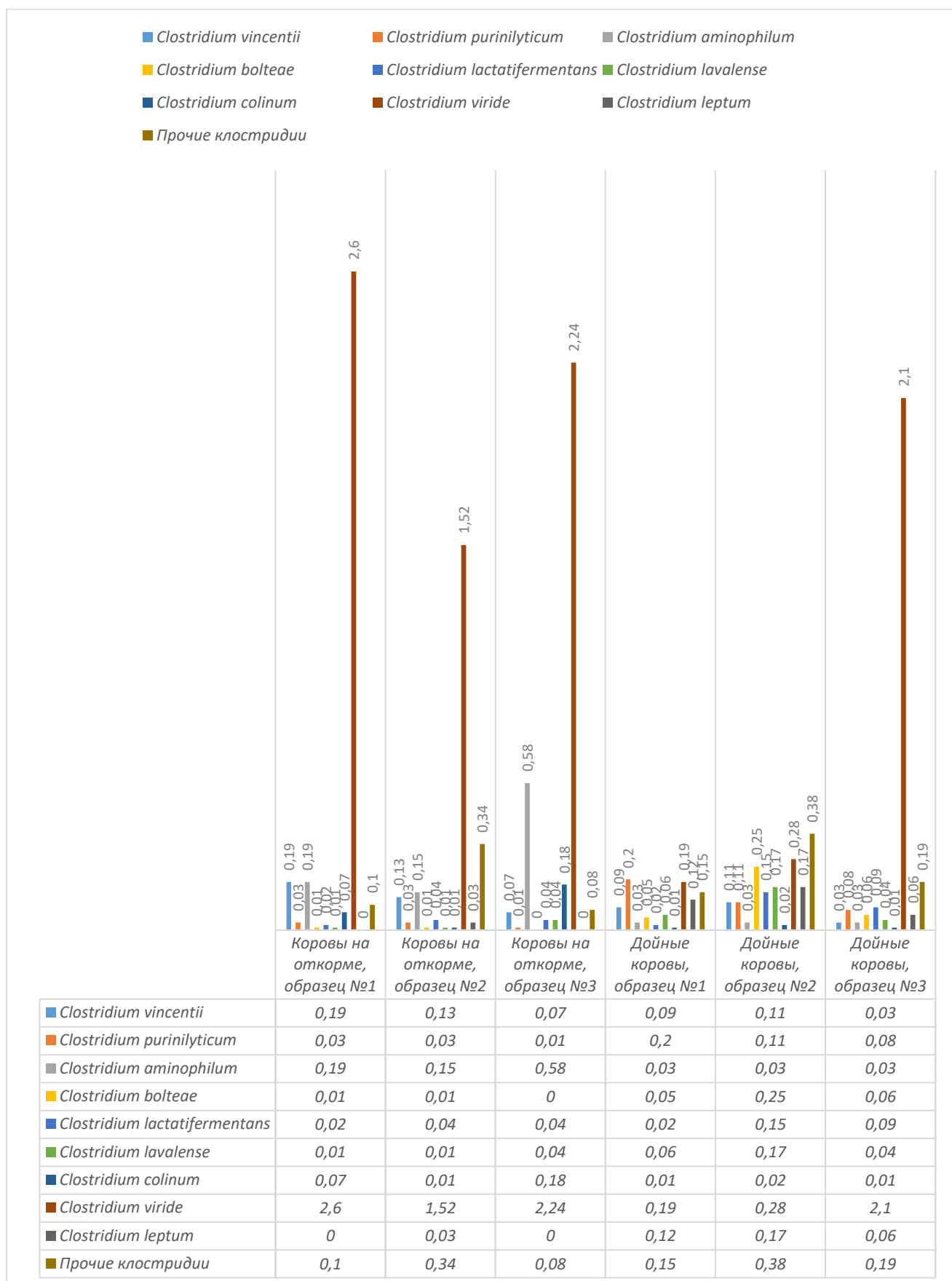
Отметили явное различие между двумя исследованными группами в содержании такого представителя семейства Lachnospiraceae, как *Clostridium aminophilum*. В среднем, количество данных бактерий у коров на откорме составляло 0,3% от всех обнаруженных в рубце микроорганизмов, что в 10 раз превосходило среднее содержание данных клостридий в рубце дойных коров (0,03%).

Среди проб рубцового содержимого коров дойного стада, напротив, явно выделялось присутствие представителя семейства Clostridiales Incertae Sedis XI, микроорганизма *Clostridium purinilyticum*. В среднем, содержание данного микроорганизма в пробах от коров дойного стада составляло 0,13% от всех обнаруженных микроорганизмов, что превышало содержание данного микроорганизма в рубце коров на откорме до 10 раз.

Статистические данные приведены в Таблице 10. Материал, представленный в таблице 10 опубликован в статье «Разнообразие форм клостридий в рубцовом содержимом дойных коров и коров на откорме» [51].

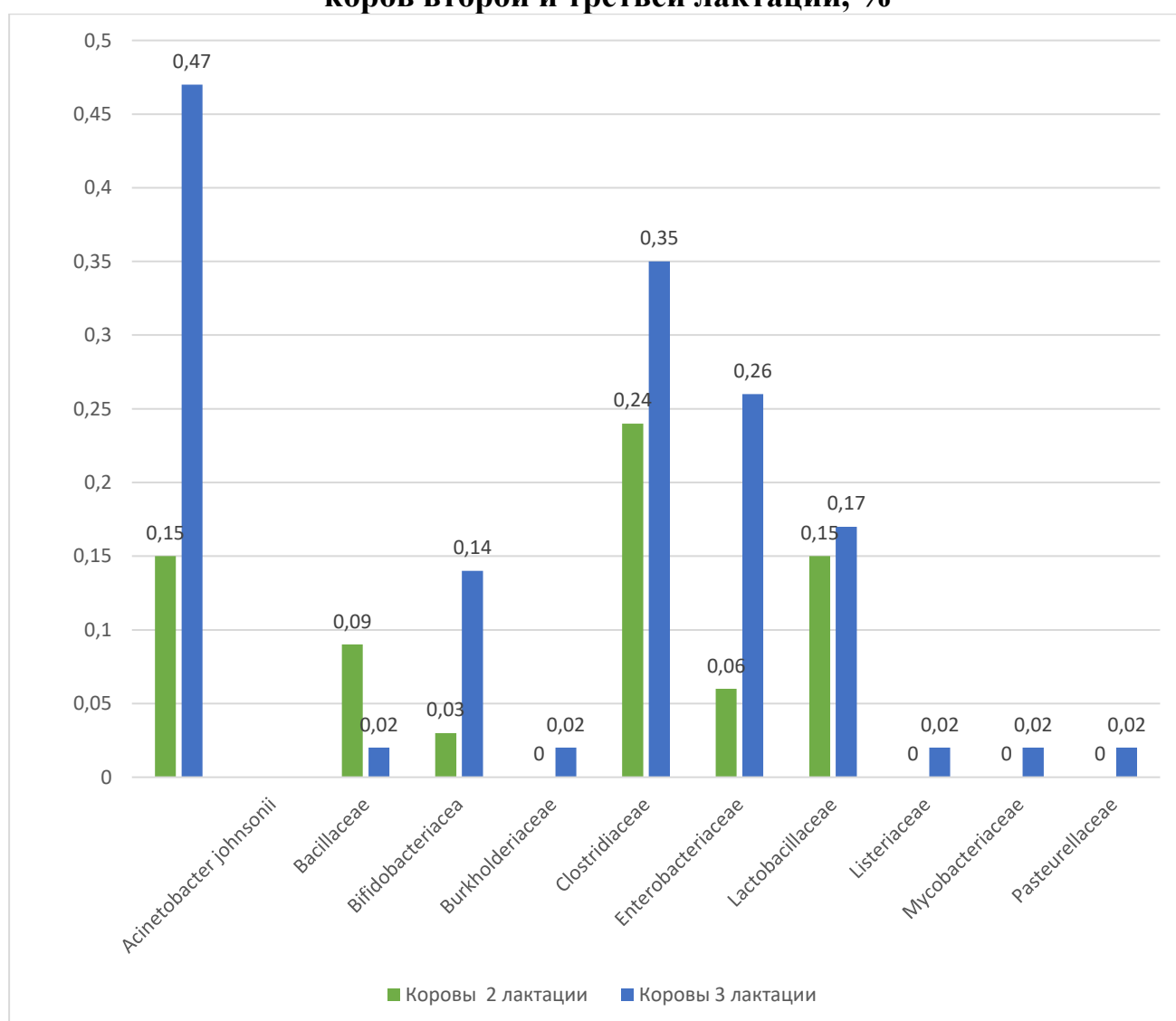
Установили, что к семейству Lachnospiraceae таксономически принадлежало большинство видов обнаруженных клостридий *Clostridium aminophilum*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium lactatifermentans*, *Clostridium lavalense*, *Clostridium colinum*.

Таблица 10 – Содержание форм клостридий в рубцовом содержимом дойных коров и коров на откорме, %



В результате исследования микрофлоры молозива коров (n=10 в каждой группе) с диарейным синдромом установили, что микробиальный состав молозива группы коров во время второй лактации существенно отличался микробиоты молозива коров дойного стада во время третьей лактации. Разнообразие видового состава микробиоты молозива в период третьей лактации было выше, чем в период второй. Статистические данные приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – Содержание бактерий различных семейств в молозиве коров второй и третьей лактации, %



Произошло существенное увеличение процентного содержания патогенных и условно-патогенных бактерий. Так, 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.

В ходе проведенного исследования установлено, что биоразнообразие микрофлоры молозива в третью лактацию увеличилось главным образом за счет патогенных микроорганизмов. Данное явление может негативно сказаться как на здоровье вымени коров, так и на состоянии здоровья новорожденных телят.

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

Результаты данного этапа исследования опубликованы в статье «Разработка и апробация тест-системы для полимеразной цепной реакции с целью выявления альфа-токсина *Clostridium perfringens*» [52].

Учитывая длительность определения микроорганизмов *Clostridium perfringens* общепринятыми методами, ПЦР в режиме реального времени с модифицированным нами зондом является быстрым и эффективным способом идентификации возбудителя. В результате апробации праймеров установили, что праймеры (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3' и (R) 5'-СССААGCGTAGACTTTAGTTGATG-3' являются высокочувствительными и специфичными к гену фосфолипазы С CPA. Праймеры сработали при реакции со всеми тремя экспериментальными испытуемыми концентрациями (Таблица 2, Таблица 3, Таблица 4) (Рисунок 20). Модернизированный за счет изменения гасителя флуоресценции зонд 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G-3' BHQ1, представляя собой олигонуклеотид, к которому присоединены молекула

флуорофора и молекула гасителя флуоресценции, отжигался на матрицу между прямым и обратным праймерами.

Наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции, что говорит о содержании и обнаружении гена фосфолипазы С α -токсина штамма *Clostridium perfringens* в исследуемых пробах.

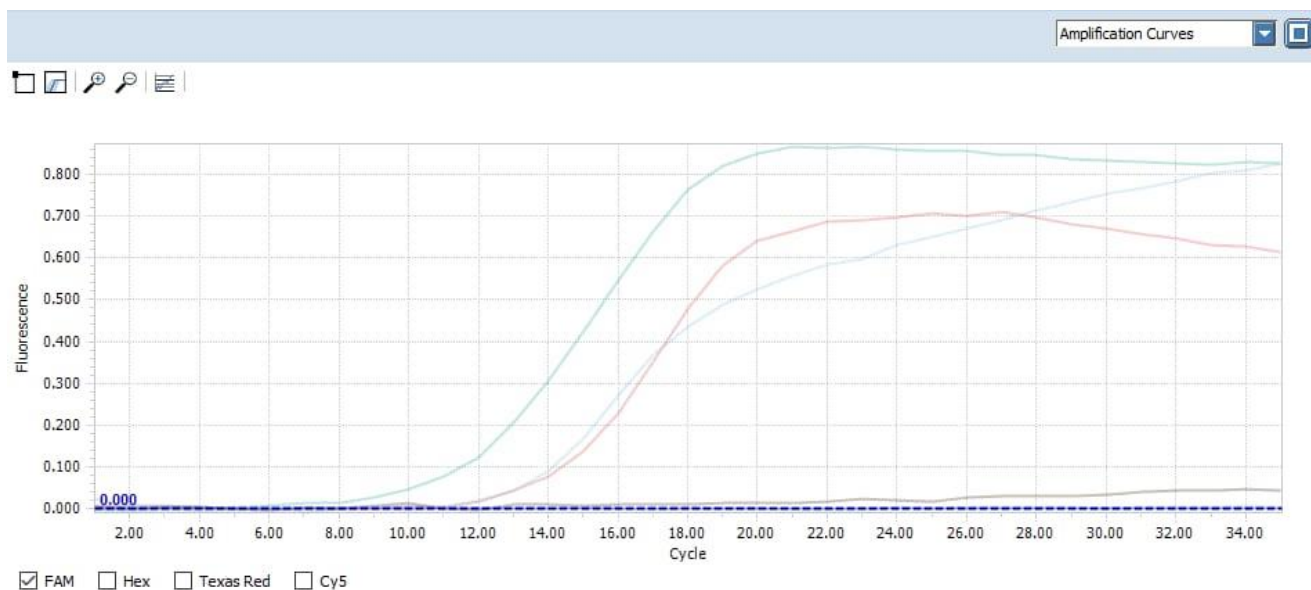


Рисунок 20 – Возрастающая экспонента проб с концентрациями №1, №2, №3 реагентов и ДНК *Clostridium perfringens*

В стрипе А7 использовали отрицательный контрольный образец выделения пробы, в стрипе В7 отрицательный контрольный образец реакции (Рисунок 21).

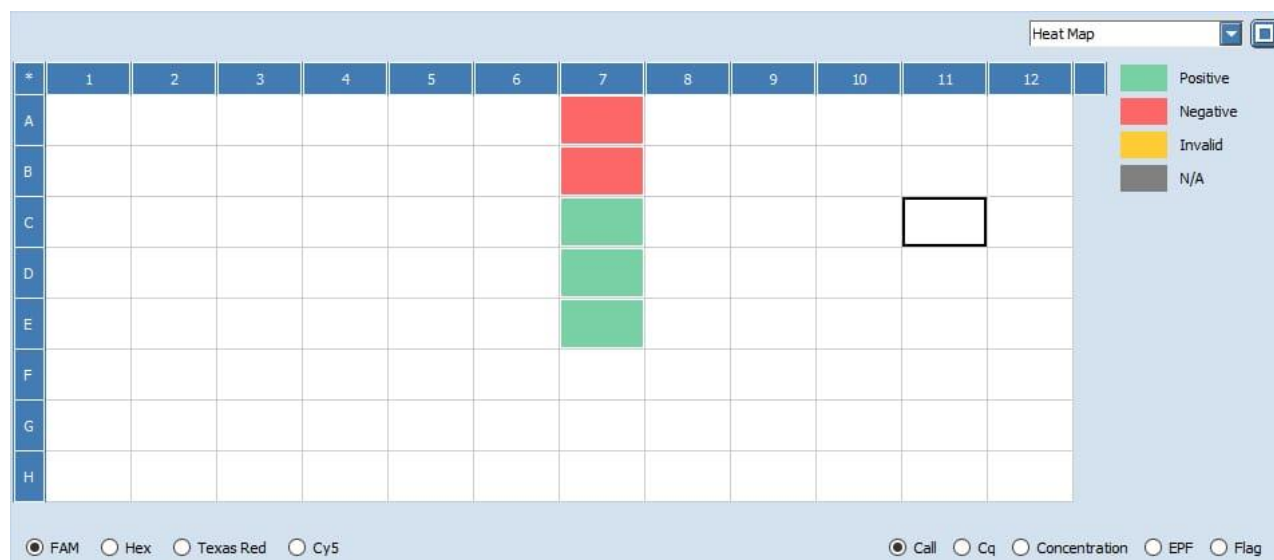


Рисунок 21 – Протокол исследования в программе Roche LightCycler 96

Сигнал флуоресценции (нм) в ходе ПЦР возрастал пропорционально количеству продукта амплификации.

Нами были сконструированы праймеры для детекции генов фосфолипазы С *CPA* (*plc*) штамма *Clostridium perfringens*, которые были апробированы на 383 пробах. Биологическим материалом служило содержимое кишечника, матки, молоко крупного рогатого скота разных возрастных групп, содержимое ран дистальных отделов конечностей. Животные условно были разделены на 3 группы в зависимости от возраста и физиологического состояния (Таблица 12. Определение и апробация праймеров для детекции *CPA*):

I - телята (0-12 месяцев);

II - нетели (12-20 месяцев);

III - коровы дойного стада (от 20 месяцев);

IV – навозный сток.

Материал представленный в таблице 12 опубликован в статье «Разработка и апробация тест-системы для полимеразной цепной реакции с целью выявления альфа-токсина *Clostridium perfringens*» [52].

Таблица 12 – Определение и апробация праймеров для детекции *CPA*

№	Группа	Отбираемый биологический материал	Клинические признаки	Количество результатов «+» положительных проб	Количество результатов «-» отрицательных проб
1	I	содержимое кишечника	диспепсия, повышенная температура тела, диарея	8	61
2	II	содержимое кишечника	диарея с примесью слизи и/или крови, отказ от корма	4	26
3	II	содержимое ран дистального отдела конечностей	раны с гнойно-некротическими участками	2	9

4	III	содержимое кишечника	диарея с примесью слизи и/или крови, отказ от корма	21	112
5	III	содержимое шейки матки, матки	слизь с примесью крови и участков слизистой оболочки	3	16
6	III	содержимое влагалища	слизь с примесью крови и участков слизистой оболочки	1	32
7	III	молоко	повышенная температура тела, потеря суточного удоя (кг), примесь хлопьев в молоке, гной в молоке	2	20
8	III	молозиво	повышенная температура тела	-	15
9	III	содержимое ран дистального отдела конечностей	раны с гнойно-некротическими участками	3	17
10	III	содержимое абсцессов	значительное повышение температуры тела, гнойное воспаление тканей	1	10
11	IV	содержимое навозного стока	-	20	-
Итого:				65	318

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.

В результате апробации праймеров с совершенствованной тест-системой ПЦР установили, что в I исследуемой группе (телята 0-12 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое прямой кишки 13,1% исследуемых проб оказались положительными.

В группе II (нетели 12-20 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое прямой кишки 15,4% исследуемых проб оказались положительными.

В группе II (нетели 12-20 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое ран дистального отдела конечностей 22,2% исследуемых проб оказались положительными.

В группах III (коровы дойного стада от 20 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое прямой кишки 18,7% исследуемых проб оказались положительными, как и в группе III, где предметом исследования являлось содержимое шейки матки, матки.

В группе III (коровы дойного стада от 20 месяцев), где материалом исследования являлось содержимое влагалища 3,1% исследуемых проб оказались положительными.

В группе III (коровы дойного стада от 20 месяцев), где предметом исследования служило молоко, 10% исследуемых проб оказались положительными. Гена фосфолипазы C *CPA* методом ПЦР в режиме реального времени в исследованных 15 пробах молозива группы III обнаружено не было.

Из исследованных проб содержимого ран дистальных конечностей животных группы III у коров дойного стада, 17,6% проб оказались положительными, из проб с содержимым абсцессов группы III на конечностях 10%. Кроме того, на территории 14 хозяйств исследовали материал из навозного стока (группа IV) – 20 из 20 исследованных проб содержали гены фосфолипазы C *CPA*.

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 22), обеспечивающих лабораторную диагностику, а именно:

1. Отбор проб проводить с учетом общих правил ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» и методическими указаниями 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 [66].

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 элективных и дифференциально-диагностических средах (Китта-Тароцци, Цейслера, глюкозо-красной агар, среда в комплекте к системе атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact для контроля роста анаэробов и др.) и биопробу.

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.

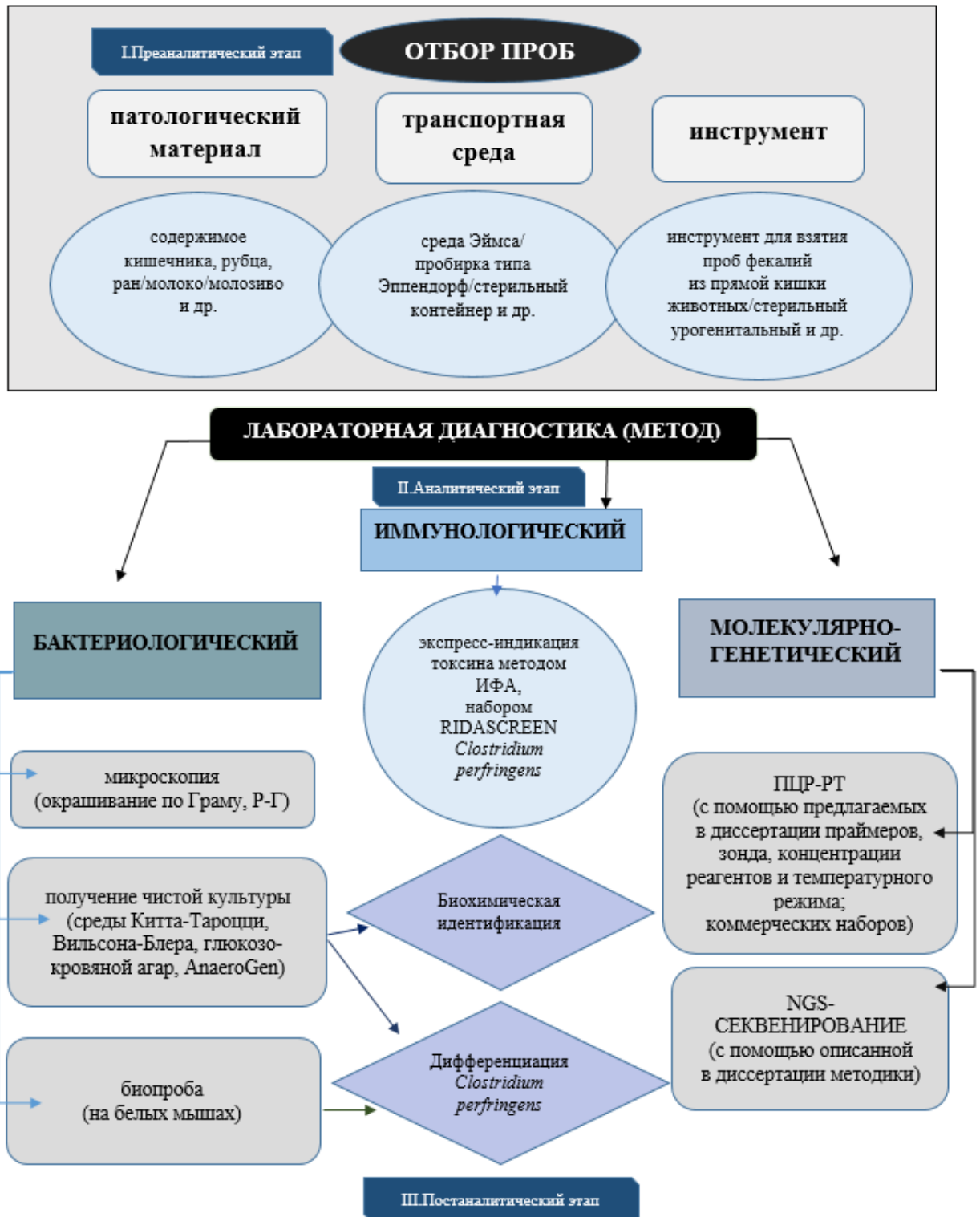


Рисунок 22 - Алгоритм диагностики диарей, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*

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

Разработанная стратегия диагностики является научной основой для применения индивидуального подхода к выбору терапии и к предотвращению развития осложнений, что способствует снижению затрат на лечение и приводит к положительной экономической эффективности.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Важным эпизоотическим, эпидемиологическим и экономическим аспектами является сохранение здорового поголовья: «...по статистике, основной причиной болезней молодняка крупного рогатого скота, являются болезни желудочно-кишечного тракта (до 100 %), на втором – поражения респираторного тракта (до 62,4 %), на третьем – полиартриты (до 49,1 %)», как сообщают Пудовкин Д.Н., Щепеткина С.В., Карпенко Л.Ю. и др. (2019); Капустин А. В. (2017) и др. [28, 73]. Для человека опасность представляет и мясо животных, поскольку споры *Clostridium perfringens* иногда сохраняют жизнеспособность при приготовлении пищи, поэтому обсеменение продукции животноводства данными микроорганизмами может привести к развитию клостридиозов у человека [28, 73, 102, 121, 146].

Крупный рогатый скот является как источником возбудителя инфекции, так и восприимчивым животным, а содержимое прямой кишки, биологический материал, подстилка, и инвентарь – факторами передачи возбудителя; тем самым периодически или одновременно являясь каждым звеном эпизоотической цепи (Сидорчук А. А., Кузьмин В. А., Алексеева С. В., 2021) [79]. «Современные методы проведения клинико-лабораторной диагностики диарей у телят и коров дойного стада, вызванные токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*, основаны на анализе комплекса эпизоотологических, клинических данных», результатах микробиологических исследований биоматериала, характеристике возбудителя и результатах оценки состояния микробиоты толстого кишечника [48, 74].

По исследованиям Лобзина Ю.В., Кветной А.С., Скрипченко Н.В. и др. (2021); Yang C.C., Hsu P.C., Chang H.J. и др. (2013), смертность больных людей бактериемией, вызванной *Clostridium perfringens*, составляет 27-44% [42]. Именно поэтому для разработки плана лечения и профилактики для людей и животных важен четкий алгоритм диагностики болезни, в зависимости от оснащения, реагентов, оборудования и используемых методик в лаборатории [42, 215].

По результатам наших исследований в материале, отбираемом от крупного рогатого скота с диарейным синдромом на территории Северо-Западного федерального округа, были обнаружены токсинпродуцирующие штаммы *Clostridium perfringens*. Положительные образцы из 254 проб содержимого прямой кишки регистрировали в 56,7% проб, из 8 проб тканей прямой кишки в 50%, из 42 проб гноя и содержимого ран, абсцессов животных в 14,3%, в 52 пробах содержимого матки, шейки матки и влагалища 7,7%, в 20 пробах содержимого навозного стока в 100% исследованных проб.

В результате бактериологических исследований установили, что токсинпродуцирующие штаммы *Clostridium perfringens*, в том числе штамм *Clostridium perfringens* CP322 растут на таких элективных и дифференциально-диагностических средах, как Китта-Тароцци, Вильсона-Блера, агар Цейслера, глюкозо-кровяной агар и промышленная готовая среда (в комплекте к системе атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact). Провели бактериоскопию нативных мазков и мазков из колоний. Нативные мазки из прямой кишки окрашивали методом Романовского-Гимзе - обнаружили толстые палочки со слегка закругленными концами, темно-фиолетового цвета и капсулой светло-розового цвета. Из колоний среды Китта-Тароцци и из колоний дифференциальных сред - среды Вильсона-Блера и глюкозо-кровяной агара Цейслера мазки окрашивали по Граму, в поле зрения зарегистрировали грамположительные толстые палочки со слегка закругленными концами, расположенные одиночно.

Выделенные культуры обладали характерным ростом для *Clostridium perfringens* на среде Китта-Тароцци, на жидкой среде Вильсона-Блера, на сахаро-кровяном агаре, на глюкозо-кровяном агаре Цейслера, имели типичную морфологию - грамположительные толстые палочки со слегка закругленными концами, расположенные одиночно, что согласуется с результатами исследований Васильева Д.А., Щербакова А.А., Карпуниной Л.В. и др. (2004); Литусова Н.В. (2017); Смирновой Л.И., Макавчик С.А. (2022) и др. [8, 41, 82].

Впервые описали рост колоний *Clostridium perfringens* на промышленной готовой среде из системы атмосферной генерации для *in vitro* диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact: регистрировали круглые, сочные, куполообразные S-колонии, с гладкими ровными краями, серовато-белые, мутные. Среда AnaeroGen W-ZIP Compact обладает рядом преимуществ, а именно отсутствием специальных условий хранения, устойчивостью рабочего субстрата, оптимальным составом питательных компонентов и др., что обуславливает рациональность ее применения в рутинной практике специалистами лабораторий.

Установили биохимические (ферментативные) свойства: изоляты *Clostridium perfringens* разжижает на 3-5 сутки желатин, в молоке вызывает быстрое свертывание, сбраживают с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу и галактозу. Полученные нами результаты согласуются с данными определителя бактерий Берджи Р. Беркли и др. (1997): все выделенные культуры по морфологическим, тинкториальным, и биохимическим свойствам являются типичными представителями вида *Clostridium perfringens*; с выводами к проведенным исследованиям Лобзина Ю.В., Кветной А.С., Скрипченко Н.В. и др. (2021); Хурамшиной М.Т., Махмутова А.Ф., Спиридонова Г.Н. и др. (2020); Hayase M., Mitsui N., Tamaï K., и др. (1974) [42, 63, 93, 136].

В результате экспресс-индикации энтеротоксина *Clostridium perfringens* в содержимом прямой кишки методом ИФА с помощью коммерческого набора RIDASCREEN *Clostridium perfringens* Enterotoxin (C0601, Германия) и иммунологического анализатора Multiskan FC с фильтрами 405, 450, 620 нм измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм; установили среднюю оптическую плотность $2,06 \pm 0,02$. Cut-off (пороговое значение) = 0,202. Пробы считались положительными, если значение их оптической плотности более чем на 10,0% выше рассчитанного cut-off.

В результате молекулярно-генетической диагностики штаммов *Clostridium perfringens* в содержимом прямой кишки крупного рогатого скота методом ПЦР в режиме реального времени, наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции - пороговый цикл по каналу Nex наблюдался в 9 из 16 проб на

26,5±4,7 цикле амплификации, что говорит о содержании ДНК *Clostridium perfringens* в исследуемых пробах. Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастал пропорционально количеству продукта амплификации. Чем больше количество ДНК в пробе, тем раньше наблюдали начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл [63]. Без типизации токсина «нельзя назвать обнаружение бактерий *Clostridium perfringens* основным этиологическим фактором болезни, так как у жвачных они входят в состав условно-патогенной микрофлоры, однако выявление высоких концентраций ДНК в исследуемом материале – быстрый и эффективный метод для постановки диагноза при ассоциированных диареях, а значит, и организации лечебных и профилактических мероприятий» [31, 35, 44, 91, 100, 171].

Данные результаты согласованы с результатами, полученными М.К. Оссиранди, Л. Зербини, Е.М. Болдыревой: «...бактерия *Clostridium perfringens* была выделена в пробах от 67,6 % телят, имевших признаки диареи (n=23 из 34), а все выделенные исследователями изоляты *Clostridium perfringens* относились к типу А», способным продуцировать *CPA*. На основании типизации токсина с помощью обнаружения генетических маркеров молекулярно-генетическим методом определяется этиология возбудителя, что позволяет поставить диагноз и оценить эпизоотическое благополучие при исследовании в том числе проб, полученных от здоровых животных, без диарейного синдрома в анамнезе [65].

Erol I., Goncuoglu M., Ayaz N.D. в 2008 году с помощью мультиплексной ПЦР анализировали гены токсинов *CPA*, *CPB*, *CPB2*, *ETX* и *CPE* токсинов. Все 22 пробы мяса индейки, как было обнаружено, несут ген *CPA Clostridium perfringens*, но ни в одном из изолятов не были обнаружены гены *CPB*, *ETX* или *CPE*. Результаты показали, что все изоляты представляли тип А и были *CPE*-отрицательными. Исследования авторов подтверждают, что ПЦР-диагностика является качественной для определения токсигенности *Clostridium perfringens* в пробах. А-токсин *Clostridium perfringens* обнаруживается в мясе и других биологических пробах, что угрожает биобезопасности животноводческих предприятий, рынков, магазинов и др. [121, 129, 130, 190, 196].

Исследователями сообщалось о регистрации бактерий рода *Clostridium* в рубце как комменсальных микроорганизмов, а бактерий вида *Clostridium perfringens* - как представителей условно-патогенной микрофлоры [165, 210]. С целью индикации генов *Clostridium perfringens* в содержимом рубца нами был выбран метод NGS секвенирования. Уникальность и актуальность метагеномных исследований с использованием платформ NGS позволяют установить случаи коинфицирования патогенами, для выявления которых отсутствуют коммерческие ПЦР тест-системы, как сообщают А.Е. Алексеева и Н.Ф. Бруснигина (2015) [1]. По результатам секвенирования нового поколения микробиома рубца коров в 2 группах коров (дойного стада и коров на откорме) установлено отсутствие патогенных клостридий. При исследовании содержимого рубца, полученного от коров на откорме, наиболее часто встречался представитель семейства *Ruminococcaceae*, бактерия *Clostridium viride*, содержание которой достигало 2,6% от всех микроорганизмов, обнаруженных в содержимом рубца коров. Данная бактерия, ранее носившая название *Clostridium aminovalericum*, имеет в качестве продуктов ферментации (в зависимости от субстрата роста) аммиак, ацетат, пропионат, бутират и валерат. В рубце коров соединения ацетата и бутирата имеют большое значение для физиологических показателей, поскольку влияют на рост и развитие ворсинок рубца, при использовании данных коров с целями откорма» [50].

При снижении количества бактерий, обладающих целлюлозолитической активностью, по исследованиям Мирошниковой М.С. (2020), в кишечнике коров создается благоприятная среда для развития условно-патогенной микрофлоры, в том числе *Clostridium perfringens*, факторы патогенности которого могут привести к цитопатогенному действию на энтероциты [46]. В пробах содержимого рубца, полученных от дойных коров, количество *Clostridium viride* также было велико (достигало 2,1% от всех обнаруженных микроорганизмов). Согласно исследованиям, проведенным Buckel, W., Janssen, P.H., Schuhmann, A. и др. (1994), «*Clostridium viride* также повышают продуцирование коровами молочного жира» [109].

«Необходимо отметить явное различие между двумя исследованными группами в содержании такого представителя семейства *Lachnospiraceae*, как *Clostridium aminophilum*. В среднем, количество данных бактерий у коров на откорме составляло 0,3% от всех обнаруженных в рубце микроорганизмов, что в 10 раз превосходило среднее содержание данных клостридий в рубце дойных коров (0,3%). По исследованиям, проведенным Paster В. J. и Russell J. В., данные микроорганизмы определяются как рубцовые микробы, роль которых складывается из продуцирования аммиака, за счет поступающих в рубец аминокислот.

Среди проб рубцового содержимого коров дойного стада, напротив, явно выделялось присутствие представителя семейства *Clostridiales Incertae Sedis XI*, микроорганизма *Clostridium purinilyticum*. В среднем, содержание данного микроорганизма в пробах от коров дойного стада составляло 0,13% от всех обнаруженных микроорганизмов, что в среднем превышало содержание данного микроорганизма в рубце коров на откорме до 10 раз. Роль данных микроорганизмов, согласно исследованиям Durre P., Andersch W., и Andreesen J.R. (1981), заключается также в ферментировании аминокислот. При использовании аденина в качестве пуринового субстрата роста, данная клостридия в процессе ферментации производит ацетат, формиат, углекислый газ и аммиак» [51, 118, 178]. В своих исследованиях Matthews С., Crispie F., Lewis E. и др. (2019) утверждают, что секвенирование гена 16S рРНК, что по методологии совпадает с нашими исследованиями, было впервые использовано для изучения микробных экосистем рубца, а обширный охват видов с низкой численностью позволил проанализировать авторам редкие микробные сообщества [165]. Секвенирование также показало, что *Prevotella*, *Butyrivibrio* и *Ruminococcus* были наиболее доминирующими бактериями в рубце, и что на структуру сообщества влияют изменения в рационе животного; в частности, было показано, что многокомпонентность рациона способствует увеличению микробного разнообразия.

Определили видовой состав микробиома молозива коров методом секвенирования нового поколения (NGS-секвенирования). В результате исследования установили, что «...большинство видов обнаруженных клостридий таксономически принадлежало к семейству *Lachnospiraceae* (*Clostridium aminophilum*, *Clostridium bolteae*, *Clostridium lactatifermentans*, *Clostridium lavalense*, *Clostridium colinum*). Наряду с бактериями семейства *Ruminococcaceae* (*Clostridium viride*, *Clostridium leptum*) данные бактерии относятся к представителям целлюлозолитической микрофлоры, помогающей организму коров разлагать клетчатку и обеспечивать более эффективную усвояемость питательных веществ корма» [50, 188].

В результате исследования микрофлоры молозива установили, что микробиальный состав молозива группы коров во время второй лактации существенно отличался микробиоты молозива коров дойного стада во время третьей лактации. Разнообразие видового состава микробиоты молозива в период третьей лактации было выше, чем в период второй.

Произошло существенное увеличение процентного содержания патогенных и условно-патогенных бактерий. Так, было обнаружено, что «...в третью лактацию процентное содержание *Acinetobacter johnsonii* увеличилось в 3,1 раза. Процент представителей семейства *Enterobacteriaceae* увеличился в 4,4 раза. Также, в третью лактацию были обнаружены представители семейств патогенов, отсутствовавшие во вторую (*Burkholderiaceae*, *Listeriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*)» [104]. Произошло уменьшение доли антагонистов патогенов – представителей семейства *Bacillaceae* более, чем в 3 раза. Однако, доля представителей семейства *Bifidobacteriaceae* возросла в 4,7 раза, а количество полезных лактобактерий осталось на том же уровне. Также, возбудитель пневмонии телят *Enterobacter hormaechei* в пробах молозива в третью лактацию не был обнаружен. Биоразнообразие микрофлоры молозива в третью лактацию увеличилось главным образом за счет патогенных микроорганизмов. Данное явление может негативно сказаться как на здоровье вымени коров, так и на состоянии здоровья новорожденных телят. Микробиальный состав молозива

изучали такие исследователи, как Van Hese I., Goossens K., Ampe B. и др. в 2022 году [209]. В пробах молозива от коров преобладали микроорганизмы типа *Proteobacteria*, за которым следовали *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*, что согласуется с проведенными нами исследованиями.

Для эффективного лечения важно верно определить возбудителя инфекции. Исследователи проводят дифференциацию бактерий *Clostridium perfringens* от анаэробных или факультативно анаэробных микроорганизмов и их ассоциаций, вызывающих газовую гангрену, эмфизематозный карбункул, паратиф, некробактериоз, колибактериоз и др. [11, 32, 46, 48, 71, 73, 91, 93, 97, 135, 205]. В результате исследований выделяли изоляты таких облигатных и факультативных анаэробных микроорганизмов, как 12,6% *Clostridium perfringens*, 14,2% *Clostridium spp*, 4,5% *Fusobacterium necrophorum*, 21,3% *Escherichia coli*, 8,7% *Streptococcus spp*, 14,1% *Salmonella enterica*, 2,0% *Proteus vulgaris* и 22,6% их ассоциаций. В своих исследованиях А. С. Конищева, Н. А. Лещева, В. И. Плешакова при изучении микробиологического спектра возбудителей желудочно-кишечной патологии у животных в 2022 году выделяли культуры 12 видов энтеробактерий, относящихся к 9 родам: *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* и *Yersinia* [38]. Как сообщают Н.В. Пименов, Ю.Н. Колесникова, А.В. Капустин в 2016 году, при разведении высокопродуктивного скота нарушения полноценности и сбалансированности кормления вызывают патологию желудочно-кишечного тракта, которая осложняется анаэробными инфекциями, которых важно дифференцировать для определения вирулентности, в частности, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium novyi*, *Clostridium oedematiens* [71]. Спиридонов А.Г., Махмутов А.Ф., Спиридонов Г.Н. и др. в 2022 году в своих исследованиях «...в 65 % случаях из патологического материала от больных и павших от анаэробной энтеротоксемии телят выделяли смешанную культуру – ассоциацию бактерий *Clostridium perfringens* и *Streptococcus spp*» [83].

Комаров В.Ю., и Tadepalli S. и др. утверждают, что основной возбудитель болезней копыт – *Fusobacterium necrophorum* [37, 200]. Особенностью протекания

заболевания является присутствие гнойно-раневой микрофлоры: *Clostridium perfringens* тип А, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces pyogenes* и другие, которые формируют микробные ассоциации в природе и организме животных, усиливая своими ферментативными системами действие основных возбудителей и тем самым увеличивая вирулентность последних в десятки раз: преимущественно поражается кожа и подкожная клетчатка межкопытной щели, дорсальная и волярная поверхности пясти (плюсны) [37]. Спектр бактерий, выделяемых авторами из проб, отобранных из желудочно-кишечного тракта и раневых поверхностей дистальных отделов конечностей крупного рогатого скота согласуется с нашими результатами.

Дифференцию изолятов *Clostridium perfringens* от изолятов *Fusobacterium necrophorum* проводили бактериологическим методом и подтверждали ПЦР. В результате заражения белых мышей эмульсией из патологического материала – суспензии из содержимого ран копыта и межпальцевой щели на физиологическом растворе, на 3 день наблюдали в окружности инъекции опухоль и нагноение, на 6 день – некроз, на 12 день регистрировали гибель мыши, при патологоанатомическом вскрытии наблюдали некроз мышц конечностей, гнойные очаги в печени, легких, сердце, откуда получили чистую культуру [47]. Данные совпадают с последовательностью проведения биопробы, описанной В. Н. Кисленко, Н. В. Колычев, О. С. Суворина (2007) [33].

Как сообщают Д.А. Васильев, А.А. Щербаков, Л.В.Карпунина и др. (2004), «...идентификация микроорганизма осуществляется набором стандартных тестов — подвижность, серологические реакции и др.; *Clostridium perfringens* также можно идентифицировать по росту на яичном агаре: колонии *Clostridium perfringens* окружены опалесцирующим белым «преципитатом», появляющимся под действием α -токсина; образование зон преципитации можно ингибировать, наслив на половину чашки специфическую антисыворотку одновременно с посевом тест-культуры» [8].

«А-токсин штамма *Clostridium perfringens* вызывает до 25,0 % летальных исходов среди поголовья крупного рогатого скота...», по исследованиям Козлова А. Д., Горбачева Н. С., Клименкова О. В. и др (2017) [35].

Токсигенность *Clostridium perfringens* зависит от экспрессии генов, кодирующих токсинообразование, расположенных на плазмидах. Ассоциация многих генов токсинов с инсерционными последовательностями и конъюгативными плазмидами обеспечивает вирулентность при возникновении кишечных инфекций. Однако проблемы несовместимости, по-видимому, ограничивают количество плазмид токсинов, поддерживаемых одной клеткой, по исследованиям Freedman J.C., Theoret J.R., Wisniewski J.A. и др. в 2015 году [126]. Данный факт обуславливает цитопатогенное действие штаммов *Clostridium perfringens*, продуцирующих гена фосфолипазы С CPA.

В результате апробации праймеров установили, что праймеры (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3' и (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3', апробированные Chon J.W., Park J.S., Нyeon J.Y. и др. в Сеуле, Южная Корея в 2012 году, «...являются высокочувствительными и специфичными к гену фосфолипазы С CPA [114]. Праймеры сработали при реакции со всеми тремя экспериментальными испытуемыми концентрациями» (Таблица 2, Таблица 3, Таблица 4) [52]. В отличие от авторов, вместо гасителя флуоресценции TAMRA в наших исследованиях для наибольшей эффективности учета реакции использовали гаситель флуоресценции BHQ1. Гаситель флуоресценции представляет собой молекулу, спектр поглощения которой лежит в области длин волн спектра испускания флуорофора. Тушение флуоресценции произошло благодаря безызлучательному переносу энергии от молекулы флуорофора к молекуле гасителя и рассеиванию энергии. Модернизированный за счет замены гасителя зонд 5'-FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G-3' BHQ1, представляя собой олигонуклеотид, к которому присоединены молекула флуорофора и молекула гасителя флуоресценции, отжигался на матрицу между прямым и обратным праймерами. Преимуществом гасителя флуоресценции BHQ1 является способность гасителя спектрально

соответствовать характеристикам канала FAM, высокие уровни точности и приемлемая эффективность амплификации, доступность для производства на территории Российской Федерации. В результате исследований Dinah D. Tambalo и др. (2012), при сравнении эффективности гасителя BHQ1 вместо TAMRA, при обнаружении сигнала флуоресценции, чувствительность и специфичность анализа оказались одинаковы для двух гасителей [201].

По протоколу исследования в программе Roche LightCycler 96 наблюдали экспоненциальный рост флуоресценции по каналу Fam, что говорит о содержании и обнаружении гена фосфолипазы С *CPA* (*plc*) штамма *Clostridium perfringens* в исследуемых пробах.

По результатам ПЦР в режиме реального времени установлено, что из 383 проб 65 экспоненциальный рост флуоресценции - пороговый цикл по каналу по FAM каналу на $26,24 \pm 3,9$ цикле амплификации, что говорит о содержании гена фосфолипазы С *CPA* в исследуемых пробах. Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастал пропорционально количеству продукта амплификации [52].

В результате апробации праймеров, подобранной концентрации реагентов и режима амплификации установлено, что праймеры обладают высокой чувствительностью и специфичностью, а исследование – повторяемостью и воспроизводимостью. Наибольший процент обнаружения гена фосфолипазы С *CPA* *Clostridium perfringens* в содержимом ран дистального отдела конечностей, содержимом прямой кишки, матки и шейки матки. Результаты нашего исследования согласуются с исследованием Безбродовой Н.А., Шиловой Е.Н., Кожуховской В.В. и Мартынова Н.А.: сотрудники ФГБНУ УрФАНЦ УрО РАН установили, что гены, кодирующие токсинообразование *Clostridium difficile* и *Clostridium perfringens* обнаруживаются в пробах кала (22,6 %), в патматериалах (5,0 %) от павших телят и коров, а также в биообразцах молока (8,0 %).

Chon J.W., Park J.S., Hyeon J.Y. и др. предложили концентрацию, близкую к концентрации №2, где в реакционную смесь вносится 5 мкл ДНК. В наших исследованиях, реакционная смесь с ДНК объемом 2 мкл имела наибольший рост

флуоресценции и положительный результат в автоматическом протоколе исследования ПЦР в режиме реального времени.

Кроме того, авторы исследовали чистую культуру, в наших исследованиях использовали выделенные пробы с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В», выделяли ДНК из биологического материала – содержимое кишечника, влагалища, молоко непосредственно из соска, некротизированные или гнойные участки ран копыт и пальцев, пробы из автоматизированного навозного стока. Данный метод позволяет в существенно более короткий срок провести лабораторную диагностику [114].

Апробированный нами алгоритм диагностики диарей, вызванной токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* представляет собой трехступенчатую систему клинико-лабораторной диагностики бактериологическим, иммунологическим и молекулярно-генетическим методами.

Алгоритм позволит ветеринарным врачам в зависимости от оснащения лаборатории провести идентификацию возбудителя энтеротоксемии крупного рогатого скота.

Используемые в работе методы лабораторной диагностики имеют ряд преимуществ и недостатков. Бактериологический метод является самым экономическим выгодным, обладая безусловным преимуществом, однако требует больших временных и кадровых затрат – пробы для исследования необходимо немедленно направлять в лабораторию либо помещать в консервант, отправление проб осуществлять с помощью нарочного. Культивация и идентификация бактерий рода *Clostridium* квалифицированными специалистами до вида может занимать до 7 дней. Иммунологический метод лабораторной диагностики является строго специфичным и быстрым, однако сегодня рынок производства реагентов развивается, типизация токсина возможна лишь при определенных условиях – наличия специфичных реагентов и оборудования. Молекулярно-генетические методы диагностики – NGS секвенирование и ПЦР-РТ являются высокочувствительными методами экспресс-диагностики, обладающими широким

спектром исследования для детекции генов клостридий, однако требуют экономических затрат.

Таким образом, внедрение алгоритма лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*, позволяет на 20,0% эффективнее относительно общепринятых методик выявить токсинпродуцирующие штаммы *Clostridium perfringens* в исследуемом от животных материале и, тем самым, установить этиологию диарей. Снижение затрат на лечение при своевременно поставленном диагнозе приводит к положительной экономической эффективности животноводческого комплекса.

4. 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.

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 зоогигиеническим 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).

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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность коллективам научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, ООО «БИОТРОФ», научно-исследовательскому консультационно-диагностическому центру по птицеводству ФГБОУ ВО СПбГУВМ и профессорско-преподавательскому составу кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА - иммуноферментный анализ

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

НКДЦ - научно-исследовательский консультационно-диагностический
центр по птицеводству ФГБОУ ВО СПбГУВМ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР – РТ– полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РФ – Российская Федерация

ФГБОУ ВО СПбГУВМ – Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет ветеринарной медицины»

CPA – альфа токсин *Clostridium perfringens*

CPB – бета токсин *Clostridium perfringens*

ETX – эпсилон токсин *Clostridium perfringens*

ITX – йота токсин *Clostridium perfringens*

CPE – энтеротоксин токсин *Clostridium perfringens*

CPB2 – бета-2 токсин *Clostridium perfringens*

NETB – NetB токсин *Clostridium perfringens*

BEC – бинарный энтеротоксин *Clostridium perfringens*

ПКО – положительный контрольный образец

ОКО – отрицательный контрольный образец

ВКО – внутренний контрольный образец

Сt – цикл амплификации

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева А. Е. Метагеномные исследования и диагностика инфекционных заболеваний / А. Е. Алексеева, Н. Ф. Бруснигина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, – 2015. – № – С. 81-89.
2. Алешкевич, В. Н. Совершенствование специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии телят: Автореф. дис. канд. вет. наук. – Витебск, 1992. – 19 с.
3. Арзымбетов, Д. Е. Биологические свойства штаммов *Cl. Perfringens* / Д. Е. Арзымбетов, Д. Сарыбаева, А. Елубай // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. – 2017. – № 4(45). – С. 265-267.
4. Безбородова, Н. А. Современный подход к проблеме клостридиозов в животноводстве: отбор проб, лабораторная диагностика, профилактика / Н. А. Безбородова // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2020. – № 3(35). – С. 392-402. – DOI 10.36871/vet.san.hyg.ecol.202003016.
5. Бессарабов, Б. Ф. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е. С. Воронин. – М.: КолосС, 2007. – 671 с.
6. Болезни молодняка крупного рогатого скота: практические рекомендации / Д. Н. Пудовкин, С. В. Щепеткина, Л. Ю. Карпенко [и др.] – 2-е издание дополненное. – СПб.: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2019. – 204 с. – EDN JVHOLI.
7. Борисович, Ю. Ф. Инфекционные болезни животных. – М.: Агропромиздат, 1987. – 288 с.
8. Васильев, Д. А. Методы частной бактериологии: учебно-методическое пособие / Д. А. Васильев, А. А. Щербаков, Л. В. Карпунина [и др.] // Ульяновск, 2004. – 222 с. – URL: https://www.ulsu.ru/media/documents/mu_metodi_hastnoi_bakterologii.PDF (дата обращения: 12.10.2022).

9. Видовой состав клостридий, выделенных от сельскохозяйственных животных на территории отдельных регионов РФ / А. В. Супова, А. В. Капустин, Н. В. Пименов, М. Бангура // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения: Сборник трудов научно-практической конференции, Москва, 08 ноября 2022 года / Под общей редакцией С.В. Позябина, Л.А. Гнездиловой. – Москва: Сельскохозяйственные технологии, 2022. – С. 305-307.

10. Глотов, А. Г. Особенности проявления легочного пастереллеза молодняка КРС в хозяйствах по производству молока / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, К. В. Войтова [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2012. – № 2. – С. 55-61.

11. Глотов, А. Г. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, А. В. Нефедченко [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2008. – № 3. – С. 72–78.

12. Головкин, И. Д. Лечебно-профилактические мероприятия при энтеротоксемии телят / И. Д. Головкин, Г. М. Бутузов, Ф. А. Емченко [и др.] // Диагностика, патогенез и лечение инфекционных и инвазионных заболеваний сельскохозяйственных животных. – 1984. – С. 25-26.

13. ГОСТ 10444.9-75. Консервы. Методы микробиологического анализа. Выявление *Clostridium perfringens*. – М.: Стандартинформ, 2010. – 7 с.

14. ГОСТ 26503-85. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов. – М.: Ордена «Знак почета» издательство стандартов. – 1985. – 16 с.

15. ГОСТ Р 51446-99. Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований. – М.: Стандартинформ, 2005. – 31 с.

16. ГОСТ Р 57989-2017. Продукция пищевая специализированная. Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции. – М.: Стандартинформ, 2017. – 31 с.

17. ГОСТ Р ИСО 15189-2006. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности. – М.: Стандартиформ, 2007. – 39 с.

18. Дубина, И. Н. Методические указания по отбору биологического материала для проведения лабораторных исследований / И. Н. Дубина. – Витебск: Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 2008. – 20 с.

19. Зеленовский, Н. В. Анатомия животных. / Н. В. Зеленовский, К. Н. Зеленовский // – СПб.: Лань, 2014. – 844 с.

20. Инструкция по применению вакцины "Коглавакс" поливалентная инактивированная против клостридиоза крупного рогатого скота, овец и коз (организация-разработчик – «Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals. Co. Ltd.», Венгрия) – URL: https://xn--80ajgpcpbhkds4a4g.xn--p1ai/vetpreparaty/?f_g=vakciny_syvorotki_fagi_i_anatoksiny_v_kombinaciyah&preparat=koglavaks (дата обращения 16.04.2023)

21. Инструкция по применению вакцины "Ультрачойс 8" для профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец инактивированной (организация-разработчик – компания "Zoetis Inc", США). – М.: ООО "Зоэтис", 2018. – 2 с.

22. Инструкция по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная "Клостбовак-8" (организация-разработчик – ООО "Ветбиохим", 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16). – М.: Ветбиохим, 2022. – 2 с. – URL: http://www.td-prostore.ru/upload/shop_3/9/3/2/item_932/shop_property_file_932_762.pdf (дата обращения: 12.10.2022).

23. Инструкция по применению вакцины против клостридиозов сельскохозяйственных животных инактивированной "АНТОКС 9" (организация-разработчик – ФКП "Ставропольская биофабрика", г. Ставрополь). – Ставрополь: ФКП "Ставропольская биофабрика", 2018. – 2 с.

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

25. Казакова, О. Д. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (PCR real-time) с использованием микрочипового амплификатора / О. Д. Казакова, С. А. Бревнова, С. А. Макавчик // Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки: Электронный сборник статей по материалам LIII студенческой международной научно-практической конференции., Новосибирск, 08-18 июня 2017 года. – Новосибирск: Ассоциация научных сотрудников "Сибирская академическая книга", 2017. – С. 7-11.

26. Капустин, А. В. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота / А. В. Капустин, А. В. Моторыгин, Н. К. Букова // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 1. – Вып. 64. – С. 71–73.

27. Капустин, А. В. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота / А. В. Капустин, А. И. Лаишевцев, А. Д. Склярков [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2016. – № 4. – С. 15-17.

28. Капустин, А. В. Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота / А. В. Капустин, Т. И. Алипер // Единый мир – единое здоровье: Материалы конгресса, Уфа, 19. – 21 апреля 2017 года. – Уфа: Российская ветеринарная ассоциация, 2017. – С. 106-108.

29. Капустин, А. В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота // Конференция "Лекарственные препараты для животных". – Москва, ВГНКИ. – 2011. – С. 53-54.

30. Капустин, А. В. Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец: диссертация ... доктора биологических наук: 06.02.02 / Капустин Андрей Владимирович; [Место защиты: Федер. науч. центр - Всерос. науч.-исслед. ин-т эксперимент. ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН]. - Москва, 2019. – 288 с.

31. Кветная, А. С. *Clostridium perfringens* – антибиотико-ассоциированные и спорадические диареи у детей: возрастные, анамнестические и клинико-лабораторные характеристики. *Медицинский алфавит*. 2021. – № 32. – С. 10–15.
32. Кириллов, Л. В. Инфекционная анаэробная энтеротоксемия животных / Л. В. Кириллов, З. Х. Межиева // *Российский ветеринарный журнал сельскохозяйственных животных*. – 2007. – № 3. – С. 4-6
33. Кисленко, В. Н. *Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 3. Частная микробиология: учебник* / В. Н. Кисленко, Н. В. Колычев, О. С. Суворина. – М.: КолосС, 2007. – 215 с.
34. Клостридиозы сельскохозяйственных животных / А. К. Мусаева, Н. Н. Егорова, Е. Шакибаев, Н. Өзбекбай // *Национальная Ассоциация Ученых*. – 2022. – № 81. – С. 6-14. – DOI 10.31618/NAS.2413-5291.2022.1.81.609.
35. Козлова, А. Д. Использование молекулярно-генетических методов для типирования *Clostridium perfringens* / А. Д. Козлова, Н. С. Горбачева, О. В. Клименкова [и др.] // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. – Вып. 63. – № 3. – 2017. – С. 188-194.
36. Колычев, Н. М. *Ветеринарная микробиология и иммунология* / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов // 3-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2003. – С. 289-294.
37. Комаров, В. Ю. Профилактика болезней конечностей КРС / В. Ю. Комаров // *Научный журнал молодых ученых*. – 2021. – № 4(25). – С. 6-11.
38. Конищева, А. С. Микробиологический спектр возбудителей при желудочно-кишечной патологии у животных / А. С. Конищева, Н. А. Лещева, В. И. Плешакова // *Вестник КрасГАУ*. – 2022. – № 2(179). – С. 106-112. – DOI 10.36718/1819-4036-2022-2-106-112.
39. Крамер Ю. Н. Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* и его эффективность при анаэробной энтеротоксемии телят : диссертация ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.02 / Крамер Юлия Николаевна; [Место защиты: ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина»]. - Москва, 2020. - 171 с. : ил.

40. Кулагина, М. Г. Дифференциальная диагностика острых диарейных инфекций // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – № 4. – 2013. – С. 39-47.

41. Литусов, Н. В. Возбудители клостридиальной анаэробной инфекции. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: УГМУ, 2017. – 19 с.

42. Лобзин, Ю. В. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens* / А. С. Кветная, Н. В. Скрипченко, Л. И. Железова – DOI 10.36233/0372-9311-37. – Текст : электронный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2021. – Т. 98. – № 1. – С. 91-97. – URL: <https://microbiol.crie.ru/jour/article/view/1304> (дата обращения: 12.10.2022)

43. Макавчик, С. А. Механизмы резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от крупного рогатого скота / С. А. Макавчик, А. Л. Кротова, Ж. Е. Баргман [и др.] - DOI 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41. – Текст : электронный // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 4. – С 41–46. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=44415851> (дата обращения: 12.10.2022)

44. Макавчик, С.А. Лабораторные методы контроля полирезистентных возбудителей бактериальных болезней животных и рационального применения антимикробных препаратов : монография / С. А. Макавчик, А. А. Сухинин, С. В. Енгашев [и др.] // СПб.: Изд-во ВВМ, 2021. – 152 с.

45. Макаров, В.В. Основы учения об инфекции / В.В. Макаров, А.К. Петров, Д.А. Васильев (учебное пособие) Москва / Ульяновск. РУДН / УлГАУ - 2018. – 160 с.

46. Мирошникова, М. С. Основные представители микробиома рубца (обзор) / М. С. Мирошникова // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103, № 4. – С. 174-185. – DOI 10.33284/2658-3135-103-4-174. – EDN AGNCZZ.

47. 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.

48. 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.

49. 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.

50. 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.

51. 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.] – DOI 10.17238/issn2072-2419.2021.1.205. – Текст : электронный // Международный вестник ветеринарии. – 2021. – № 1. – С. 205-208. – URL: <https://vetjournal.spbguvm.ru/jour/article/view/633> (дата обращения 12.10.2022).

52. 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.

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

54. 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.

55. Моисеева, К. А. Технология идентификации штаммов *Clostridium perfringens*, продуцирующих энтеротоксин / К. А. Моисеева, А. А. Сухинин [и др.] // 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.

56. 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.

57. Новгородцева, А. К. Случаи клостридиозов среди сельскохозяйственных животных в хозяйствах Омской области / А. К. Новгородцева, В. И. Плешакова // Современные тенденции развития ветеринарной науки и практики: Материалы Национальной (Всероссийской) научно-практической конференции, Омск, 26 октября 2021 года. — Омск: Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, 2021. — С. 263-265.

58. Новикова, О. Б. Анаэробная энтеротоксемия птицы / О. Б. Новикова // Животноводство России. — 2014. — № 8. — С. 33-34.

59. Новикова, О. Б. Микрофлора, выделяемая от перепелов и контроль бактериальных болезней в перепеловодческих хозяйствах / О. Б. Новикова. — DOI 10.24412/cl-33489-2020-9-66-69. — Текст : электронный // Эффективное животноводство. — № 9 (166). — 2020. — С. 66-69. — URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikroflora-vydelyaemaya-ot-perepelov-i-kontrol-bakterialnyh-bolezney-v-perepelovodcheskih-hozyaystvah/viewer> (дата обращения: 12.10.2022).

60. Ныркова, О. И. Антибиотик-ассоциированные диареи: проблемы и решения // Вопросы современной педиатрии. — 2011. — №5. — URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antibiotik-assotsiirovannye-diarei-problemy-i-resheniya> (дата обращения: 12.10.2022).

61. Обнаружение ботулинического токсина в консервированных продуктах / А. К. Галиуллин, Ю. В. Красовская, Э. Н. Мустафина, Э. А. Магдеева // Научная жизнь. — 2022. — Т. 17, № 1(121). — С. 136-146. — DOI 10.35679/1991-9476-2022-17-1-136-146.

62. Обнаружение и идентификация лабораторными методами бактериальных патогенов рода *Clostridium*, выявленных у крупного рогатого скота на территории Уральского региона / Н. А. Безбородова, Е. Н. Шилова, О. В. Соколова [и др.] // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии,

гигиены и экологии. – 2022. – № 1(41). – С. 83-92. – DOI 10.36871/vet.san.hyг.ecol.202201010.

63. Определитель бактерий Берджи: в 2-х томах / [Р. Беркли и др.] ; под ред. Дж. Хоулта [и др.] ; пер. с англ. под ред. акад. РАН Г. А. Заварзина. - 9-е изд. - Москва : Мир, 1997. Т. 2. - 1997. - 368 с., ил.; ISBN 5-03-003111-1;

64. Основы полимеразной цепной реакции. Методическое пособие / В. В. Зорина // М.: ДНК-Технология, 2012. – URL: https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf?ysclid=l256vgwriy (дата обращения: 15.04.2023).

65. Оссипранди, М. К. Молекулярное ПЦР-типирование токсинов изолятов *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile*, полученных от крупного рогатого скота // Российский ветеринарный журнал. – № 3. – 2013. – С. 20-23.

66. 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.

67. Патент № 2699035 С2 Российская Федерация, МПК А61К 39/08, А61К 39/116, А61Р 31/00. Поливалентная вакцина против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота и способ ее применения : № 2017117751 : заявл. 22.05.2017 : опубл. 03.09.2019 / Н. В. Пименов, Ю. Н. Колесникова, А. В. Капустин; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина" (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина).

68. Персианова, И. П. Микробиология консервирования и микробиологический контроль консервного производства / И. П. Персианова, Л. Н. Герасименко, Л. А. Стоянова. – Одесса: Внешрекламсервис, 2010. – 310 с.

69. Пилипенко, И. В. Clostridium perfringens: характеристика, биологическое действие, индикация в пищевых продуктах / И. В. Пилипенко. – DOI 10.15587/2312-8372.2015.39107. – Текст : электронный // Технологии пищевой, легкой и химической промышленности. – 2015. – № 4 (22). – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/clostridium-perfringens-harakteristika-biologicheskoe-deystvie-indikatsiya-v-pischevyh-produktah> (дата обращения: 20.02.2023).

70. Пименов, Н. В. Средства и методы лечения молодняка сельскохозяйственных животных при желудочно-кишечных и респираторных болезнях смешанной этиологии. Учебное пособие / Н. В. Пименов, В. Л. Крупальник, Р. Ф. Тухфатова – М.: ФГБОУ ВПО МГАВМиБ. – 2014. – 168 с.

71. Пименов Н.В. Этиология анаэробных инфекций у крупного рогатого скота и сравнительная характеристика выделенных штаммов клостридий / Н.В. Пименов, Ю.Н. Колесникова, А.В. Капустин // RJOAS. – 2016. – Т. 56, - № 8. – С. 39-48.

72. Пищевые отравления (пищевые интоксикации), вызванные Clostridium perfringens // СЭС: Санитарно-эпидемиологический собеседник. – 2019. – № 4. – С. 18-23.

73. Пудовкин, Д. Н. Болезни молодняка крупного рогатого скота: практические рекомендации (издание второе, дополненное) / С. В. Щепеткина, Л. Ю. Карпенко, О. А. Ришко. – СПб.: Изд-во ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2019. – 204 с.

74. Пулотов, Ф. Х. Совершенствование технологии изготовления поливалентной вакцины против клостридиозов животных: диссертация ... кандидата Биологических наук: 03.01.06 / Пулотов Фаридун Хайталиевич; [Место защиты: ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»], 2020.- 134 с.

75. Пулотов, Ф. Х. Совершенствование технологии изготовления поливалентной вакцины против клостридиозов животных / Ф. Х. Пулотов, Д. А. Девришов, И. А. Исмагов. – DOI 10.25687/1996-6733.prodanimbio.2020.1.34-43. – Текст : электронный // Проблемы биологии продуктивных животных. – № 1. – 2020.

–С. 34-43. – URL: <http://bifip.ru/attachments/article/246/20-1-3.pdf> (дата обращения: 12.10.2022).

76. Редкозубова, Л. И. Контроль Клостридий – систематическая вакцинация // Ветеринария. – 2016. – № 1. – С. 9-12.

77. Сергевнин, В. И. Эпидемиология кишечных инфекций, вызванных потенциально-патогенными бактериями (обзор литературы) // Пермский медицинский журнал. – 2008. – №1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologiya-kishechnyh-infektsiy-vyzvannyh-potentsialno-patogennymi-bakteriyami-obzor-literatury> (дата обращения: 12.01.2023).

78. Сидорчук, А. А. Клостридиозы животных: учебное пособие / А. А. Сидорчук, В. Л. Крупальник. – М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2004. – 140 с.

79. Сидорчук, А. А. Общая эпизоотология: учебник для вузов / А. А. Сидорчук, В. А. Кузьмин, С. В. Алексеева. – 2-е изд., стер. – СПб.: Лань, 2021. – 248 с. – ISBN 978-5-8114-7261-1 // Электронно-библиотечная система Лань. – URL: <https://e.lanbook.com/book/156931> (дата обращения: 05.02.2021). – Режим доступа: для авториз. пользователей. – Текст : электронный.

80. Скляр, О. Д. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного и мелкого рогатого скота / О. Д. Скляр, А. В. Капустин, А. И. Лаишевцев [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2017. – № 1. – С. 20-23.

81. Скулябина, З. А. Профилактика желудочно-кишечных болезней телят / З. А. Скулябина, А. П. Горбунова // Труды ВИЭВ. - М.: ВИЭВ, 2011. – Т. 76, – С. 585-687.

82. Смирнова, Л. И. Клиническая ветеринарная микробиология: учебное пособие. / Л. И. Смирнова, С. А. Макавчик. – СПб.: ВВМ, 2022. – С. 228.

83. Спиридонов, А. Г. Биологические свойства бактерий *Clostridium perfringens*, выделенных в регионе Среднего Поволжья от больных анаэробной энтеротоксемией телят / А. Г. Спиридонов, А. Ф. Махмутов, Г. Н. Спиридонов [и др.]. – DOI 10.33632/1998-698X.2021-1-41-46. – Текст : электронный // Ветеринарный врач. – № 1. – 2022. – С. 41-46. URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskie-svoystva-bakteriy-clostridium-perfringens-vydelennyh-v-regione-srednego-povolzhya-ot-bolnyh-anaerobnoy/viewer> (дата обращения 12.10.2022).

84. Спиридонов, А. Г. Иммуноферментный метод диагностики анаэробной энтеротоксемии животных // Ветеринарный врач. – № 6. – 2018. – С. 26-29.

85. Спиридонов, А. Г. Разработка и оценка эффективности вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят : диссертация ... кандидата биологических наук : 06.02.02 / Спиридонов Антон Геннадьевич; [Место защиты: Федер. центр токсиколог., радиац. и биол. безопасности]. - Казань, 2013. - 162 с. : ил.

86. Спиридонов, А. Г. Специфическая профилактика анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А. Г. Спиридонов, Х. Н. Макаев, Г. Н. Спиридонов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 209. – С. 284-289.

87. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / С. М. Бикбулатова, Д. А. Чемерис, Ю. М. Никоноров [и др.] // Вестник Башкирского университета. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 59-67.

88. Сухина, М. А. Алгоритм лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи / М. А. Сухина, И. В. Образцов, В. И. Михалевская [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – Т. 95. – №2. – С. 45-53. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/algoritm-laboratornoy-diagnostiki-clostridium-difficile-assotsiirovannoy-diarei/viewer> (дата обращения 12.10.2022).

89. Тарасевич, А. Ф. Влияние рациона питания на состояние микробиоты у пациентов с метаболическим синдромом / А. Ф. Тарасевич, П. С. Новиков, Н. А. Черевко [и др.] // Вестник восстановительной медицины. – № 1 (95). – 2020. – С. 85-91.

90. Тарлавин Н.В. 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. – EDN INSTOR.

91. Терентьева, Т. Е. Видовой спектр бактерий рода Clostridium, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах. / Т. Е. Терентьева, Т. И. Глотова, С. В. Котенева [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2016. – № 1. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vidovoy-spektr-bakteriy-roda-clostridium-vydelennyh-ot-kрупnogo-rogatogo-skota-na-molochnyh-kompleksah> (дата обращения: 20.07.2021).

92. Устойчивость возбудителей мастита у коров к антибактериальным препаратам / Т. И. Глотова, С. В. Котенева, Т. Е. Судоргина [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2023. – № 3(192). – С. 95-100. – DOI 10.36718/1819-4036-2023-3-95-100.

93. Хурамшина, М. Т. Распространение желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят в регионе Среднего Поволжья / М. Т. Хурамшина, А. Ф. Махмутов, Г. Н. Спиридонов [и др.] // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э.Баумана. – 2020. – № 3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranenie-zheludochno-kishechnyh-zabolevaniy-novorozhdennyh-telyat-v-regione-srednego-povolzhya> (дата обращения: 12.10.2022).

94. Чалченко, А. Б. Этиология и профилактика неонатальной диареи телят / А. Б. Чалченко // Ветеринария. – 2018. – № 9. – С. 19-21.

95. Частная ветеринарно-санитарная микробиология и вирусология : учебное пособие / Р. Г. Госманов, Р. Х. Равилов, А. К. Галиуллин [и др.]. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 316 с.

96. Червякова, Н. С. Установление аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов с применением автоматического микробиологического анализатора Vitek 2. - Н. С. Червякова, А. В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – № 1. – 2017. – С. 100-104.

97. Этиологические агенты, вызывающие патологию воспроизводства у коров на молочных комплексах / Т. И. Глотова, С. В. Котенева, А. В. Нефедченко [и др.] // Ветеринария. – 2023. – № 2. – С. 3-8. – DOI 10.30896/0042-4846.2023.26.2.03-08.

98. Abutarbush, S. M. Jejunal hemorrhage syndrome in dairy and beef cattle: 11 cases (2001 to 2003) / S. M. Abutarbush, O. M. Radostits // *Canadian Veterinary Journal*. – 2005. – Vol. 46. – P. 711-715.
99. Adcock, P. W. Rapid Confirmation of *Clostridium perfringens* by Using Chromogenic and Fluorogenic Substrates [Text] / P. W. Adcock, C. P. Saint // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67. – № 9. – P. 4382-4384. DOI:10.1128/aem.67.9.4382-4384.2001.
100. Albin, S. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates / I. Brodard, A. Jaussi, N. Wollschlaeger [и др.] // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – № 127. – P. 179-185. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.024.
101. Awad, M. M, *Clostridium difficile* virulence 401 factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. / M. M. Awad, P. A. Johanesen, G. P. Carter [и др.] // *Gut. Microbes*. – 2014. – Vol. 5, Is. 5. – P. 579-593. DOI: 10.4161/19490976.2014.969632.
102. Barker, I. K. The alimentary system, disease associated with enteric clostridial infection / I. K. Barker, A. A. Van Dreumel, N. Palmer // *Pathology of Domestic Animals*. – 1993. – Vol. 2. – P. 213–221.
103. Barth H., Stiles B.G. Binary actin ADP ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. // *Current Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 15(5). – P. 459–469. DOI: 10.2174/092986708783503195.
104. Belikova, A. Comparison of colostrum microflora in second and third lactation in Holstein cows / A. Belikova, K. Moiseeva, N. Tarlavin [и др.] // *Reproduction in domestic animals*. – 2022. – Vol. 57, Is. S1. – P. 120. – DOI: 10.1111/rda.14052.
105. Berghaus, R. D. Risk factors associated with hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle / R. D. Berghaus, B. J. McCluskey, R. J. Callan // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. – 2005. – Vol. 226. – P. 1700-1706. DOI: 10.2460/javma.2005.226.1700.
106. Blackwell, T. E. Differences in signs and lesions in sheep and goats with enterotoxemia induced by intraduodenal infusion of *Clostridium perfringens* type D. / T.

E. Blackwell, D. G. Butler, J. F. Prescott [и др.]. // *The American Journal of Veterinary Research*. – 1991. – Vol. 52. – P. 1147-1152.

107. Bokori-Brown, M. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. / M. Bokori-Brown, C. G. Savva, S. P. Fernandes da Costa [и др.]. // *FEBS J*. – 2011. – Vol. 278(23). – P. 4589-4601. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x.

108. Brynestad, S. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. / S. Brynestad, P. E. Granum // *The International Journal of Food Microbiology*. – 2002 – Vol. 74(3). – P. 195-202. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00680-8.

109. Buckel, W. *Clostridium viride* sp. nov., a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to *Clostridium aminovalericum* / W. Buckel, P. H.J anssen, A. Schuhmann [и др.] // *Archives of Microbiology*. – Vol. 162. – P. 387–394 (1994). DOI: 10.1007/BF00282102.

110. Busch, K. *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. / K. Busch, J. S. Suchodolski, K.A. Kühner [и др.] // *The Veterinary Record*. – 2015. – Vol. 176, Is. 10. – DOI: 10.1136/vr.102738.

111. Carman, R. J. *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic associated diarrhoea of man and other animals. // *Reviews in Medical Microbiology*. – 1997. – Vol. 8, Is. 1. – P. 43–45.

112. Chakrabarti, G. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. / G. Chakrabarti, X. Zhou, B. A. McClane. // *Infection and Immunity*. – 2003. – Vol. 71. – P. 4260-4270. DOI: 10.1128/IAI.71.8.4260-4270.2003.

113. Chakrabarti, G. The importance of calcium influx, calpain, and calmodulin for the activation of Caco-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. / G. Chakrabarti, B. A. McClane // *Cellular Microbiology*. – 2005. – Vol. 7, Is. 1. – P. 129–146. DOI: 10.1111/j.14625822.2004.00442.x.

114. Chon, J.W. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. / J. W. Chon, J. S. Park, J. Y. Hyeon [и др.] // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 22, Is. 4. – P. 530-534. DOI: 10.4014/jmb.1107.07064.

115. Coursodon, C. F. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. / C. F. Coursodon, R. D. Glock, K. L. Moore, [и др.] // *Anaerobe*. – 2012. – Vol. 18, Is. 1. – P. 117–21. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.10.001.

116. Dahms, C. Epidemiology and zoonotic potential of multiresistant bacteria and *Clostridium difficile* in livestock and food / C. Dahms, N.-O. Hübner, F. Wilke [и др.] // *GMS hygiene and infection control*. – 2014. – Vol. 9(3). – P. 1–16. DOI: 10.3205/dgkh000241

117. Diab, S. S. Pathology of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia in horses / S. S. Diab, H. Kinde, J. Moore [и др.] // *Veterinary Pathology*. – 2012. – Vol. 49. – P. 255-263. DOI: 10.1177/0300985811404710.

118. Durre, P. Isolation and characterization of an adenine-utilizing, anaerobic sporeformer, *Clostridium purinolyticum* sp. nov. / P. Durre, W. Andersch, J. R. Andreesen. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1981) 31:184-194.

119. El Idrissi, A. H. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. / A. H. el Idrissi, G. E. Ward. // *Veterinary Microbiology*. – 1992. – Vol. 31. – P. 89-99.

120. El Idrissi, A.H., Ward GE. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. / A. H. el Idrissi, G. E. Ward. // *Veterinary Microbiology*. – 1992. – Vol. 31, Is. 4. – P. 389-396. DOI: 10.1016/0378-1135(92)90131-c.

121. Erol I. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR. / M. Goncuoglu, N.D. Ayaz, F.S. Bilir Ormanci, G. Hildebrandt // *Lett Appl Microbiol.* 2008 Jul;47(1):31-4. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02379.x. Epub 2008 Jun 12.

122. Fatal foodborne *Clostridium perfringens* illness at a state psychiatric hospital. / Centers for Disease Control and prevention (Louisiana). // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2012. – Vol. 61, Is. 32. – P. 605–608. URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6132a1.htm> (дата обращения 16.04.2023).

123. Fernandez-Miyakawa, M. E. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. / M. E. Fernandez-Miyakawa, D. J. Fisher, R. Poon [и др.] // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75. – P. 1443-1452.
124. Finnie, J. W. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin: a review. / J. C. Freedman, J. R. Theoret, J. A. Wisniewski [и др.] // *Aust. Vet. J.* – 2003. – Vol. 81. – P. 219-221. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2003.tb11474.x.
125. Freedman, J. C. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Application. / J. C. Freedman, A. Shrestha, B. A. McClane // *Future Microbiol.* – 2016. – Vol. 8. – P. 73.
126. Freedman, J. C. *Clostridium perfringens* type A-E toxin plasmids. // *Res. Microbiol.* – 2015. – Vol. 166. – P. 264–279. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.09.004.
127. Freedman, J. C. Proteolytic processing and activation of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by caprine small intestinal contents. / J. C. Freedman, J. Li, F. A. Uzal, B. A. McClane, // *MBio.* – 2014. – Vol. DOI: 10.1128/mBio.01994-14.
128. Fuqua, W. C. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. / W. C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg. // *J Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – P. 269-275. DOI: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994.
129. Garcia, J. P. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin damages the rabbit colon. / J. P. Garcia, J. Li, A. Shrestha [и др.] // *Infect. Immun.* – 2014. – Vol. 82, Is. 6. – P. 2211–2218. DOI: 10.1128/IAI.01659-14.
130. Gibert, M. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. / M. Gibert, C. Jolivet-Reynaud, M. R. Popoff // *Gene.* – 1997. – Vol. 203, Is. 1. – P. 65–73. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00493-9.
131. Gilbert, G. S. Use of Cluster and Discriminant Analyses to Compare Rhizosphere Bacterial Communities Following Biological Perturbation / G. S. Gilbert, M. K. Clayton, J. Handelsman [и др.] // *Microb. Ecol.* – 1996. – Vol. 32. – P. 123–147. DOI: 10.1007/BF00185884.

132. Grant, K. A. The identification and characterization of *Clostridium perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. / K. A. Grant, S. Kenyon, I. Nwafor [и др.] // *Foodborne Pathog Dis.* – 2008. – Vol. 5, Is. 5. – P. 629-39. DOI: 10.1089/fpd.2007.0066.

133. Guttenberg, G. Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. / G. Guttenberg, S. Hornei, T. Jank [и др.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, Is. 30. – P. 24929–24940. DOI: 10.1074/jbc.M112.347773.

134. Hang, B.P. High level of multidrug-resistant *Escherichia coli* in young dairy calves in southern Vietnam / B.P. Hang, E. Wredle, S. Borjesson [и др.] // *Tropical animal health and production.* – 2019. – Vol. 51. – P. 1405-1411. DOI: 10.1007/s11250-019-01820-6.

135. Hathewey, C. L. Toxigenic clostridii. // *Clinical Microbiology Reviews.* – 1990. – Vol. 3. – P. 66–98. DOI: 10.1128/CMR.3.1.66.

136. Hayase, M. Isolation of *Clostridium absonum* and its cultural and biochemical properties. / M. Hayase, N. Mitsui, K. Tamai [и др.] // *Infect Immun.* – 1974. – Vol. 9, Is. 1. – P. 15-19. DOI: 10.1128/iai.9.1.15-19.1974.

137. Henderson, T. G. The detection of *Clostridium perfringens* type D enterotoxin in the intestinal contents of animals by counterimmunoelectrophoresis. // *N.Z.J. Sci.* – 1984. – Vol. 27. – P. 423-426.

138. Hickey, M. H. Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum* / M. H. Hickey, R. Y. Q. Kwan, M. M. Awad [и др.] // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4. – P. 1000–1045. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000045.

139. Hoffmann, S. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. / S. Hoffmann, M. B. Batz, J. G. Morris // *J. Food Prot.* – 2012. – Vol. 75, Is. 7. – P. 1292–302. DOI: 10.4315/0362028x.jfp-11-417.

140. Houlihan, A. J. The susceptibility of ionophore-resistant *Clostridium aminophilum* F to other antibiotics. / A. J. Houlihan, J. B. Russell // *J Antimicrob Chemother.* – 2003. – Vol. 52, Is. 4. – P. 623–628. DOI: 10.1093/jac/dkg398.
141. Hunter, S.E.C., Brown J.E., Oynston P.C.F., Sakurai J., Titball R.W. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. / S. E. C. Hunter, J. E. Brown, P. C. F. Oynston [и др.] // *Infect. Immun.* – 1993. – Vol. 61. – P. 3958–3965. DOI: 1128/iai.61.9.3958-3965.1993.
142. James E.E. Field experience with *Clostridium enterotoxaemia* in young animals // *J. of the American Vet. Med. Assoc.* 1966. – Vol. 149. – № 2. – P. 24- 31.
143. Kennedy, C. L. The alphatoxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence / C.L. Kennedy, E.O. Krejany, L.F. Young [и др.] // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 57. – P. 1357–1366. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04774.x.
144. Kirkpatrick, M. A. Jejunal hemorrhage syndrome of dairy cattle / M. A. Kirkpatrick, L. L. Timms, K. W. Kersting [и др.] // *Bovine Pract.* 2001. – Vol. 35. – P. 104-116. DOI: 10.21423/aabppro20015203.
145. Kiu R, Caim S, Alexander S, Pachori P, Hall LJ. Probing genomic aspects of the multi-host pathogen *Clostridium perfringens* reveals significant pangenome diversity, and a diverse array of virulence factors. / R. Kiu, S. Caim, S. Alexander, [и др.] // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 2485. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02485.
146. Kiu R., Lindsay J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* // *Microbes Infect.* 2018; 7: 141. doi: 10.1038/s41426-018-0144-8.
147. Kiu, R. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. / R. Kiu, L. J. Hall // *Emerg Microbes Infect.* – 2018. – Vol. 7, Is. 1. – P. 141. DOI: 10.1038/s41426-018-0144-8.
148. Kolesnikova, Y. N. The etiology of anaerobic infections of cattle and comparative characteristics of the isolated strains of *Clostridium*. / Y. N. Kolesnikova, N. V. Pimenov, A. V. Kapustin // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* – 2016. – Vol. 56, Is. 8. – P. 39-48.

149. Komatsu H, Inui A, Sogo T, Fujisawa T. [Clostridium perfringens]. Nihon Rinsho. Japanese journal of clinical medicine – 2012. – Vol. 70. Is. 8. – P. 1357-1361. Japanese. PMID: 22894072.
150. Kozaki, S. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of Clostridium botulinum type B toxin. / S. Kozaki, J. Dufrenne, A. M. Hagenaaars [и др.] // Jpn. J. Med. Sci. Biol. – 1979. – Vol. 32. – P. 199-205. DOI: 10.7883/yoken1952.32.199.
151. Krause, D.O. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. / D. O. Krause, J. B. Russell. // Applied and Environmental Microbiology. – 1996. – Vol. 62, Is. 3. – P. 815-821. DOI: 10.1128/aem.62.3.815-821.1996.
152. Lebrun, M. Cattle enterotoxaemia and Clostridium perfringens: description, diagnosis and prophylaxis / M. Lebrun, J.G. Mainil, A. Linden //Veterinary Record. – 2010. – Vol. 167. – P. 13–22. DOI: 10.1136/vr.167.1.12.
153. Ley, R. E. Obesity alters gut microbial ecology / R. E. Ley, F. Backhed, P. J. Turnbaugh [и др.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, Is. 31. – P. 11070–11075. DOI: 10.1073/pnas.0504978102.
154. Li J. Further characterization of Clostridium perfringens small acid soluble protein-4 (Ssp4) properties and expression. / J. Li, D. Paredes-Sabja, M. R. Sarker, [и др.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, Is. 7. – P. 6249. DOI: 10.1371/journal.pone.0006249.
155. Li, J. Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in Clostridium perfringens sporulation and enterotoxin synthesis. / J. Li, B. A. McClane // Infect. Immun. – 2010. – Vol. 78, Is. 10. – P. 4286–4293. DOI: 10.1128/iai.00528-10.
156. Li, J. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of Clostridium perfringens type D strain CN3718. / J. Li, S. Sayeed, S. [и др.] // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7, Is. 12. – e1002429. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002429.
157. Lugli, G. A. Ancient bacteria of the Ötzi's microbiome: a genomic tale from the Copper Age. / G.A. Lugli, C. Milani, L. Mancabelli [и др.] // Microbiome. – 2017. – Vol. 5, Is. 1. – P. 5. DOI: 10.1186/s40168-016-0221-y.

158. Ma, M. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* isolates from Darmbrand cases in post-World War II Germany. / M. Ma, J. Li, B. A. McClane // *Infect. Immun.* – 2012. – Vol. 80, Is. 12. – P. 4354-4363. DOI: [10.1128/iai.00818-12](https://doi.org/10.1128/iai.00818-12).

159. Ma, M. Synergistic effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin and beta toxin in 608 rabbit small intestinal loops. / M. Ma, A. Gurjar, J. R. Theoret [и др.] // *Infect. Immun.* – 2014. – Vol. 82. – P. 2958-2970. DOI: [10.1128/IAI.01848-14](https://doi.org/10.1128/IAI.01848-14).

160. Machida Y. An outbreak of enterocolitis due to *Clostridium perfringens* in a hospital for the severely disabled. // *Kansenshogaku Zasshi.* – 1989. – Vol. 63, Is. 4. – P. 410-416. DOI: [10.11150/kansenshogakuzasshi1970.63.410](https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.63.410).

161. Macias Rioseco, M. Freezing or adding trypsin inhibitor to equine intestinal contents extends the lifespan of *Clostridium perfringens* beta-toxin for diagnostic purposes. / M. Macias Rioseco, J. Beingesser, F. A. Uzal // *Anaerobe.* – 2012. – Vol. 18, Is. 3. – P. 357-360. DOI: [10.1016/j.anaerobe.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.003).

162. Manich, M. *Clostridium perfringens* delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming toxins, but shows functional differences. / M. Manich, O. Knapp, M. Gibert [и др.] // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3, Is. 11. – e3764. DOI: [10.1371/journal.pone.0003764](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003764).

163. Manteca, C. Etude de l'enterotoxemie bovine en Belgique. III. Comparaison de differents protocoles d'immunisation contre la toxine ade *Clostridium perfringens* // *Annales de Medecine Veterinaire.* – 2004. – Vol. 148. – P. 147–152.

164. Marks, S. L. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. / S. L. Marks, S. C. Rankin, B. A. Byrne [и др.] // *J Vet Intern Med.* – 2011. – Vol. 25, Is. 6. – P. 1195-208. DOI: [10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x).

165. Matthews, C. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. / C. Matthews, F. Crispie, E. Lewis [и др.] // *Gut Microbes.* – 2019. – Vol. 10, Is. 2. – P. 115-132. DOI: [10.1080/19490976.2018.1505176](https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1505176).

166. McClane, B. A. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions / B. A. McClane // *Toxicon*. – 2001. Vol. 39, Is. 11. – P. 1781–1791. DOI: 10.1016/s0041-0101(01)00164-7.
167. McClane, B. A. The Enterotoxic Clostridia. / B. A. McClane, F. A. Uzal, M. E. Miyakawa [и др.]. // M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg [и др.]. *The Prokaryotes*. – New York. – 2006. – P. 688-752.
168. McClane, B. A. The enterotoxic clostridia. In *The Prokaryotes*. / B. A. McClane, F. A. Uzal; M. F. Miyakawa [и др.]. 3rd ed. //: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, [и др.]. Springer NY. – Press.: New York, NY, USA, 2006. – P. 688-752.
169. Miyamoto, K. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification. / K. Miyamoto, J. Li, B. A. McClane // *Microbes Environ*. – 2012. – Vol. 27, Is. 4. – P. 343-9. DOI: 10.1264/jsme2.me12002.
170. Morris, W. E. Necrotic enteritis in young calves / W. E. Morris, A. J. Venzano et al. // *J. Vet. Diagn. Invest*. – 2011. – Vol. 23. – P. 254–259. DOI: 10.1177/104063871102300209.
171. Myers, G. S. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. / G. S. Myers, D. A. Rasko, J. K. Cheung [и др.] // *Genome Res* – 2006. – Vol. 16. – 1031e40. DOI: 10.1101/gr.5238106.
172. Nagahama, M. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. / M. Nagahama, A. Ohkubo, M. Oda, [и др.]. // *Infect. Immun*. – 2011. – Vol. 79, Is. 2. – P. 905-910. DOI: 10.1128/iai.01019-10.
173. Nagahama, M. The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin. / M. Nagahama, M. Shibutani, S. Seike [и др.]. // *Infect. Immun*. – 2013. – Vol. 81. – P. 3703-3708. DOI: 10.1128/IAI.00579-13.
174. Nakamura, M. PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (*CPE*) in *Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. / M. Nakamura, A. Kato, D. Tanaka [и др.]. // *Int J Med Microbiol*. – 2004. – Vol. 294, Is. 4. – P. 261-265. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.03.004.

175. Odani, J. S. Malignant edema in postpartum dairy cattle / J. S. Odani, P. C. Blanchard, J. M. Adaska [и др.]. // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2009. – Vol. 21. – P. 920–924. DOI: 10.1177/104063870902100631.
176. Ohtani, K. Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. / K. Ohtani, T. Shimizu. // *Res Microbiol.* – 2015. – Vol. 166, Is. 4. – P. 280-289. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.09.010.
177. Ohtani, K. Regulation of Toxin Production in *Clostridium perfringens*. / K. Ohtani, T. Shimizu. // *Toxins (Basel)*. – 2016. – Vol. 8, Is. 7. – P. 207. DOI: 10.3390/toxins8070207.
178. Paster, B. J. Phylogeny of the Ammonia-Producing Ruminal Bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. / B. J. Paster, J. B. Russell, C. M. J. Yang [и др.]. // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1993. – Vol. 43, Is. 1. – P. 107–110. DOI: 10.1099/00207713-43-1-107.
179. Petit, L. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype / L. Petit, M. Gibert, M. Popoff // *R. Trends in Microbiology*. – 1999. – Vol. 7. – P. 104–110. DOI: 10.1016/s0966-842x(98)01430-9.
180. Popoff M.R. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278, Is. 23. – P. 4602–4615. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08145.
181. Prescott, J. F. Clostridial abomasitis. / J. F. Prescott, P. I. Menzies, R. S. Fraser. // F. A. Uzal, J. G. Songer, J. Prescott [и др.]. *Clostridial diseases of 667 animals*. – 2016. – Willey and Blackwell, Ames, IA. – P. 205-242.
182. Revitt-Mills, S. A. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. / S. A. Revitt-Mills, J. I. Rood, V. Adams // *Microbiology Australia*. – 2015. – P. 114-117.
183. Richard, J. F. Transcytosis of iota-toxin across polarized CaCo-2 cells. / J. F. Richard, G. Mainguy, M. Gibert [и др.]. // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 43. – P. 907-17. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02806.x.

184. Rodriguez-Palacios, A. Clostridium difficile PCR ribotypes in calves, Canada / A. Rodriguez-Palacios, H.R. Stampfli, T. Duffield [и др.]. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1730-1736. DOI: 10.3201/eid1211.051581.
185. Rood, J. I. Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. / J. I. Rood, V. Adams, J. Lacey // *Anaerobe.* – 2018. – P. 5-10. DOI: 10.1016/J.anaerobe.2018.04.011.
186. Rood, J.I. Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens S / J.I. Rood, T. Cole // *Microbiological Reviews.* – 1991. – Vol. 55. – P. 621-648. DOI: 10.1128/mr.55.4.621-648.1991.
187. Russell W. R. Colonic bacterial metabolites and human health. / W. R. Russell, L. Hoyles, H. J. Flint [и др.]. // *Curr Opin Microbiol.* – 2013. – V.16 Vol. 3. – P. 246-254. DOI: 10.1016/j.mib.2013.07.002.
188. Rychlik, J. L. The adaptation and resistance of Clostridium aminophilum F to the butyrovibriocin-like substance of Butyrovibrio fibrisolvens JL5 and monensin. / J. L. Rychlik, J. B. Russell. // *FEMS Microbiol Lett.* – 2002. – Vol. 209. Is. 1. – P. 93–88. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11115.x.
189. Sakurai, J. Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action. / J. Sakurai, M. Nagahama, M. Oda. // *J. Biochem. (Tokyo).* – 2004. – Vol. 136, Is. 5. – P. 569-574. DOI: 10.1093/jb/mvh161.
190. Sakurai, J. Clostridium perfringens iota-toxin: structure and function Toxins (Basel). / J. Sakurai, M. Nagahama, M. Oda [и др.]. // *Bacterial Protein Toxins.* – 2009. – Vol. 1, Is. 2. – P. 208-228. DOI: 10.3390/toxins1020208.
191. Sayeed, S. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of Clostridium perfringens type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. / S. Sayeed, F. A. Uzal, D. J. Fisher [и др.]. // *Mol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 67. – P. 15-30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.06007.x.
192. Scallan, E. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. / E. Scallan, R. M. Hoekstra, F. J. Angulo [и др.]. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 17, Is. 1. – P. 7–15. DOI: 10.3201/eid1701.p11101.

193. Shatursky, O. Clostridium perfringens beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. / O. Shatursky, R. Bayles, M. Rogers [и др.]. // Infect. Immun. 2000. – Vol. 68, Is. 10. – P. 5546-5551. DOI: [10.1128/iai.68.10.5546-5551.2000](https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5546-5551.2000).
194. Shimizu, T. Complete genome sequence of Clostridium perfringens, an anaerobic flesh-eater. / T. Shimizu, K. Ohtani, H. Hirakawa [и др.]. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 996e1001. DOI: [10.1073/pnas.022493799](https://doi.org/10.1073/pnas.022493799).
195. Smedley 3rd, J. G. Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of Clostridium perfringens enterotoxin. / J. G. Smedley 3rd, F. A. Uzal, B. A. McClane. // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75. – P. 2381-2390. DOI: [10.1128/IAI.01737-06](https://doi.org/10.1128/IAI.01737-06).
196. Smithee, L. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic Clostridium perfringens type A infection. / L. Smithee, B. McClane, R. F. Distefano [и др.]. // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 40, Is. 10. – P. 78–83. DOI: [10.1086/429829](https://doi.org/10.1086/429829).
197. Songer, J. G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals / Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 9(2) – P.216-234. DOI: [10.1128/cmr.9.2.216](https://doi.org/10.1128/cmr.9.2.216).
198. Sterne, M. Pathogenic Clostridia. / M. Sterne, I. Batty. // Butterworth, London. – 1975. – P. 79-122. DOI: [10.1002/jobm.19770170225](https://doi.org/10.1002/jobm.19770170225).
199. Stiles, B. G. Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. / B. G. Stiles, D. J. Wigelsworth, M. R. Popoff [и др.]. // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2011. – Vol. 1. – P. 11. DOI: [10.3389/fcimb.2011.00011](https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00011).
200. Tadepalli, S. Fusobacterium necrophorum: a ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. / S. Tadepalli, S. K. Narayanan, G. C. Stewart, [и др.]. // Anaerobe. – 2009. – Vol. 15, Is. 1-2. – P. 36-43. DOI: [10.1016/j.anaerobe.2008.05.005](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.05.005).
201. Tambalo, D.D. Evaluation of two quantitative PCR assays using Bacteroidales and mitochondrial DNA markers for tracking dog fecal contamination in waterbodies. J Microbiol Methods. / D.D. Tambalo, T. Boa, K. Liljebjelke [и др.]. // Journal of Microbiological Methods. – 2012. – Vol. 3. – P. 459-467. DOI: [10.1016/j.mimet.2012.09.029](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.029).

202. Titball, R. W. The Clostridium perfringens alpha-toxin. / R. W. Titball, C. E. Naylor, A. K. Basak. // Anaerobe. – 1999. – Vol. 5, Is. 2. – P. 51–64. DOI: 10.1006/anae.1999.0191.
203. Ussar, S. Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. / S. Ussar, N. W. Griffin, O. Bezy [и др.]. // Cell Metabolism. – 2015 – Vol. .22 – P. 1–16. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.07.007.
204. Uzal, F. A. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. / F. A. Uzal, M. A. Navarro, J. Li [и др.]. // Anaerobe. – 2018. – Vol. 53. – P. 11-20. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2018.06.002.
205. Uzal, F. A. Diagnosis of Clostridium perfringens intestinal infections in sheep and goats. / F. A. Uzal, J. G. Songer. // J. Vet. Diagn. Invest. – 2008. – Vol. 20. – P. 253-265. DOI: 10.1177/104063870802000301.
206. Uzal, F. A. Infections by Clostridium perfringens type B. / F. A. Uzal, J. G. Songer. // Clostridial diseases of animals. Uzal, F. A., Songer, J. G., Prescott, J, [и др.]. – Willey and Blackwell, Ames, IA. – 2016. – P. 139-142.
207. Uzal, F. A. PCR detection of Clostridium perfringens producing different toxins in faeces of goats. / F. A. Uzal, J. J. Plumb, L. L. Blackall [и др.]. / Lett Appl Microbiol. – 1997. – Vol. 25, Is. 5. – P. 339-344. DOI: 10.1046/j.1472-765x.1997.00247.x.
208. Uzal, F. A. Recent progress in understanding the pathogenesis of Clostridium perfringens type C infections. / F. A. Uzal, B. A. McClane // Vet. Microbiol. – 2011. – Vol. 153. –P. 37-43. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.02.048.
209. Van Hese, I. Exploring the microbial composition of Holstein Friesian and Belgian Blue colostrum in relation to the transfer of passive immunity. / I. Van Hese, K. Goossens, B. Ampe [и др.]. // J Dairy Sci. – 2022. – Vol. 105, Is. 9. – P. 7623-7641. DOI: 10.3168/jds.2022-21799.
210. Vance H. N. A survey of the alimentary tract of cattle for Clostridium perfringens. // Can J Comp Med Vet Sci. – 1967. – Vol. 4. – P. 260 – 264.

211. Weddell, W. An enzyme labelled immunosorbent assay for measuring *Clostridium perfringens* epsilon toxin in gut contents. / W. Weddell, R. W. Worthington. // *N.Z. Vet. J.* – 1984. – Vol. 33. – P. 36-37. DOI: 10.1080/00480169.1985.35148.

212. Welch, W. H. A gas-producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov, Spec.) capable of rapid development in the body after death. / W. H. Welch, G. H. F. Nuttall. // *Bull. John Hopkins Hosp. Baltim.* – 1891. – Vol. 3. P. 81–91.

213. Wu, S. B. Real-time PCR assay for *Clostridium perfringens* in broiler chickens in a challenge model of necrotic enteritis. / S. B. Wu, N. Rodgers, M. Choct. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 77. – P. 1135-1139. DOI: 10.1128/AEM.01803-10.

214. Yadav, J. P. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* from India: A scoping review. / J. P. Yadav, S. Kaur, P. Dhaka [и др.]. // *Anaerobe.* – 2022. – Vol. 77. – 102639. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2022.102639. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2022.102639.

215. Yang, C. C. Clinical significance and outcomes of *Clostridium perfringens* bacteremia--a 10-year experience at a tertiary care hospital. / C. C. Yang, P. C. Hsu, H. J. Chang [и др.]. // *Int J Infect Dis.* – 2013. – Vol. 17, Is. 11. – e955-60. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.03.001.

216. Yonogi, S. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. / S. Yonogi, S. Matsuda, T. Kawai [и др.]. // *Infect. Immun.* – 2014. – Vol. 82, Is. 6. – P. 2390–2399. DOI: 10.1128/IAI.01759-14.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 204004**Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки
животных**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины (ФБОУ ВО СПбГУВМ) (RU)*

Авторы: *Моисеева Карина Абдукахоровна (RU), Сухинин Александр Александрович (RU), Приходько Елена Игнатьевна (RU), Макавчик Светлана Анатольевна (RU), Сулян Офелия Спартаковна (RU)*

Заявка № 2020136875

Приоритет полезной модели **09 ноября 2020 г.**Дата государственной регистрации
в Государственном реестре полезных
моделей Российской Федерации **04 мая 2021 г.**Срок действия исключительного права
на полезную модель истекает **09 ноября 2030 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев





Россельхознадзор

**федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Федеральный центр
охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

600901, Россия, Владимирская область,
город Владимир, микрорайон Юрьевец,
т.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77
e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527170001,
ОГРН: 1023301283720,
ИНН/КПП: 3327100048/332701001

**СПРАВКА
О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Результаты научных исследований Моисеевой Карины Абдукахоровны, аспиранта кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», соискателя ученой степени кандидата ветеринарных наук, полученных в результате подготовки диссертационной работы «Алгоритм лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*», выполненные по выделению и идентификации токсинпродуцирующих штаммов *Clostridium perfringens*, оптимизации лабораторной диагностики из биоматериала, полученного от крупного рогатого скота в работе Северо-Западной испытательной лаборатории ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Руководитель Северо-Западной
испытательной лаборатории
ФГБУ «ВНИИЗЖ» Баргман Ж.Е.
29.05.2023г.




 Утверждаю
 Ректор ФГБОУ ВО СПбГУВМ
 Племяшов К.В.
 « 15 » 05 2023 г.

АКТ

комиссионной апробации тест-системы методом ПЦР-РТ для идентификации гена фосфолипазы С α - токсина *Clostridium perfringens*

Комиссией в составе: Сухинина А.А. – заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, доктора биологических наук, профессора; Макавчик С.А. – доктора ветеринарных наук, доцента; Белкиной И.В. – кандидата ветеринарных наук, доцента; Смирновой Л.И. – кандидата ветеринарных наук, доцента; Приходько Е.И. – кандидата ветеринарных наук, доцента; Виноходова В.О. – кандидата ветеринарных наук, доцента; Абгарян С.Р. – кандидата ветеринарных наук, доцента; Панкратова С.В. – кандидата ветеринарных наук, доцента; Тарлавина Н.В. – кандидата ветеринарных наук, ассистента составлен настоящий акт о том, что в период с 01.03.2023 по 01.04.2023 проведены комиссионные испытания апробации тест-системы для детекции генов α - токсина *Clostridium perfringens* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (далее – ПЦР – РТ) с целью лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*.

На комиссионные испытания был представлен биологический материал – содержимое прямой кишки, содержимое ран копыт голов крупного рогатого скота от клинически здоровых животных; материал от крупного рогатого скота, имеющих подтвержденный диагноз «анаэробная энтеротоксемия, ассоциированная с α - токсином *Clostridium perfringens*».

В процессе комиссионных испытаний были апробированы праймеры (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3' и (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3' с зондом 5'-FAMTGCCGCGCTAGCAACTAGCCTATGG-3' BHQ1 на чувствительность и специфичность.

Результаты испытаний:

ДНК из исследуемых образцов выделяли с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» согласно инструкции. Реакционная смесь была представлена 1 мкл праймера (F) 5'-AAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTAT-3', 1 мкл праймера (R) 5'-CCCAAGCGTAGACTTTAGTTGATG-3', 1 мкл зонда 5'-FAMTGCCGCGCTAGCAACTAGCCTATGG-3' BHQ1, 10 мкл ПЦР смеси (производства ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия), 4,5 мкл воды деионизованной высокой степени очистки, 0,5 мкл Таq-полимеразы, к которой добавляли 2 мкл исследуемой ДНК. Положительным контрольным образцом послужила ранее выделенная ДНК с олигонуклеотидной последовательностью, соответствующей искомой объемом 2 мкл. Отрицательным контрольным образцом послужила деионизированная вода высокой степени очистки объемом 2 мкл.


Смесь вносили в пробирки объемом 0,2 мл белого цвета в стрипы в комплекте с плоскими оптически прозрачными крышками для проведения ПЦР-РТ. Обеспечивали температурный режим: 50°C – 2 минуты, 95°C – 10 минут, 40 циклов 95°C – 15 секунд, 60°C – 1 минуту.

Исследование проводили на анализаторе для ПЦР-РТ Roche LightCycler 96 с возможностями абсолютного количественного анализа, относительного количественного анализа, генотипирования «по конечной точке», анализа кривых плавления, анализа кривых плавления высокого разрешения (HRM), качественного анализа. Обработку данных проводили в соответствующей лицензионной программе Roche LightCycler 96.

В результате исследования 10 проб от клинически здоровых животных оказались отрицательными – Ct отрицательный, экспоненциальный рост флуоресценции не установлен. 10 проб от животных, имеющих подтвержденный диагноз «анаэробная энтеротоксемия, ассоциированная с α - токсином *Clostridium perfringens*», оказались положительными – установлен характерный экспоненциальный рост флуоресценции. Пороговый цикл по каналу Fam наблюдался на $27,24 \pm 2,12$ цикле амплификации, что подтверждает факт содержания и детекции гена фосфолипазы С α - токсина (plc) штамма *Clostridium perfringens* в исследуемых образцах от животных, имеющих подтвержденный диагноз «анаэробная энтеротоксемия, ассоциированная с α - токсином *Clostridium perfringens*», высокочувствительность и специфичность праймеров.

Председатель комиссии:

Члены комиссии:



Макавчик С.А.
Сухинин А.А.
Белкина И.В.
Приходько Е.И.
Смирнова Л.И.
Виноходов В.О.
Абгарян С.Р.
Панкратов С.В.
Тарлавин Н.В.

Утверждаю
Ректор ФГБОУ ВО СПбГУВМ
Племяшов К.В.
«07» 02 2023 г.



СПРАВКА

о внедрении в учебный процесс результатов
диссертационной работы Моисеевой К.А.

Результаты научных исследований аспиранта кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» Моисеевой Марины Абдукаховны, выполненные на тему: «Алгоритм лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*» внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» и используются в учебном процессе для проведения лекционных и лабораторно-практических занятий для студентов факультета ветеринарной медицины очной, заочной и вечерней форм обучения в курсе ветеринарной микробиологии.

Рассмотрено на заседании кафедры
03 февраля 2023 г., протокол №8

Заведующий кафедрой
микробиологии, вирусологии
и иммунологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ
доктор биологических наук, профессор



А.А.Сухинин

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ПРЕДПОРТОВЫЙ»**

188508, Ленинградская область,
Ломоносовский район, Красносельское ш., д.50
Телефон: +7 (812) 746-11-30
E-mail: predport@list.ru

СПРАВКА

о внедрении в производственный процесс ЗАО «Предпортовый»
результатов диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата
ветеринарных наук Моисеевой Карины Абдукаховны
на тему: «Алгоритм лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого
скота, ассоциированных с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium
perfringens*»

Результаты диссертационной работы Моисеевой Карины
Абдукаховны, аспиранта кафедры микробиологии, вирусологии
и иммунологии ФГБОУ ВО СПбГУВМ используются в производственном
процессе при диагностике диарей крупного рогатого скота и планировании
противозепизоотических профилактических мероприятий.

Ветеринарный врач
ЗАО «Предпортовый»



Баркова В.В.

23 мая 2023 года

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ
ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»**

**К.А. Моисеева, А.А. Сухинин, С.А. Макавчик,
А.С. Кветная, Н.В. Тарлавин**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ДИАРЕЙ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ЭНТЕРОТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИМИ
ШТАММАМИ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***

Санкт-Петербург, 2023

УДК: 616.34-008.314.4-07:636.2

Авторы:

Моисеева К.А. – аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО СПбГУВМ;

Сухинин А.А. – д.б.н., заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО СПбГУВМ;

Макавчик С.А. – д.в.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО СПбГУВМ;

Тарлавин Н.В. – к.в.н., ассистент кафедры эпизоотологии имени Урбана В.П., ФГБОУ ВО СПбГУВМ;

Кветная А.С. – д.м.н., ведущий научный сотрудник, профессор отдела медицинской микробиологии и молекулярной микробиологии, ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА

Рецензенты:

Кузьмин В.А. – д.в.н., профессор кафедры эпизоотологии имени Урбана В.П., ФГБОУ ВО СПбГУВМ

Алгоритм проведения клинико-лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*: методические рекомендации / К.А. Моисеева, А.А. Сухинин, С.А. Макавчик, А.С. Кветная, Н.В. Тарлавин; СПбГУВМ. – Санкт-Петербург: ФГБОУ ВО СПбГУВМ, 2023. – 32 с.

Методические рекомендации содержат сведения о клинико-лабораторной диагностике диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*. Приводятся рекомендации бактериологического, серологического и молекулярно-генетического методов диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens* на территории Северо-Западного Федерального округа. Приводятся критерии оценки качества лабораторной диагностики.

Новизной данных Методических рекомендаций является изучение биологических свойств и алгоритмов диагностики *Clostridium perfringens*, который является возбудителем анаэробной энтеротоксемии животных.

Методические рекомендации «Алгоритм проведения клинико-лабораторной диагностики диарей у крупного рогатого скота, ассоциированных с энтеротоксинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*» предназначены для ветеринарных врачей и специалистов в области лабораторной диагностики. Методические рекомендации могут быть использованы для самостоятельной работы обучающихся по направлениям подготовки 36.03.01. Ветеринарно-санитарная экспертиза, 06.06.01 Биологические науки и 36.06.01 Ветеринария и зоотехния.

Издание снабжено рисунками и таблицами.

Утверждено и рекомендовано к печати Методическим советом ФГБОУ ВО СПбГУВМ (протокол №1 от 01.02.2023 г.)

© ФГБОУ ВО СПбГУВМ, 2023



Московский международный ветеринарный конгресс 2023
12-14 апреля
III Национальная премия «Серебряный микроскоп»
14 апреля

ДИПЛОМ

победителя премии II степени

«СЕРЕБРЯНЫЙ МИКРОСКОП»

НАГРАЖДАЕТСЯ

Moshcheva Katerina Aleksandrovna

за лучшую ветеринарно-биологическую работу, проводимую аспирантами
в рамках конференции «Молодые ученые и студенты»
XXXI Московского Международного Ветеринарного Конгресса

Президент Российской ассоциации практикующих ветеринарных врачей,
Заслуженный ветеринарный врач РФ, к.в.н.
Сергея С.В.

Serebreny S.V.

Москва, 2023