

нестационарного типа (силобегах) в разных климатических зонах России / А. В. Новикова, Е. Г. Шубина, Г. А. Нурлыгаянова // Сельскохозяйственный журнал. - 2024. - № 2 (17). - С. 25-34. DOI 10.48612/FARC/2687-1254/003.2.17.2024. 5. Новикова, А. В. Особенности хранения зерна в полевых условиях / А. В. Новикова // Доклады ТСХА, Москва, 03–05 декабря 2019 года. - Выпуск 292, Часть V. – Москва : Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К. А. Тимирязева, 2020. – С. 3-5. – EDN FBPJLQ. 6. Novikova, A. V. Increasing the resource efficiency of storing agricultural products / A. V. Novikova, V. V. Rudomazin, O. I. Sergienko // II International Conference on Current Issues of Breeding, Technology and Processing of Agricultural Crops, and Environment (CIBTA-II-2023), Ufa, Russia, 03–05 июля 2023 года. – Les Ulis Cedex A, France: EDP SCIENCES S A, 2023. – P. 1079. – DOI 10.1051/bioconf/20237101079. – EDN CWEKTM 7. Оноприенко, Н. А. Технология заготовки и качество плющеного зерна кукурузы в рукавах / Н. А. Оноприенко, С. В. Кобзарь // Эффективное животноводство. – 2017. – № 7 (137). – С. 11. – EDN ZITUTX. 8. Патент на полезную модель № 203908 U1 Российская Федерация, МПК G01N 1/20. Ручной пробоотборник сыпучих материалов: № 2020131172 : заявл. 22.09.2020 : опубл. 27.04.2021 / Н. А. Лылин, А. В. Новикова; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева». – EDN ZAXWHB 9. Парахин, Н. В. Кормопроизводство / Н. В. Парахин, И. В. Кобозев, И. В. Горбачев. – Москва : КолосС, 2006. – 432 с. 10. Кононенко, С. И. Пути снижения влияния неблагоприятных кормовых факторов на организм животных / С. И. Кононенко // Научный журнал КубГАУ. - 2016. - № 119 (05). 11. Титенок, Л. Н. Хранение зерна пшеницы и кормов в полиэтиленовых контейнерах : практическое руководство / Л. Н. Титенок, М. И. Ткаченко, В. В. Кулинцев ; под ред. Л. Н. Титенка ; Гос. научное учреждение «Ставропольский науч.-исслед. ин-т сельского хоз-ва» Российской акад. сельскохозяйственных наук. - Изд. 2-е, перераб. и доп. - Ставрополь : Сервисшкола, 2009. - 66 с. ISBN 978-5-93078-652-1.

УДК 619:616-076:579.852.13

## **ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИННОБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КЛОСТРИДИЙ В ТЕСТ-СИСТЕМЕ ИФА**

**\*Новикова О.Н., \*Зубовская И.В., \*Гришанович А.Э., \*\*Винтер М.А.,  
\*\*Зинченко А.И.**

\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

\*\*Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Супернатанты культур клостридий испытаны в тест-системе ИФА, где в качестве положительного контроля использовали рекомбинантные белки альфа-токсина и перфринголизина. Определена токсинообразующая активность клостридий - количество альфа-токсина и перфринголизина в

среде культивирования бактерий. Наиболее активным в отношении выработки альфа-токсина был штамм *C. perfringens* (КМИЭВ -B155), что дало возможность выбрать его в качестве производственного штамма-продуцента. **Ключевые слова:** клостридии, супернатант, рекомбинантные белки, альфа-токсин, перфринголизин, тест-система ИФА.

## STUDY OF TOXIN-PRODUCING ACTIVITY OF CLOSTRIDIA IN AN IFA TEST SYSTEM

\*Novikova O.N., \*Zubovskaya I.V., \*Grishanovich A.E., \*\*Vinter M.A.,  
\*\*Zinchenko A.I.

\*Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus

\*\*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus

*Supernatants of clostridium cultures were tested in an ELISA test system using recombinant alpha-toxin and perfringolysin proteins as positive controls. The intensity of toxin-forming properties of the studied clostridia was determined - the amount of alpha-toxin and perfringolysin in the bacterial culture medium. The strain of C. perfringens (KMIEV-B155) was the most active with respect to alpha-toxin production, which made it possible to select it as a production strain. **Keywords:** clostridia, supernatant, recombinant proteins, alpha-toxin, perfringolysin, ELISA test system.*

**Введение.** Род *Clostridium* включает в себя более ста видов грамположительных облигатно анаэробных палочковидных бактерий, способных к спорообразованию, что делает бактерий этого рода одними из самых распространенных во всем мире.

Вирулентные свойства различных штаммов клостридий проявляются в способности продуцировать высокоактивные токсины и ферменты, которые при воздействии на чувствительные ткани и органы макроорганизма нарушают их нормальное функционирование и вызывают развитие специфических, опасных для жизни различных патологических состояний [1].

К широко распространенным представителям этого рода относят вид *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). Штаммы *C. perfringens* относят к основным семи токсинотипам: тип А (альфа-токсин), тип В (альфа, бета и эпсилон токсины), тип С (альфа и бета токсины), тип D (альфа и эпсилон-токсины), тип Е (альфа- и йота-токсины), тип F (альфа и энтеротоксин) и тип G (альфа и NetB-токсины) [2].

*C. perfringens* тип А может выделяться как от здоровых, так и от больных энтеротоксемией телят [3]. В последние годы появились сведения о том, что необходимым условием развития клостридиозов является синергизм действия перфринголизина и альфа-токсина *Clostridium perfringens* тип А. Оба токсина обладают цитокин-индуцирующим провоспалительным действием [1, 4, 5].

Применение вакцин на основе токсоеидов клостридий является одним из наиболее эффективных способов защиты животных от клостридиозов. При разработке технологии изготовления таких вакцин особое внимание уделяется подбору высокопродуктивных штаммов-продуцентов целевых токсинов

*C. perfringens*. Несмотря на значимость перфринголизина в патогенезе клостридиозов в современных вакцинных препаратах его не декларируют в качестве протективного антигена.

Существует классический метод определения степени токсичности бактериального супернатанта *C. perfringens* на белых мышах. Однако, этот метод является весьма трудоемким, негуманным и имеет большую погрешность, поскольку *C. perfringens* выделяет множество других токсинов и ферментов, более двадцати из которых также считаются патогенными [1].

Определение содержания альфа-токсина и перфринголизина методом ИФА позволяет провести иммунохимическую идентификацию и определить количество этих токсинов в среде культивирования клостридий.

С целью подбора высокопродуктивного штамма клостридий в отношении альфа-токсина и перфринголизина при разработке вакцинных препаратов нами были изучены токсинообразующие свойства двух штаммов и эпизоотического изолята *C. perfringens*.

**Материалы и методы исследований.** Постановку метода ИФА осуществляли общепринятым методом с использованием в качестве положительного контроля рекомбинантных белков альфа-токсина и перфринголизина *C. perfringens* (Институт микробиологии НАН, Республики Беларусь). Рекомбинантные белки альфа-токсина и перфринголизина испытывали в ИФА в концентрациях - 1, 5, 10, 20 мкг/мл, растворитель - карбонат-бикарбонатный буфер (рН-9,4). В качестве отрицательного контроля использовали сердечно-мозговой бульон (СМБ) в разведении 1:100. В качестве специфических антител - коммерческие антитела к альфа-токсину и перфринголизину *C. perfringens*. В качестве субстратного буфера - ТМБ. Учет результатов ИФА проводили, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Построение калибровочных кривых для рекомбинантных белков альфа-токсина и перфринголизина осуществляли на основании зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантных белков токсинов в растворе.

В работе использовали штаммы клостридий, полученные из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» - *C. perfringens* (КМИЭВ-В153), *C. perfringens* (КМИЭВ-В155), а также эпизоотический изолят *C. perfringens*, выделенный от трупа теленка с явлениями энтеротоксемии. Штаммы *C. perfringens* (КМИЭВ-В153), *C. perfringens* (КМИЭВ-В155) и эпизоотический изолят *C. perfringens* высевали на среду Китт-Тароцци, 5 % кровяной агар, сердечно-мозговой агар (СМА), сердечно-мозговой бульон (СМБ) с последующим культивированием в анаэробных условиях при 37<sup>0</sup>С.

Патогенные свойства клостридий определяли путем постановки биопробы на морских свинках массой 450–500 г. Морским свинкам внутримышечно вводили 0,5 мл суточной культуры клостридий со среды Китт-Тароцци.

Для получения токсинсодержащих супернатантов клостридии культивировали на СМБ. Для этого в три флакона, содержащие по 100 мл СМБ, вносили соответственно по 5 мл расплодки каждого штамма клостридий с концентрацией  $1 \times 10^9$  м.т./мл. и далее образцы культивировали в анаэробных условиях при 37 °С в термошейкере в течение 8 часов. Из флаконов отбирали токсинсодержащую культуральную жидкость и центрифугировали при 4000

оборотах 30 минут. Супернатанты клостридий фильтровали при помощи стерильных фильтров (Millipore, 0,22  $\mu\text{m}$ ). Каждый образец супернатанта клостридий испытывали в ИФА в трех повторах.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок.

**Результаты исследований.** При посеве на 5 % кровяной агар изучаемые штаммы и эпизоотический изолят *C. perfringens* обладали выраженной гемолитической активностью.

При постановке биопробы наблюдали гибель морских свинок в течение 24 часов, что позволило сделать заключение о патогенных свойствах культур клостридий.

Результаты изучения супернатантов культур клостридий в тест-системе ИФА представлены в таблице.

**Таблица – Результат определения количества альфа-токсина и перфринголизина в бактериальных супернатантах *C. perfringens***

Супернатант бактериальной культуры	Количество, мкг/мл	
	альфа-токсин	перфринголизин
<i>C. perfringens</i> (КМИЭВ -В153)	15,9 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,04
<i>C. perfringens</i> (КМИЭВ -В155)	31,1 $\pm$ 0,5	15,1 $\pm$ 0,07
<i>C. perfringens</i> (эпизоотический изолят)	16,5 $\pm$ 0,1	31,4 $\pm$ 0,12

Таким образом, штаммы *C. perfringens* (КМИЭВ -В153), *C. perfringens* (КМИЭВ -В155) и эпизоотический изолят *C. perfringens* обладали выраженной токсинообразующей активностью. При этом соотношение альфа-токсина и перфринголизина в среде культивирования у каждого штамма клостридий и эпизоотического изолята имели существенные различия. Так, наибольшее значение альфа-токсина отмечали в супернатанте *C. perfringens* (КМИЭВ -В155), а перфринголизина – в супернатанте эпизоотического изолята *C. perfringens*.

**Заключение.** Изучение токсинообразующих свойств клостридий в тест-системе ИФА, где в качестве положительного контроля использовали рекомбинантные белки альфа-токсина и перфринголизина позволило выявить интенсивность токсинообразующих свойств клостридий и определить количество альфа-токсина и перфринголизина в среде культивирования. Наиболее активным в отношении выработки альфа-токсина был штамм *C. perfringens* (КМИЭВ -В155), что дало возможность выбрать его в качестве производственного штамма-производителя. Наибольшее количество перфринголизина было в супернатанте эпизоотического изолята *C. perfringens*. Определение перфринголизина в среде культивирования клостридий имеет важное значение как для оценки этиологической значимости выделенного изолята клостридий, так и при разработке технологии изготовления вакцин для профилактики клостридиозов.

**Литература.** 1. Kiu, R. An update on the human and animal enteric pathogen

*Clostridium perfringens* / R. Kiu, L. J. Hall // *Emerg. Microbes Infect.* - 2018. - V. 7. - P. 141-148. 2. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease / F. A. Uzal, J. C. Freedman, P. Shrestha [et.al] // *Future Microbiol.* - 2014. - V. 9. - P. 361–377. 3. Pathogenic characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from patients with massive intravascular hemolysis / A. Suzuki, K. Ohtani, S. Komine-Aizawa [et.al] // *Front. Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 713509. doi: 10.3389/fmicb.2021.713509. 4. The synergistic necrohemorrhagic action of *Clostridium perfringens* perfringolysin and alpha toxin in the bovine intestine and against bovine endothelial cells / S. Verherstraeten, A. Matsumoto, S. Kamiya [et.al] // *Vet. Res.* – 2013. - V. 44. – P. 45. doi: 10.1186/1297-9716-44-45. 5. Deprez, P. *Clostridium perfringens* infections — a diagnostic challenge / P. Deprez // *Vet Rec.* - 2015. - № 177 (15). – P. 388-389.

УДК 619:616.636

## **ЭПИЗОТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО БРУЦЕЛЛЕЗУ В СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ГРАНИЧАЩИХ С РЕСПУБЛИКОЙ БЕЛАРУСЬ**

**Нурлыгаянова Г.А.<sup>1,2</sup>, Разумова А.А.<sup>1,3</sup>, Белоусов В.И.<sup>1,2</sup>, Коба И.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»),  
г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и  
биотехнологии-МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса  
Лулумбы» (РУДН), г. Москва, Российская Федерация

*Изучена эпизоотическая ситуация по бруцеллезу сельскохозяйственных животных за 2022-2023 гг. на территории 3-х субъектов Российской Федерации (РФ), имеющих общую границу с Республикой Беларусь. Установлено, что территория Псковской области свободна от возбудителя бруцеллеза. Эпизоотическая ситуация по бруцеллезу в Брянской и Смоленской областях - нестабильная. За анализируемые два года всего зарегистрировано новых неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного рогатого скота в Брянской области 11, в Смоленской области – 7. На территории Брянской области в 2023 году в популяции мелкого рогатого скота выявлено 1 животное, больное бруцеллезом. Сложившаяся эпизоотическая ситуация в Смоленской и Брянской областях требует повышенного внимания и расширения взаимодействия Государственной ветеринарной службы и органов здравоохранения, что позволит преодолеть проблему. **Ключевые слова:** Российская Федерация, регион, бруцелла, неблагополучный пункт, животные, человек, проблемы.*

## **THE EPIZOOTIC SITUATION OF BRUCELLOSIS IN THE SUBJECTS OF THE RUSSIAN FEDERATION BORDERING THE REPUBLIC OF BELARUS**

**Nurlygayanova G.A.<sup>1,2</sup>, Razumova A.A.<sup>1,3</sup>, Belousov V.I.<sup>1,2</sup>, Koba I.S.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Federal Center for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), Moscow, Russian Federation