

Особо опасные инфекционные заболевания крупного рогатого скота / А.Н. Милованова, Э.Ж. Апиева, М.М. Загудалова, Д.А. Ведищев // Инновационные идеи молодых исследователей для агропромышленного комплекса: Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, Пенза, 28–29 марта 2024 года. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2024. – С. 300-303. – EDN WMKZNS. 3. Апиева, Э.Ж. Основная характеристика и распространение Бруцеллеза / Э.Ж. Апиева, Д.А. Ведищев // Научно-образовательные и прикладные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции: Сборник материалов VII Международной научно-практической конференции, Чебоксары, 15 ноября 2023 года. – Чебоксары: Чувашский государственный аграрный университет, 2023. – С. 319-324. – EDN UQEMFJ. 4. Диагностика абортос у крупного рогатого скота на примере животноводческого комплекса / М.Ю. Кураев, Э.Ж. Апиева, М.М. Загудалова, Д.А. Ведищев // Инициативы молодых - науке и производству: Сборник статей VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Пенза, 25–26 ноября 2024 года. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет, 2024. – С. 949-952. – EDN AMQXTO.

УДК 619:616.98:579.852.13-076:636.22/.28

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ТОКСИГЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Судоргина Т.Е., Глотов А.Г.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий
Российской академии наук (СФНЦА РАН), Краснообск, Российская
Федерация

*Предложен новый подход к выявлению токсигенных изолятов бактерии *Clostridium perfringens* на основе выявления методом ПЦР гена *AgrD*, регулирующего выработку у нее токсинов. Этот метод прост в исполнении и не требует проведения биологической пробы на лабораторных животных. **Ключевые слова:** *Clostridium perfringens*, токсины, полимеразная цепная реакция.*

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR DETECTING CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TOXIGENIC ISOLATES

Nefedchenko A.V., Glotova T.I., Sudorgina T.E, Glotov A.G.

Federal State Budgetary Institution of Science Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnology of the Russian Academy of Sciences (SFNCA RAS), Krasnogorsk, Russian Federation

A new approach to the detection of toxigenic isolates of the bacterium Clostridium perfringens is proposed based on the PCR detection of the AgrD gene, which regulates the production of toxins in it. This method is simple to perform and does not require biological testing on laboratory animals. Keywords: Clostridium perfringens, toxins, polymerase chain reaction.

Введение. *Clostridium perfringens* представляет собой грамположительную спорообразующую анаэробную бактерию, которая широко распространена в окружающей среде и присутствует в желудочно-кишечном тракте человека, разных видов сельскохозяйственных и домашних животных и птицы. Она может вызывать у животных, в зависимости от продуцируемых ею токсинов, широкий спектр клинических проявлений заболеваний, а у человека – газовую гангрену, пищевые отравления и некротический энтероколит [1].

Clostridium perfringens в соответствии с современной классификацией делят на типы в зависимости от их способности продуцировать токсины: α (CPA), β (CPB), ϵ (ETX), ι (ITX), энтеротоксин (CPE) и некротические токсины, подобные типу В (NetB) [2].

Выработка бактериями токсинов регулируется несколькими генами, из которых AgrD является основным. Установлено, что добавление синтетического пептида AgrD к непатогенной культуре *Clostridium perfringens* в условиях *in vitro*, восстанавливает выработку ею токсинов и проявление вирулентности для белых мышей [2-3].

Из-за большой вариабельности клинических проявлений болезней, вызываемых *Clostridium perfringens* у крупного рогатого скота, выделение бактерий и определение у них токсигенных свойств является обязательным условием для установления диагноза.

Постановка биологической пробы на беспородных белых мышах с последующей оценкой их летальности для определения токсигенных свойств выделенных культур бактерий является довольно длительной процедурой (до двух недель) и не приемлема к использованию при проведении рутинных исследований [4].

Выявление отдельных генов токсинов у бактерии *Clostridium perfringens* указывает лишь на потенциальную возможность их выработки, не позволяет определять токсигенные и нетоксигенные изоляты.

Целью работы являлась разработка метода диагностики клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных *Clostridium perfringens*, на основе детекции ДНК возбудителя с одновременной дифференциацией токсигенных и нетоксигенных изолятов с помощью выявления генов – *RpoA* (ДНК-зависимая РНК-полимераза, специфичная для бактерии) и *AgrD* (вспомогательного гена регуляции кворума для выявления вариантов бактерий, способных вырабатывать токсины) в одном анализе.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена в лаборатории биотехнологии-диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН в период с 2023 г. по 2025 г. с использованием проб биоматериала, которые отбирали не позднее 3-5 часов с момента гибели или вынужденного убоя животных, для лечения которых не использовали антибиотики, а также культур бактерий, полученных в ходе бактериологических исследований.

Бактериологические исследования проб биологического материала от животных проводили в соответствии ГОСТом 26503-85 «Методы лабораторной диагностики клостридиозов». Изучение биохимических свойств выделенных бактерий проводили с помощью «Набора для идентификации анаэробных бактерий АНАЭРОтест 23», производства Erba Mannheim (Чехия) в соответствии с инструкцией по его применению.

В качестве положительных контролей и для оценки специфичности использовали культуры бактерий, имеющиеся в коллекции лаборатории: *Clostridium sordellii* (T2308), *Clostridium perfringens* (T2304) и *Clostridium sporogenes* (K2301), идентифицированные бактериологическим и биохимическим методами, подтвержденные секвенированием по 16S рРНК. Также использовали штаммы *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Clostridium sordellii* AM370, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 11778, полученные из коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор».

Для выделения ДНК использовали бактериальную суспензию, прогретую в течение 10 минут при 100°C, набор «Рибо-преп» (Amplisens, ФБУН «ЦНИИЭ»). Для ПЦР использовали 5 мкл полученного супернатанта.

Специфические прямые и обратные праймеры и зонды, нацеленные на консервативные фрагменты генов *RpoA* и *AgrD* *S. perfringens*, были разработаны с использованием инструмента PrimerQuest компании IDT (<https://www.idtdna.com/Primerquest/home/Index>) из последовательностей базы данных нуклеотидов GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Специфичность праймеров и зондов была дополнительно проверена *in silico* с использованием инструмента поиска базовых локальных связей NCBI

(BLAST; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Сайты само отжига, образование шпилек и 3'-комплементарность были проверены с использованием инструмента OligoAnalyzer от IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Постановку ПЦР проводили на приборе CFX96 (BioRad, США) с использованием набора реактивов БиоМастер ПЦР РВ(2Х) (Биолабмикс, Россия) в объеме 30 мкл в соответствии с инструкцией производителя с добавлением 0,1 мкл 100 мкМ раствора каждого праймера и зонда и 5 мкл выделенной ДНК. Температурный режим проведения ПЦР: 95 0С – 5 мин - 1 цикл; 95 0С – 15 сек., 600С – 60 сек. - 45 циклов. Измерение флуоресценции осуществляли при температуре 60⁰С на соответствующих каналах. Положительными считали образцы со значением *Ct* (пороговый цикл), не превышающим 35. При значении *Ct* выше 35 или не определенном – реакцию считали отрицательной.

Результаты исследований. Поставленная цель была решена разработкой мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с применением двух пар праймеров и флюоресцентно меченных зондов.

Результаты оценки специфичности на культурах бактерий показали, что разработанная ПЦР является высоко специфичной к соответствующим мишеням, а праймеры и зонды не вступают в перекрестные реакции друг с другом.

Минимальная выявляемая концентрация *Clostridium perfringens* составила 10³КОЕ/мл. Полученные результаты исследований свидетельствуют о высокой чувствительности разработанной ПЦР.

Последующие исследования были направлены на определение сравнительной эффективности ПЦР при выявлении токсигенных вариантов *Clostridium perfringens* непосредственно в пробах биоматериала от животных, бактериальных культурах, а также их сравнение с результатами выделения бактерий на искусственных питательных средах и идентификации по результатам изучения биохимических свойств и биологической пробы на лабораторных животных.

Для исследования отбирали пробы биологического материала (мышечная ткань, брыжеечные лимфатические узлы, печень и др.) от павших или вынужденно убитых животных с клиническими признаками заболевания не позднее двух часов после их гибели. Делали посевы отобранных образцов на тиогликолевую среду, культивировали в анаэробных условиях в течение 7-10 дней, затем культуральную жидкость исследовали при помощи разработанного метода.

Из 30 исследованных проб был выделен 1 изолят отрицательный на ген *AgrD*. Этот изолят имел типичные для *Clostridium perfringens* культурально-морфологические и биохимические свойства, а также у него было выявлено присутствие гена альфа-токсина. Однако, данный изолят бактерии не вызывал гибель беспородных белых мышей при подкожном введении, т.е. не являлся токсигенным. Кроме того, было выявлено два изолята бактерии, у которых был выявлен ген *AgrD*, которые вызвали гибель лабораторных животных при подкожном заражении.

Заключение. Таким образом, разработана полимеразная цепная реакция в реальном времени, которая позволяет в короткие сроки эффективно выявлять токсигенные варианты *Clostridium perfringens* и проводить диагностику клостридиозов крупного рогатого скота. Для ее постановки необходимо предварительно проводить бактериологические исследования проб биоматериала. Данная методика может быть использована для проведения более широких исследований по изучению распространения токсигенных вариантов бактерии среди крупного рогатого скота и их роли в патологии животных.

Литература. 1. Songer J.G. *Clostridia as agents of zoonotic disease. Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):399–404. 2. Судоргина Т.Е., Глотова Т.И., Котенева С.В., Нефедченко А.В., Велькер Д.А., Глотов А.Г. *Клостридиозы крупного рогатого скота: характеристика основных возбудителей, диагностика, меры профилактики и борьбы: метод. рекомендации. Сиб. фед. науч. центр агробιοтехнологий Рос. акад. наук. Новосибирск: Агронаука, 2025. 55 с.* 3. Carter G.P., Cheung J.K., Larcombe S., Lyras D. *Regulation of toxin production in the pathogenic clostridia. Mol Microbiol.* 2014; 91(2): 221–231. doi: 10.1111/mmi.12469. 4. Uzal F.U., McClane B.A., Cheung J.C., Theoret J., Garcia J.P., Moore R.J., Rood J.I. *Animal models to study the pathogenesis of human and animal Clostridium perfringens infections // Vet Microbiol.* 2015; 179(1-2): 23–33. doi:10.1016/j.vetmic.2015.02.013.