4. Муруева Г. Б. Оценка эпизоотической ситуации по трихофитии в Республике Бурятия / Г. Б. Муруева, Е. Г. Цыренжапова // Аграрная наука – сельскому хозяйству : сборник материалов XX Международной (заочной) научно-практической конференции. В 2-х книгах, Барнаул, 06 февраля 2025 года. – Барнаул : Алтайский государственный аграрный университет, 2025. – С. 153–154.

5. Проблемы модернизации АПК и культурно-хозяйственные традиции Байкальского региона / Е. Б. Баторова, А. С. Д. Балданова, М. В. Анахина [и др.] ; Бурятская государственная сельскохозяйственная академия имени В.Р. Филиппова. – Улан-Удэ : Бурятская государственная сельскохозяйственная академия имени В.Р. Филиппова, 2018. – 232 с.

6. Распространение и симптоматика дерматомикозов животных в Краснодарском крае / А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л. В. Шевченко [и др.] // Научная жизнь. – 2024. – Т. 19. – № 4(136). – С. 688–694.

7. Саркисов К. А. Профилактика и терапия дерматомикозов животных / К. А. Саркисов, И. В. Дмитриева // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т. 16. – С. 220–224.

8. Сердюченко И. В. Эпизоотологические особенности дерматомикозов (литературный обзор) / И.В. Сердюченко, А.Д. Бабина // Лучшая студенческая статья 2018 : сборник статей XIII Международного научно-практического конкурса. В 2 частях, Пенза, 25 февраля 2018 года. Том Часть 1. – Пенза : МЦНС «Наука и Просвещение», 2018. – С. 307–309.

9. Ханис А. Ю. Трихофития крупного рогатого скота / А. Ю. Ханис, А. М. Гафурова // Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т. 20. – С. 699–705.

10. Якшибаева Л. А. Дерматомикозы: особенности диагностики и терапии / Л. А. Якшибаева, О. А. Князева // European Journal of Natural History. – 2021. – № 2. – С. 47–51.

DOI: 10.48612/sbornik-2026-1-23
УДК 619:579.852.13: 636.22/.28(571.1/.5)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПАТОЛОГИЮ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В СИБИРИ

Нефедченко Алексей Васильевич, д-р вет. наук
Глотова Татьяна Ивановна, д-р биол. наук
Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук
Котенева Светлана Владимировна, канд. вет. наук
ФГБНУ Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Краснообск, Российская Федерация

В статье представлены результаты исследования бактериального разнообразия рода *Clostridium* на животноводческих фермах Сибирского федерального округа, которое вызывает различные патологии у крупного рогатого скота. В ходе исследования был использован метод мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации девяти различных видов клостридий.

С помощью этого метода в ходе исследования в образцах биологического материала было выявлено присутствие шести видов клостридий: *Clostridium histolyticum, Clostridium septicum, Clostridium perfringens, Clostridium sporogenes, Clostridium sordellii* и *Clostridium tetani*. Эти результаты были подтверждены путем секвенирования выделенных бактериальных штаммов. Исследование подчеркивает важность использования передовых методов, таких как ПЦР и секвенирование, для точной идентификации и мониторинга бактериальных патогенов в животноводстве.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; клостридии; бактериологический метод; полимеразная цепная реакция в реальном времени; секвенирование

MOLECULAR AND GENETIC MONITORING OF THE SPECIES DIVERSITY OF BACTERIA OF THE GENUS CLOSTRIDIUM THAT CAUSE PATHOLOGY IN CATTLE IN SIBERIA

Nefedchenko Alexey Vasilyevich, Dr. Vet. Sci.
Glotova Tatyana Ivanovna, Dr. Biol. Sci.
Glotov Aleksandr Gavrilovich, Dr. Vet. Sci.
Koteneva Svetlana Vladimirovna, PhD Vet. Sci.
Siberian Federal Research Center for Agrobiotechnology, Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

The article presents the results of a study on the bacterial diversity of the genus *Clostridium* in livestock farms in the Siberian Federal District, which causes various pathologies in cattle. The research used a multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique to identify nine different species of clostridia. Using this method, the study identified the presence of six species of Clostridia in samples of biological material: *Clostridium histolyticum, Clostridium septicum, Clostridium perfringens, Clostridium sporogenes, Clostridium sordellii,* and *Clostridium tetani.* These findings were confirmed by sequencing isolated bacterial isolates. The study highlights the importance of using advanced techniques such as PCR and sequencing to accurately identify and monitor bacterial pathogens in livestock.

Keywords: cattle; clostridia; bacteriological method; real-time polymerase chain reaction; sequencing

В последние годы в животноводческих хозяйствах регистрируется увеличение выявления случаев клинического проявления клостридиозов среди крупного рогатого скота, что обусловлено интенсификацией животноводства, направленной на повышение молочной продуктивности коров, которую часто осуществляют на фоне несбалансированных рационов кормления. Это приводит к нарушению обмена веществ, в частности, к развитию кетозов и ацидозов, нередко – к гибели животных. Клостридии, размножаясь на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта животного, вызывают некроз клеток эпителия, что способствует проникновению в кровяное русло токсинов, продуцируемых ими, а также – к развитию тяжелых патологических процессов в организме [1]. В связи с быстротечностью инфекционного процесса, высокой токсигенной активностью возбудителей и обширностью поражения органов и тканей организма, лечение таких животных часто оказывается бесперспективным, поэтому высокопродуктивных особей приходится выбраковывать [2,3].

Клостридии – анаэробные грамположительные бактерии, образующие споры, семейства Clostridiaceae, порядка *Clostridiales*, класса *Clostridia*, надкласса *Clostridium*, типа *Fusobacteria*, подцарства *Bacteria* широко распространены в почве, воде, продуктах разложения (гниения) белковых веществ. Род *Clostridium* насчитывает более 100 видов, в большинстве своем являющихся представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота [9].

Установлено, что клостридии демонстрируют многогранную стратегию патогенеза, в основе которой лежит их способность адаптироваться к динамической среде кишечника. Нарушение местной микробиоты, часто из-за использования антибиотиков, изменяет метаболический ландшафт кишечника, создавая условия, способствующие прорастанию спор, вегетативному их росту и производству токсинов. Усилению патогенных свойств клостридий способствуют белки адгезии, жгутики и регуляторы споруляции [10].

Наибольший ущерб животноводству причиняют токсигенные виды клостридий: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi*, *Clostridium septicum, Clostridium sordellii*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium histolyticum. Clostridium sporogenes* и *Clostridium difficile* также признаны патогенами крупного рогатого скота [4]. Возможно выделение и других видов, которые относятся к нормальной микрофлоре кишечника и рубца (*Clostridium cadaveris*, *Clostridium cochlearium и др.*), но при определенных условиях могут проникать в ткани животного и вступать в ассоциации с патогенными видами клостридий [7].

Проведение бактериологических исследований при клостридиозах затруднено стро-

гой требовательностью патогенных видов к условиям культивирования и питательным средам, длительностью их проведения [6].

Во всем мире применяются различные современные методы исследования для ускорения выявления и видовой идентификации клостридий. В некоторых специализированных лабораториях используют времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией /ионизацией (MALDI-TOF MS) [5]. К недостаткам этого метода относится то, что он не способен идентифицировать все виды клостридий, его диагностическая эффективность зависит во многом от возраста бактериальных культур. Использование метода ограничено отсутствием видоспецифичных спектральных данных для всех видов клостридий в существующих базах данных. Результаты этого метода требуют дополнительной идентификации бактерий с помощью секвенирования гена 16S рРНК [8].

Поэтому целью работы являлась разработка высокоспецифичного и чувствительного способа на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, позволяющего одновременно выявлять и идентифицировать в пробах биоматериала от больных животных девять видов клостридий и проведение мониторинга их распространения в животноводческих хозяйствах Сибири.

Методика исследований. Работа выполнена в 2021–2026 гг. в лаборатории биотехнологии диагностического центра Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН. Бактериологические исследования проводили согласно ГОСТу 26503-85 «Методы лабораторной диагностики клостридиозов». Видовую идентификацию бактериальных культур по ферментативным свойствам проводили с использованием «Набора для идентификации анаэробных бактерий АНАЭРОтест 23» производства Erba Mannheim (Чехия).

Для исследования в ПЦР в реальном времени отбирали отдельные колонии выросших бактерий. Суммарную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «Ампли Прайм РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

На начальном этапе был проведен анализ нуклеотидных последовательностей геномов всех девяти видов клостридий из базы данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) и определены наиболее консервативные участки генов. Анализ публикаций в сети интернет позволил выбрать гены, представленные у всех исследованных штаммов и изолятов соответствующего вида клостридий. Дополнительно был выбран ген 16S rRNA семейства Clostridiaceae для поиска праймеров и зонда, специфичных для всего семейства и в первую очередь для всех 9 видов, а также для непатогенных видов клостридий, которые были выделены ранее другими исследователями.

Для снижения затрат на проведение исследований и исключения конфликта между отдельными праймерами, все реагенты были разделены на три группы, в каждую из которых входили праймеры и зонд для выявления семейства и трех разных видов клостридий. Амплификацию проводили в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad, США). Температурный режим проведения реакции был следующим: 95 °С – 5 мин – 1 цикл; 95 °С – 15 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с – 45 циклов. В качестве положительного контроля ПЦР использовали изоляты бактерий, охарактеризованные по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам и вакцины. Специфичность метода проверяли с другими микроорганизмами. Кроме того, специфичность метода подтверждена секвенированием фрагментов генов по Сэнгеру 11 изолятов клостридий, полученных бактериологическими исследованиями проб биологического материала от больных животных. Последовательности всех секвенированных фрагментов генов были размещены в базе данных GenBank.

Проведено мониторинговое исследование 132 проб биологического материала, отобранного от больных животных, поступившего в лабораторию из животнодческих хозяйств Сибири.

Результаты исследований и их обсуждение. Для определения специфичности и эффективности реакции исследовали изоляты клостридий, идентифицированные до вида с помощью культурально-морфологических и биохимических методов, вакцины Ультрачойс 8 ("Zoetis Inc, США") и *Клостбовак-8 ("Ветбиохим", Россия)* против клостридиоза животных, штаммы бактерий *Mannheimia haemolytica*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella typhimurium* выделенные от больных животных, а также пробы биологического материала от крупного

рогатого скота с клиническими признаками клостридиозов.

В результате проведенных исследований специфическая реакция наблюдалась с культурами бактерий *Clostridium perfringens* (изолят Т2304), *Clostridium sordellii* (изолят Т2308), *Clostridium sporogenes* (изолят К2301), *Clostridium novyi* (изолят Н2408, *Clostridium histolytica* (изолят Н2308), *Clostridium difficile* (изолят Н2305). При исследовании вакцины Ультрачойс 8 ("Zoetis Inc, США") отмечали положительную реакцию на *Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Clostridium novyi, Clostridium sordellii, Clostridium perfringens* и *Clostridium histolytica*, а с вакциной *Клостбовак-8 ("Ветбиохим", Россия) – на Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Clostridium novyi* и *Clostridium perfringens*. *Clostridium aerotolerans* (изолят Т230) и *Clostridium populeti* (изолят А2301) были положительны только в реакции, определяющей их принадлежность к семейству. Исследования штаммов бактерий *Mannheimia haemolytica* (штамм «16»), *Pasteurella multocida* (штамм «Т80»), *Salmonella typhimurium* (штамм «1891»), *Escherichia coli* (штамм «F-50») дало отрицательные результаты, что подтверждает специфичность разработанного нами метода исследований.

С помощью разработанной ПЦР провели мониторинговые исследования 132 проб биологического материала, отобранных от животных разных половозрастных групп из хозяйств Иркутской, Кемеровской, Новосибирской, Омской, Тюменской областей и Алтайского края. У всех животных были зарегистрированы клинические признаки клостридиоза. Результаты исследования представлены в таблице.

Таблица – Результаты исследования проб биоматериала от животных с клиническими признаками клостридиоза

Вид биоматериала	Всего исследовано проб	Количество идентифицированных изолятов клостридий						
		Clostridium histolytica	*Clostridium septicum*	*Clostridium perfringens*	*Clostridium sporogenes*	*Clostridium sordelli*	*Clostridium novyi*	Нетипируемые виды
Печень	13	2	0	2	2	1	0	1
Лимфатические узлы	11	5	0	11	0	1	0	0
Толстый и тонкий кишечник	11	0	0	2	0	0	0	4
Сычуг	18	0	0	4	0	0	0	2
Мышцы	47	2	2	11	1	2	2	3
Суставная жидкость	18	1	0	3	0	0	0	0
Вымя	11	1	0	1	0	2	0	0
Смывы из влагалища	3	0	0	3	0	0	0	1
Всего	**132**	**11**	**2**	**37**	**3**	**6**	**2**	**11**

С помощью, разработанной ПЦР в пробах биоматериала были выявлены и идентифицированы следующие виды: *Clostridium histolyticum, Clostridium septicum, Clostridium perfringens, Clostridium sporogenes, Clostridium sordellii* и *Clostridium novyi.* При этом чаще всего выявляли Clostridium perfringens (28 %). 8,3 % от числа исследованных проб были положительными при определении принадлежности к семейству, но не являлись представителями ни к одному из девяти видов клостридий, определяемых разработанным методом.

Для подтверждения специфичности метода у семи выделенных изолятов клостридий видовая принадлежность была подтверждена путем секвенирования фрагмента гена 16S rRNA с применением специфичных для рода праймеров, а у четырех – определена последовательность фрагмента гена токсина. Последовательности всех секвенированных фрагментов генов были размещены в базе данных GenBank.

Кроме патогенных для крупного рогатого скота видов *Clostridium perfringens* (Номера

последовательностей в GenBank PQ533117 и PQ533118), *Clostridium sordellii* (PQ533119), *Clostridium novyi* (PQ533121), *Clostridium chauvoei* (PQ559125), *Clostridium histolyticum* (PQ559127), *Clostridium haemolyticum* (PQ559126) и *Clostridium septicum* (PQ559124), были выявлены непатогенные виды *Clostridium aerotolerans* (PQ533123), *Clostridium populeti* (PQ533124) и *Clostridium sporogenes (*PQ533120).

Выводы. Таким образом, в результате проведенного исследования разработан и валидирован способ выявления девяти видов патогенных для крупного рогатого скота клостридий и получены данные о распространении этих видов в животноводческих хозяйствах Сибири. Показано, что от крупного рогатого скота с клиническими признаками клостридиозов могут быть выделены кроме патогенных (*Clostridium perfringens, Clostridium sordellii, Clostridium chauvoei, Clostridium histolyticum, Clostridium haemolyticum, Clostridium septicum*) и другие, непатогенными виды (*Clostridium aerotolerans, Clostridium populeti*, *Clostridium sporogenes)*. Необходимы дальнейшие исследования для оценки роли этих видов бактерий в патологии животных.

Список литературы

1. Глотова Т. И. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота / Т. И. Глотова, Т. Е. Терентьева, А. Г. Глотов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2017. – Т. 47. – № 1. – С. 90–96.

2. Капустин А. В. Мониторинг распространенности и патогенных свойств видов Clostridium у сельскохозяйственных животных и птиц в Российской Федерации / А. В. Капустин, П. Н. Шастин, В. А. Савинов [и др.] // Аграрная наука. – 2025. – № 12. – С. 16–21.

3. Капустин А. В. Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота / А. В. Капустин, А. И. Лаишевцев, О. Д. Скляров [и др.] // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – № 63. – С. 170–175.

4. Шастин П. Н. Видовое разнообразие клостридий у крупного рогатого скота / П. Н. Шастин, В. А. Савинов, А. И. Лаишевцев [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2025. – Т. 14. – № 2. – С. 194–200.

5. Bakhtiary F. Identification of Clostridium spp. derived from a sheep and cattle slaughterhouse by matrix-assisted laser desorption and ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and 16S rDNA sequencing / F. Bakhtiary, H. R. Sayevand, M. Remely [et al.] // Journal of Food Science and Technology. – 2018. – Vol. 55. – No. 8. – P. 3232–3240.

6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes. – 2nd ed. – New York : Springer-Verlag, 2009. – 18p.

7. Chean R. Comparing the identification of Clostridium spp. by two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: a detailed analysis of age of culture and sample preparation / R. Chean, D. Kotsanas, M.J. Francis [et al.] // Anaerobe. – 2014. – Vol. 30. – P. 85–89.

8. Rahman M. T. Zoonotic diseases: etiology, impact, and control / M. T. Rahman, M. A. Sobur, M. S. Islam [et al.] // Microorganisms. – 2020. – Vol. 9. – P. 1405–1425.

9. Seekatz A. M. Advances in Understanding the Pathogenesis of Clostridioides difficile Infection / A. M. Seekatz, M.C. Abt // Infectious Disease Clinics of North America. – 2025. – Vol. 39, No. 4. – P. 761–779. – DOI: 10.1016/j.idc.2025.07.001.

10. Uzal F. A. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals / F.A. Uzal, M.A. Navarro, J. Li [et al.] // Anaerobe. – 2018. – Vol. 53. – P. 11–20.