

DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-5-984

УДК 619:001.891.53:577.21:577.21:616-022.14



Научная статья

РАЗРАБОТКА НАБОРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM И ТОКСИНОТИПОВ CL. PERFRINGENS

*Н.А. Безбородова, Н.А. Мартынов, Е.Н. Шилова, В.Д. Зубарева,
В.В. Кожуховская, О.В. Соколова*

Клостридиоз крупного рогатого скота является одной из важнейших проблем ветеринарной медицины, животноводства и безопасности пищевых продуктов. Возбудители клостридиоза вызывают инфекционные заболевания, относящиеся к зооантропонозным. Клостридии присутствуют в желудочно-кишечном тракте и в виде спор в тканях здоровых животных и могут вызывать заболевания при температурном или производственном стрессе, минеральном дисбалансе, травмах и нарушении иммунного ответа. Клостридии образуют высокоустойчивые споры, которые могут сохраняться в окружающей среде в течение длительного периода времени.

Целью нашей работы являлась разработка новых и оптимизация существующих ПЦР тест-систем для диагностики бактерий рода *Clostridium* и токсинотипов *Cl. perfringens*. Актуальность разработок тест-систем связана с отсутствием коммерческих наборов для диагностики многих видов клостридий, что затрудняет постановку правильного диагноза и подбора рациональной терапии и вакцинопрофилактики.

Материалы и методы. Разработанные и оптимизированные тест-системы для диагностики клостридиозов основаны на методах ПЦР в реальном времени и классической ПЦР.

*В данной статье представлены результаты разработок тест-систем для быстрой и недорогой диагностики значимых для животноводства клостридиальных инфекций. Впервые были созданы тест-системы для детекции *Cl. sordellii*, *Cl. novyi* (типы А, В) методом классической ПЦР и *Cl. histolyticum* в режиме реального времени и оптимизированы ПЦР тест-системы для об-*

наружения *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum* в режиме реального времени, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum* методом классической ПЦР и мультиплексная тест-система для типизации изолятов *Cl. perfringens* (A-E).

Ключевые слова: ПЦР; *Clostridium*; клостридиальная инфекция; анаэробы; ПЦР в реальном времени; электрофорез; крупный рогатый скот

Для цитирования. Безбородова Н.А., Мартынов Н.А., Шилова Е.Н., Зубарева В.Д., Кожуховская В.В., Соколова О.В. Разработка наборов для идентификации бактерий рода *Clostridium* и токсинотипов *Cl. perfringens* // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2024. Т. 16, №5. С. 130-155. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-5-984

Original article

DEVELOPMENT OF PCR KITS FOR BACTERIA OF THE GENUS CLOSTRIDIUM AND TOXINOTYPES *CL. PERFRINGENS* IDENTIFICATION

N.A. Bezborodova, N.A. Martynov, E.N. Shylova, V.D. Zubareva, V.V. Kozhukhovskaya, O.V. Sokolova

Bovine clostridiosis is one of the major problems in veterinary medicine, animal husbandry and food safety. Clostridia cause zoonotic infectious diseases. The causative agents of clostridiosis produce highly resistant spores that can persist in the environment for a long period of time. They are also present in the gastrointestinal tract and as spores in the tissues of healthy animals and can cause disease due to temperature or productive stress, mineral imbalances, injury and impaired immune response.

The aim of our work was to develop new and optimize existing PCR protocols for the diagnosis of Clostridium bacteria and Cl. perfringens toxinotypes. The relevance of the development of PCR kits is associated with the lack of commercially available ones for the diagnosis of many types of clostridia. This makes it difficult to make the correct diagnosis and select rational therapy and vaccination.

Materials and methods. Developed and optimized methods for the diagnosis of clostridiosis are based on real-time PCR and conventional PCR.

This article presents the results of the development of PCR methods for rapid and inexpensive diagnosis of clostridial infections that are significant for livestock farming. For the first time, PCR kits were created for the detection of Cl. sordellii,

Cl. novyi (types A, B) using conventional PCR and *Cl. histolyticum* in real time. Moreover, we have optimized PCR conditions and reagent mix for the detection of *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum* in real time, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum* using conventional PCR as well as a multiplex PCR for *Cl. perfringens* (A-E) typing.

Keywords: PCR; *Clostridium*; clostridial infection; anaerobes; real-time PCR; electrophoresis; cattle

For citation. Bezborodova N.A., Martynov N.A., Shilova E.N., Zubareva V.D., Kozhukhovskaya V.V., Sokolova O.V. Development of PCR Kits for Bacteria of the Genus *Clostridium* and Toxinotypes *Cl. Perfringens* Identification. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2024, vol. 16, no. 5, pp. 130-155. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-5-984

Введение

Клостридиальные инфекционные заболевания крупного рогатого скота наносят значительный экономический ущерб молочному скотоводству, связанный с уменьшением воспроизводства молока, негативным влиянием на репродуктивную функцию, увеличением затрат на лечение, а также повышением риска выбраковки животных. Клостридии – облигатные анаэробные спорообразующие грамположительные бактерии, способные вызывать широкий спектр патологий у животных [9]. Патогенность выражается в выработке токсинов и повреждением тканей. Исход клостридиальной инфекции как правило неблагоприятный, несмотря на наличие у возбудителей заболевания чувствительности к наиболее распространенным в ветеринарной практике антибиотикам [7].

Патогенные виды клостридий можно разделить на три группы в зависимости от их токсигенной активности (энтеротоксичные, гистотоксичные, нейротоксичные) в отношении тканей-мишеней [14; 20]. *Clostridium perfringens* является основной причиной ряда заболеваний у животных, в частности газовой гангрены, возникающей в основном после инфицирования ран бактериальными спорами, и расстройств желудочно-кишечного тракта, которые либо поражают исключительно кишечник, либо дополнительно вызывают генерализованные симптомы, например, «мягкая почка» у жвачных животных. *Cl. perfringens* подразделяют на пять типов, от А до Е, в зависимости от продукции четырех основных токсинов (альфа, бета, эпсилон и йота) [19]. Различные их типы связаны с определенными заболеваниями [11]. Вирулентность *Clostridium difficile* опосредована двумя основными токсинами: токсин А (TcdA) и токсин

В (tcdB), при этом некоторые штаммы продуцируют бинарный токсин (CDT). Известно, что токсигенная *Cl. difficile* вызывает развитие диареи у телят [21].

Видовой состав рода *Clostridium*, вызывающий заболевания в животноводческих хозяйствах, изучен недостаточно, особенно в Российской Федерации. В исследовании Данилюк А.В. и Капустина А.В., по результатам скрининга распространения клостридиоза у крупного рогатого скота на территории РФ, наиболее значимыми, с точки зрения ветеринарии, видами клостридий являются: *Cl. perfringens* тип А; *Cl. perfringens* тип С; *Cl. perfringens* тип D; *Clostridium septicum*; *Clostridium novyi* тип В; *Clostridium chauvoei*; *Clostridium tetani* [1-3]. *Clostridium botulinum* и *Clostridium tetani* продуцируют два токсина BoNT и TeNT, вызывающие наиболее опасные инфекционные заболевания: ботулизм и столбняк соответственно [16]. Псевдомембранозный колит, эмфизематозный карбункул, некротический гепатит овец и нетравматическая газовая гангрена также являются заболеваниями, связанными с токсинами, продуцируемыми другими клостридиями, такими как *Clostridium difficile*, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei* и *Clostridium novyi* [22]. Бактерии рода *Clostridium*, трудно изолировать и культивировать, они чрезвычайно чувствительны даже к низким уровням кислорода в окружающей среде [10]. В связи с этим существует необходимость в разработке быстрой и недорогой диагностики клостридиальных инфекций. Технология ПЦР позволяет обнаруживать определенные гены-мишени микроорганизмов в большом количестве проб, тем самым обеспечивая идентификацию патогенных бактерий.

Целью нашей работы являлась разработка новых и оптимизация существующих ПЦР тест-систем для диагностики бактерий рода *Clostridium* и токсинотипов *Cl. perfringens*.

Научная новизна исследований

В настоящее время в Российской Федерации для диагностики клостридиальных инфекций у животных доступны только две коммерческие ПЦР-тест-системы, одна из них для детекции ДНК *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* – «РеалБестВет ДНК *Cl. difficile/Cl. perfringens*», а другая предназначена для типирования *Cl. difficile* «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile tcdA/tcdB/CDT*» (АО «Вектор-Бест», Россия). Поэтому разработка тест-систем для идентификации различных бактерий рода *Clostridium* и токсинотипов *Cl. perfringens* является весьма перспек-

тивным направлением в диагностике клостридиальных инфекций крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследования

Работа осуществлена в отделе геномных исследований и селекции животных на базе Уральского НИВИ – структурном подразделении ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН.

В период 2023 года исследовано 340 биологических проб из 32 молочного-товарных предприятий, в том числе из 27 предприятий, проводящих вакцинацию против клостридиальной инфекции и из 5 сельскохозяйственных предприятий Уральского региона, не применяющих ветеринарные иммунобиологические препараты.

На исследования поступали следующие пробы: кал, молоко, эксудат из абсцессов, кусочки пораженных мышц, отделяемое (сукровица) с раневых поверхностей, смывы с раневых поверхностей копытцев задних конечностей коров, суставная жидкость, смывы из носовых ходов, цервиковагинальные смывы, абортированный плод, плацента; патологические материалы от погибших телят и коров – сердце, печень, почки, селезенка, легкие, рубец, сычуг, сетка, кишечник. Также на исследования направляли корма и комбикормовое сырье (силос кукурузный, белковая добавка, клевер, люцерна, сенаж).

В ходе работы по результатам клинического осмотра были сформированы экспериментальные группы коров с признаками клостридиальной инфекции. Формирование групп животных осуществляли с учетом проведения вакцинации против клостридиозов и отсутствием специфической иммунопрофилактики в сельскохозяйственных организациях, для изучения видового разнообразия анаэробной микрофлоры кишечника, в том числе клостридий, и влияния применения ветеринарных иммунобиологических препаратов на биоразнообразие спорообразующих бактерий, с изучением эффективности применяемых схем вакцинации.

Подготовка исследуемого материала для ПЦР-исследований. Пробы тканей и органов гомогенизировали с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора TissueLyser LT (QIAGEN GmbH, Германия), затем готовили 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе, которую использовали в качестве материала для выделения нуклеиновых кислот. Корма доставляли в лабораторию в количестве 1-1,5 кг в целлофановых пакетах, усредняли пробу,

перемалывали и измельчали на мельнице ВЬЮГА-3МТ (Россия). Фекалии и молоко направляли в лабораторию в стерильных одноразовых пластиковых контейнерах. Смывы с раневых поверхностей, смывы из носовых ходов, цервико-вагинальные смывы отбирали в пробирки Эппендорф. Суставная жидкость, экссудаты поступали в лабораторию в стерильных шприцах.

В работе применяли коммерческий набор для выделения ДНК из биоматериала «Diatom DNA Prep 200» (ООО «ИзоГен», Россия). Для получения качественной ДНК из фекалий использовали специализированный набор HiPure Stool DNA Kit (Guangzhou Magen Biotechnology Co., Китай). Для выявления клостридиальной инфекции в биоматериале применяли тест-наборы «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile/Cl. perfringens*», с типизацией «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile tcdA/tcdB/CDT*» (АО «Вектор-Бест», Россия). Амплификацию в режиме реального времени проводили с применением оборудования QuantStudio 5 (США). Концентрацию выделенной ДНК измеряли на флуориметре MaxLife (Россия) с набором реагентов dsDNA (ООО МВМ-Диагностик», Россия).

Подбор олигонуклеотидов. Подбор праймеров производили с использованием Primer3Plus [18] на референсы генов *Clostridium sordellii* – ген фосфолипазы *C (csp)*, *Cl. histolyticum* – ген коллагеназы *H (colH)*, *Cl. chauvoei* и *Cl. septicum* – ген, кодирующий регулятор транскрипции, необходимый на ранних стадиях споруляции (*spo0A*), *Cl. tetani* – ген тетанотоксина (*TeNT*), *Cl. botulinum* (тип C) – ген ботулотоксина типа C (*BoNT/C*), *Cl. novyi* тип А и тип В – гены, кодирующие флагеллины А и В соответственно (*FliA (A)* и *FliA (B)*). Выравнивание последовательностей генов производили в UGENE V42.0 [15]. Специфичность праймеров проверяли при помощи NCBI Primer BLAST [8]. Способность праймеров образовывать вторичные структуры оценивали с использованием ThermoFisher Multiple Primer Analyzer [4].

Генотипирование клостридий проводили по модифицированным протоколам (таблица 1). В состав реакционной смеси 20 мкл входили: готовая реакционная смесь Экстра-микс HS-Тaq (ООО «ДиаЭм», Россия), интеркалирующий краситель Eva488 для ПЦР, 20x (Lumiprobe Ltd., Россия), 1,16 mM MgCl₂, 15-40 нг ДНК, 0,35 мкМ каждого праймера (ООО «ДНК-Синтез», Lumiprobe Ltd., Россия).

Амплификацию проводили с использованием термоциклера SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, США) по следующей программе, представленной в таблице 2.

Таблица 1.

Последовательность праймеров, применяемых в исследовании

Название бактерии	Ген	Размер ампликона, п.н.	Последовательность 5'-3'	Источник
<i>Cl. sor-dellii</i>	<i>csp</i>	209	F:GCAGGAAGTACGATA-ATGTAT R:CAATCGTCACTTATGTG-TGTGTT	Данное исследование
<i>Cl. histolyticum</i>	<i>colH</i>	182	F:ACTCCTCCCGTTTTA-AATAGAA R:AACGCCATTTTTAG-TAGTGTC R:[ROX]GCAGGAACATTAG-TATATCTTC[BHQ2]	Данное исследование
<i>Cl. chauvoei</i>	<i>spo0A</i>	149	F:CWCAAAGAGCTAT-TACTTTAGGAG R:AGSTRCTTCTGTTTCTA-CAACTG P:[r6g]ACGGTGCTCCTA-CAGAATCCATTAGA[BHQ2]	doi:10.1016/j.mcr.2010.03.003
<i>Cl. septicum</i>	<i>spo0A</i>	149	F:CAAAGAGCTAT-TACTTTAGGAG R:CTTCTGTTTCTACAACCTG P:[FAM]ATGGTGTTCCCTA-CAGAAGCAGTTAGA[BHQ1]	doi:10.1016/j.mcr.2010.03.003
<i>Cl. tetani</i>	<i>TeNT</i>	111	F:CCTAGTTTCAAAACT-TATTGGCTTATGTAA R:CATAATTCCTCCTCAATAATCTGTTAATGATG	doi:10.1292/jvms.12-0271
<i>Cl. botulinum (C)</i>	<i>BoNT/C</i>	328	F:TTTATACGAGAATGTTTCYG R:CATTATATCCTGATG-TATCC	doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01070.x
<i>Cl. novyi</i> тип А	<i>FliA (A)</i>	230	F:ATGAGAGAATTAG-CAGTTCAAACATCT R:TCTTCTGTTCCCAT-ACTTGCAATATTT	Данное исследование
<i>Cl. novyi</i> тип В	<i>FliA (B)</i>	151	F:GCTATAGATACTGCAATA-AACACAGT R:TTGCCATATCAAC-GTCTCTTATCTT	Данное исследование

Таблица 2.

Режимы амплификации, применяемые в исследовании

Стадия	t °C	Время	Цикл
Начальная денатурация	95°C	5 минут	×1
Денатурация	95°C	20 сек	×35
Отжиг праймеров: <i>Cl. sordellii</i> <i>Cl. tetani</i>	60°C		
Отжиг праймеров: <i>Cl. histolyticum</i> <i>Cl. septicum</i>	59°C		
Отжиг праймеров: <i>Cl. novyi</i> тип А <i>Cl. novyi</i> тип В	58°C		
Отжиг праймеров: <i>Cl. botulinum</i> (C u D)	52°C		
Элонгация	72°C	25 сек	

В качестве контроля использовалась ДНК, выделенная из чистых культур: *Cl. chauvoei* Я2, *Cl. botulinum* тип С, *Cl. sordelli* №3, *Cl. septicum* №1098 (коллекция штаммов ФГБУ «ВГНКИ», Москва), *Cl. septicum* ATCC 12464 (ГКПМ-Оболенск), *Cl. oedematiens* (*Cl. novyi*) 198 тип С (ГКПМ-Оболенск), *Cl. oedematiens* (*Cl. novyi*) №794 тип А, *Cl. gigas* 2ТД (*Cl. novyi* тип В), *Cl. haemolyticum* «Аму1» (*Cl. novyi* типа D) (коллекция штаммов ФГБУ «ВГНКИ», Москва).

Обработку специфичности праймеров проводили на штаммах: *Cl. sordelli* №3, *Cl. botulinum* тип С, *Cl. chauvoei* Я2, *Cl. oedematiens* №34, *Cl. histolyticum* №469, *Cl. gigas* 2ТД, *Cl. haemolyticum* «Аму1», *Cl. septicum* №1098 (коллекция штаммов ФГБУ «ВГНКИ», Москва).

Токсинотипы *Cl. perfringens* определяли методом ПЦР на основании наличия генов, кодирующих ϵ -токсин – *etx*, ι -токсин – *iap*, фосфолипазу С – *plc*, энтеротоксин – *spe* и β -токсин – *cpb*. Генотипирование проводили по протоколу, предложенному Julian I. Rood [17] (таблица 3). Также с помощью данного метода выявления генов токсинотипов, возможно определение *Cl. perfringens* типа F, неспецифичного для животных.

В состав реакционной смеси 10 мкл входили: SE-Буфер производства SibEnzyme (60 мМ Трис-HCl (pH 8,6), 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0.1% Трион X-100), 0,18 мМ каждого dNTP, 1,16 мМ MgCl₂, 0,06 ед. Taq-полимеразы (SibEnzyme); 15-40 нг ДНК, 0,35 мкМ каждого праймера («ДНК-Синтез», Россия).

Таблица 3.

**Последовательность праймеров для детекции генов *etx*, *iap*, *plc*,
cpe и *cpb* *Cl. perfringens***

Ген	Последовательность 5'–3'	Размер ампликона, п.н.
<i>etx</i>	ETX_F:CCACTTACTTGTCCCTACTAAC	656
	ETX_R:GCGGTGATATCCATCTATTC	
<i>iap</i>	IAP_F:GGAAAAGAAAATTATAGTGATTGG	461
	IAP_R:CCTGCATAACCTGGAATGGC	
<i>plc</i>	PLC_F:GGACCAGCAGTTGTAGATA	324
	PLC_R:CCTCTGATACATCGTGTAAAG	
<i>cpe</i>	CPE_F:GGAGATGGTTGGATATTAGG	233
	CPE_R:GGACCAGCAGTTGTAGATA	
<i>cpb</i>	CPB_F:GCGAATATGCTGAATCATCTA	196
	CPB_R:GCAGGAACATTAGTATATCTTC	

Температурные режимы амплификации: предварительная денатурация при 95°C – 5 минут; далее 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 секунд, отжиг праймеров при 60°C – 30 секунд, элонгация при температуре 72°C – 30 секунд. В качестве контроля использовали ДНК, выделенную из чистых культур: *Cl. perfringens* ATCC 13124 тип А (BD Microtrol, США), *Cl. perfringens* №307 тип А, *Cl. perfringens* «LD4» тип В, *Cl. perfringens* «Октябрь» тип С, *Cl. perfringens* «Амо» тип С, *Cl. perfringens* №213 тип D, *Cl. perfringens* №413 тип Е, *Cl. perfringens* №342 тип Е (коллекция штаммов ФГБУ «ВГНКИ», Россия).

Оценку специфичности разработанных реакций проводили с использованием гель-электрофореза в 3% агарозном геле и системы капиллярного электрофореза Qsep100 (BiOptic, Тайвань). Для капиллярного электрофореза использовали картридж S1 (BiOptic, Тайвань), выравнивающий маркер 20 п.н. – 1 Кб и маркер длин ДНК от 15 до 622 п.н. С помощью специализированного ПО Q-Analyzer выбраны условия электрофореза для наиболее точного анализа и проведена интерпретация результатов.

Результаты исследования и их обсуждение

Для наработки специфичного участка гена *spoA* *Cl. chauvoei* и *Cl. septicum* использованы вырожденные праймеры с гибридизационными олигонуклеотидными зондами (Таблица № 1), ранее предложенные Lange M. [13]. Данные праймеры инициируют амплификацию целевого участка гена

spo0A, образуя ампликон в 149 п.н. Дифференциация между *Cl. chauvoei* и *Cl. septicum* происходит за счет использования олигонуклеотидных зондов, позволяющих одновременно идентифицировать *Cl. chauvoei* по каналу HEX и *Cl. septicum* по каналу ROX. Валидацию полученных результатов проводили с использованием коллекционных штаммов *Cl. chauvoei* Я2, *Cl. septicum* №1098 (рисунок 1).

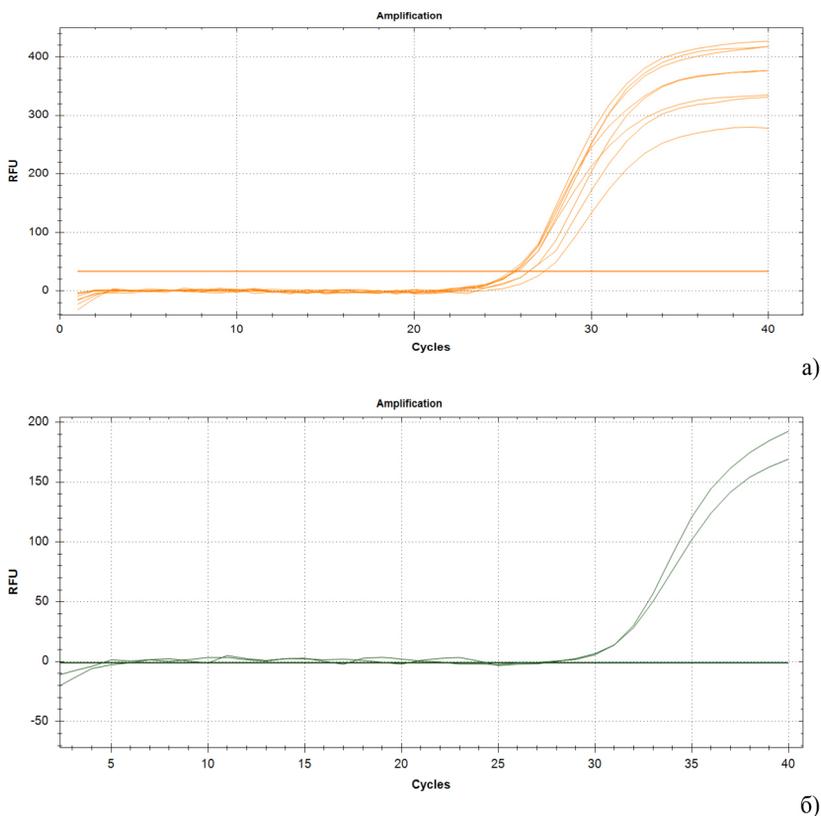


Рис. 1. а) График ампликации *Cl. septicum* в real-time ПЦР по каналу ROX; б) График ампликации *Cl. chauvoei* в real-time ПЦР по каналу HEX.

Подобраны и отработаны праймеры на обнаружение гена *csp*, кодирующего фосфолипазу *Cl. sordellii* в real-time ПЦР с применением интеркалирующего красителя Eva488 со считыванием по каналу SYBR (рисунок 2).

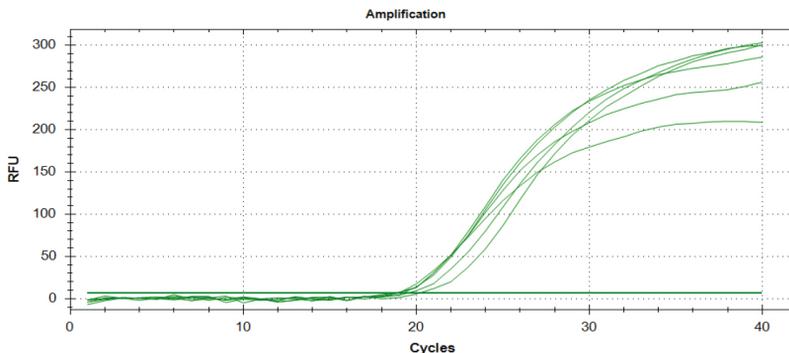


Рис. 2. Графики амплификации *Cl. sordellii* в real-time ПЦР по каналу SYBR

Для обнаружения бактерий *Cl. tetani* был отработан и адаптирован протокол, ранее описанный Huang S.W. [12] (рисунок 3). Предложенные праймеры инициировали амплификацию целевого участка гена *TeNT* в 111 п.н. Для валидации результатов из-за отсутствия музейных штаммов *Clostridium tetani*, был синтезирован положительный контроль, идентичный целевому участку: 5-CCT AGT TTC AAAACT TAT TGG CTT ATG TAA AAAA AAT TAT ACC ACC AAC AAA TAT AAG AGA AAA TTT ATA TAA CAG AAC TGC ATC ATT AAC AGA TTT AGG AGG AGA ATT ATG – 3.

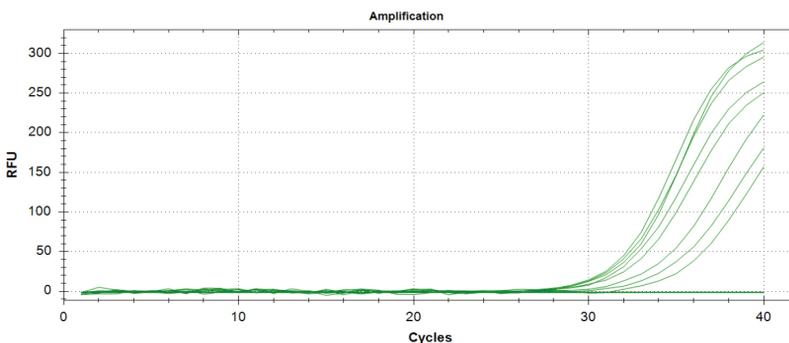


Рис. 3. Графики амплификации *Cl. tetani* в real-time ПЦР по каналу SYBR

Для генотипирования *Cl. novyi* типа А и В были выбраны специфичные гены *FliA* (A, B), отвечающие за способность вырабатывать различные по антигенным свойствам токсины. Праймеры были отработаны в real-time ПЦР для амплификации фрагмента длиной 182 п.н. (рисунок 4).

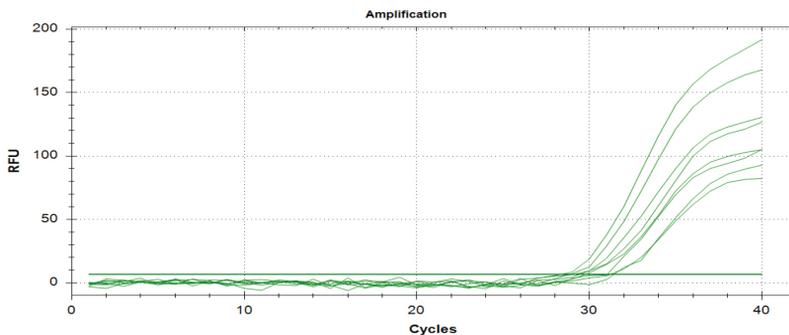


Рис. 4. Графики амплификации *Cl. novyi* A, B в real-time ПЦР по каналу SYBR

Были подобраны и отработаны праймеры для определения гена *colH* *Cl. histolyticum*, кодирующего коллагеназу и желатиназу. Оценку специфичности разработанных реакций проводили с использованием гель-электрофореза (ампликон 182 п.н.) (рисунок 6).

Для выявления *Cl. botulinum* типа C использовали праймеры высококонсервативной части гена *BoNT/C*, регулирующего выработку нейропаралитического токсина, связанного со вспышками ботулизма у животных и птиц. Оценку специфичности разработанных реакций проводили с использованием штамма *Cl. botulinum* тип C, ампликон длиной 322 п.н. (рисунок 9).

Подобранные праймеры показали свою специфичность в отношении гена *spo0A* *Cl. chauvoei* и *Cl. histolyticum* (149 п.н.), гена *colH* *Cl. histolyticum* (182 п.н.), гена *csp* *Cl. sordellii* (209 п.н.), гена *TeNT* *Cl. tetani* (111 п.н.), генов *FliA (A)* и *FliA (B)* для типирования *Cl. novyi* типов A и B (230/151 п.н.) и гена (*BoNT/C*) *Cl. botulinum* (328 п.н.) в электрофорезном варианте на агарозном геле с использованием ДНК коллекционных штаммов *Cl. oedematiens* (*Cl. novyi*) №794 тип A, *Cl. gigas* 2ТД (*Cl. novyi* тип B), *Cl. haemolyticum* «Аму1» (*Cl. novyi* типа D), *Cl. histolyticum* №469, *Cl. sordelli* №3, *Cl. septicum* №1098, *Cl. chauvoei* Я2, *Cl. perfringens* ATCC 13124 тип A, *Cl. botulinum* тип C и синтезированного положительного контроля специфичного целевому участку *TeNT* (111 п.н.) (рисунок 5, 6, 7, 8, 9).

В результате проведенной работы были разработаны тест-системы для детекции *Cl. histolyticum* в режиме реального времени и *Cl. sordellii*, *Cl. novyi* (типы A, B) методом классической ПЦР. Помимо этого, были оптимизированы ПЦР тест-системы для обнаружения в биоматериале ДНК *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum* в режиме реального времени, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum* методом классической ПЦР.

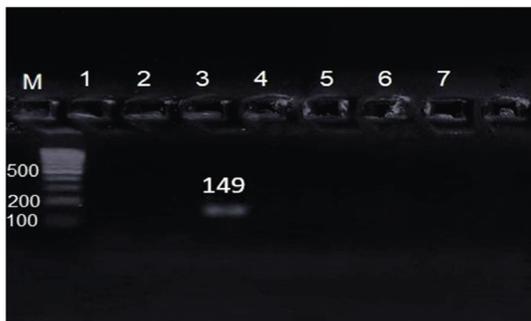


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными гену *spo0A* *Cl. chauvoei* и *Cl. septicum*. Обозначения: 1 – ДНК *Cl. sordellii*, 2 – ДНК *Cl. haemolyticum*, 3 – ДНК *Cl. chauvoei/Cl. septicum* (149 п.н.), 4 – ДНК *Cl. histolyticum*, 5 – ДНК *Clostridium perfringens* тип А, 6 – ДНК *Cl. botulinum*, 7 – ДНК *Cl. novyi* тип А, 8 – ДНК *Cl. novyi* тип В, М – размерный стандарт, шаг 100 п.н.



Рис. 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными гену *colH* *Clostridia histolyticum*. Обозначения: 1 – ДНК *Cl. sordellii*, 2 – ДНК *Cl. haemolyticum*, 3 – ДНК *Cl. chauvoei*, 4 – ДНК *Cl. histolyticum* (182 п.н.), 5 – ДНК *Clostridium perfringens* тип А, 6 – ДНК *Cl. botulinum*, 7 – ДНК *Cl. novyi* тип А, 8 – ДНК *Cl. novyi* тип В, М – размерный стандарт, шаг 100 п.н.

Оптимизированная мультиплексная ПЦР-тест система для типирования *Cl. perfringens* была проверена на специфичность с помощью пластинчатого гель-электрофореза и капиллярного гель-электрофореза (рисунок 10 а, б, в). После обработки праймеров на штаммах клостридий были выявлены гены *plc*, *etx*, *iap*, *cpe*, *cpb*, определяющие токсинотипы *Cl. perfringens*: токсинотип А (ген *plc*), токсинотип В (гены *plc*, *etx*, *cpb*), токсинотип С (гены *plc*, *cpb*), токсинотип D (гены *plc*, *etx*, *cpe*), токсинотип Е (гены *cpe*, *plc*, *iap*).

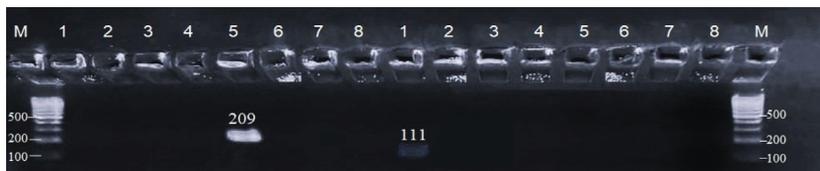


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными гену *csp Cl. sordellii* и гену *TeNT Cl. tetani*. Обозначения: 1 – ДНК *Clostridium perfringens* тип А, 2 – ДНК *Cl. haemolyticum*, 3 – ДНК *Cl. chauvoei*, 4 – ДНК *Cl. histolyticum*, 5 – ДНК *Cl. sordellii* (209 п.н.), 6 – ДНК *Cl. botulinum*, 7 – ДНК *Cl. novyi* тип А, 8 – ДНК *Cl. novyi* тип В; 1 – синтезированный положительный контроль, гомологичный *Cl. tetani* (111 п.н.), 2 – ДНК *Cl. haemolyticum*, 3 – ДНК *Cl. chauvoei*, 4 – ДНК *Cl. histolyticum*, 5 – ДНК *Cl. sordellii*, 6 – ДНК *Cl. botulinum*, 7 – ДНК *Cl. novyi* тип А, 8 – ДНК *Cl. novyi* тип В; М – размерный стандарт, шаг 100 п.н.

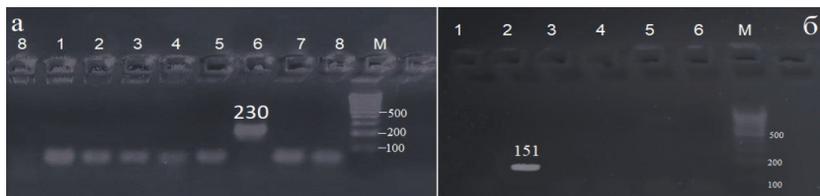


Рис. 8 (а). Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными гену *FliA (A) Cl. novyi* тип А и гену *FliA (B) Cl. novyi* тип В. Обозначения: 1 – ДНК *Clostridium perfringens* тип А, 2 – ДНК *Cl. haemolyticum*, 3 – ДНК *Cl. chauvoei*, 4 – ДНК *Cl. histolyticum*, 5 – ДНК *Cl. sordellii*, 6 – ДНК *Cl. novyi* тип А (230 п.н.), 7 – ДНК *Cl. botulinum*, 8 – ДНК *Cl. novyi* тип В;

Рис. 8 (б). 1 – ДНК *Clostridium perfringens* тип А, 2 – ДНК *Cl. novyi* тип В (151 п.н.), 3 – ДНК *Cl. chauvoei*, 4 – ДНК *Cl. histolyticum*, 5 – ДНК *Cl. sordellii*, 6 – ДНК *Cl. botulinum*, 7 – ДНК *Cl. novyi* тип А, 8 – ДНК *Cl. haemolyticum*; М – размерный стандарт, шаг 100 п.н.

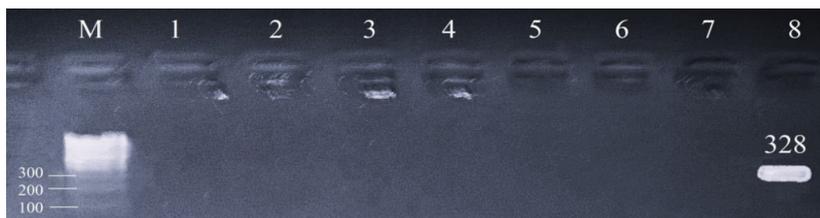


Рис. 9. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными гену *BoNT/C Cl. botulinum*. Обозначения: 1 – ДНК *Cl. sordellii*, 2 – ДНК *Cl. haemolyticum*, 3 – ДНК *Cl. chauvoei*, 4 – ДНК *Cl. histolyticum*, 5 – ДНК *Cl. perfringens* тип А, 6 – ДНК *Cl. novyi* тип В, 7 – ДНК *Cl. novyi* тип А, 8 – ДНК *Cl. botulinum* (328 п.н.), М – размерный стандарт, шаг 100 п.н.

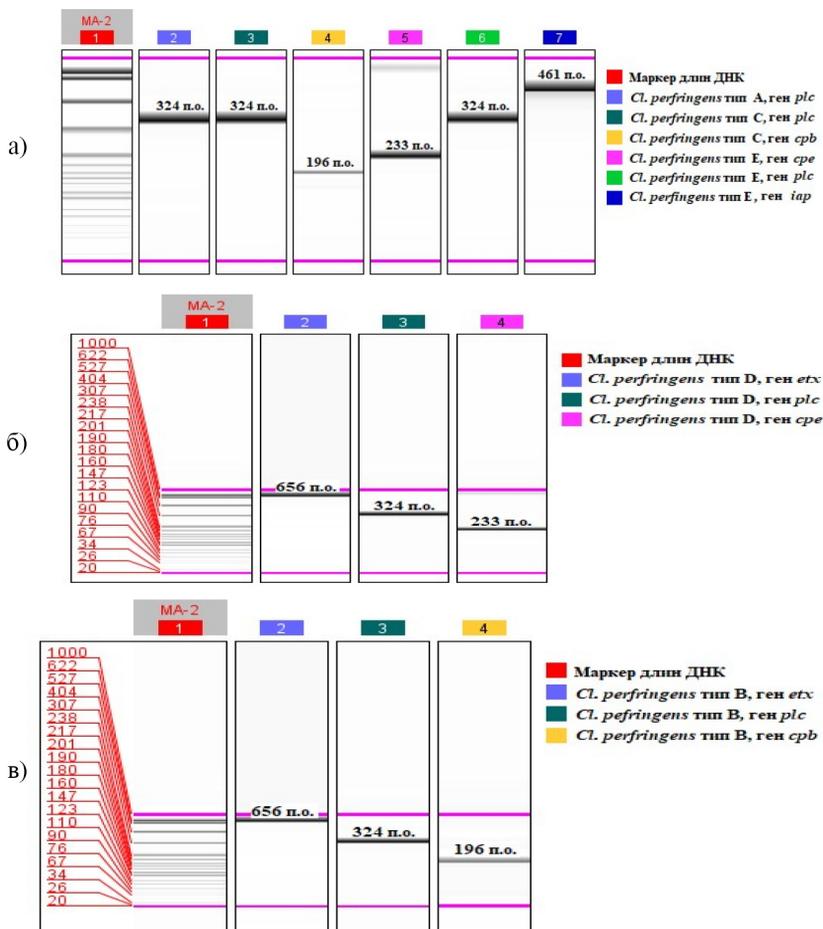


Рис. 10 (а, б, в). Результаты капиллярного электрофореза по типированию репрезентативных штаммов *Cl. perfringens* типа А-Е. Обозначения: ген *plc* (324 п.н.), ген *iap* (461 п.н.), ген *cpe* (233 п.н.), *cpb* (196 п.н.), ген *etx* (656 п.о.) – гены, отвечающие за выработку токсинов *Cl. perfringens*; MA-2 – маркер длин ДНК.

Выявление ДНК *Cl. difficile* в пробах и типирование на наличие генов, отвечающих за выделение токсинов, и ДНК *Cl. perfringens* проводили с использованием коммерческих тест-систем. Из поступивших на исследования 340 биопроб было выявлено 235 (69,1%) положительных проб.

Специфические участки ДНК *Cl. difficile* были выделены из 181 пробы (53,2%), ДНК *Cl. perfringens* обнаружена в 42 образцах (23,2%). Одновременное присутствие ДНК бактерий *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* было подтверждено в 47,6% проб. ДНК *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* обнаруживали как в биопробах кала (83,9%), так и в патологическом материале от павших телят и коров (8,9%), а также в биоматериалах (кусочки пораженных тканей, экссудаты из пораженных тканей задних конечностей коров) в 4,4% образцов, в кормах и кормовом сырье (белковые добавки, кукурузный силос) в 2,6% проб.

При выявлении коммерческим набором в биообразцах ДНК *Cl. perfringens*, проводили ПЦР в электрофорезном варианте для определения токсинотипов. Для примера, в объединенных образцах фекалий были выделены ДНК *Cl. perfringens* и обнаружен ген *plc* (324 п.н.), отвечающий за выработку альфа-токсина у типа А (рисунок 11).

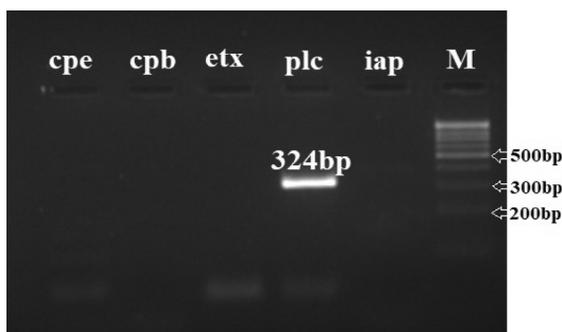


Рис. 11. Результаты электрофореграммы для генотипирования токсинотипа А *Cl. perfringens*. Обозначения: ген *plc* (324 п.н.); *etx*, *iap*, *cpe*, *cpb* – гены, отвечающие за выработку токсинов *Cl. perfringens*; М - стандарт размера с шагом 100 п.н.

Результаты типирования изолятов *Cl. perfringens*, выделенных из биоматериала, показали, что чаще всего в 28,9% проб был выявлен ген *plc*, относящий *Cl. perfringens* к токсинотипу А. Изоляты *Cl. perfringens* токсинотипа С обнаружены в 3,9 % проб, что подтверждало наличие генов *plc*, *etx*, *cpe*. Неспецифичная для крупного рогатого скота *Cl. perfringens* типа F (гены *plc*, *cpe*) установлена в 3,9% биопроб. В 1,5% проб выявлена *Cl. perfringens* типа D (*plc*, *etx*, *cpe*) и Е (*iap*, *cpe*, *cpb*). Единично в пробах было обнаружено сочетание токсинотипов А/С, С/Е, А/Е.

Чаще всего ДНК *Cl. perfringens* выявляли в пробах фекалий (78,9%), в патологическом материале от павших животных (13,2%), в экссудате из

абсцесса (2,3%), в биоматериале (смывы из носовых ходов, смывы из цервикального канала, суставная жидкость, плацента) единично.

Методом ПЦР в 16 образцах фекалий от коров и телят, имевших признаки диареи, была обнаружена ДНК *Cl. perfringens* с геном *plc*. Также в 3 образцах фекалий от телят были выявлены гены *plc*, *etx*, *cpe* *Cl. perfringens*, что позволяет отнести данные изоляты к токсинотипу D. В отдельных пробах фекалий обнаруживали *Cl. perfringens* тип C (гены *plc*, *cpb*) и F (гены *plc*, *cpe*). В пробах последа от абортировавшей коровы и суспензии из паренхиматозных органов от павшего теленка с признаками клостридиоза были обнаружены *Cl. perfringens* типа A. В смывах с раневых поверхностей и в экссудатах выявлена ДНК *Cl. perfringens* типа A и F. В одной пробе белковой добавки для коров обнаружена ДНК *Cl. perfringens* типа A.

Определенный нами в биопробах от животных возбудитель *Cl. difficile* обладал токсигенностью в 19,2% случаев. Чаще всего обнаруживали гены токсина B – в 9,9 % случаев, гены бинарного токсина (CDT) – в 8,2 % случаев, а также гены токсина A – в 4,9%. Иногда в биообразцах выявляли несколько токсинотипов *Cl. difficile* – токсины A+B+CDT в 16,5% проб, A+CDT в 6,6 % проб, сочетание A+B - 4,4 %, B+CDT - 2,7 %. Также были обнаружены нетоксигенные *Cl. difficile* в 30,2 % случаев.

В основном, токсигенная *Cl. difficile* была выделена из проб фекалий от телят с признаками диареи (90,0%) и единично у коров, что могло свидетельствовать о наличии острой кишечной инфекции. Известно, что *Cl. difficile* является ведущей причиной антибиотикоассоциированной диареи. Гены (TcdA, TcdB, CDT), отвечающие за выработку токсинов, являются основными факторами вирулентности [5]. Токсины, выделяемые *Cl. difficile*, повреждают эпителий кишечника у молодняка, что приводит к воспалению, повреждению тканей, к продукции провоспалительных цитокинов в макроорганизме и развитию заболевания [6].

С помощью подобранных и отработанных гомологичных праймеров, специфичных для участков генома бактерий рода *Clostridium*, в 5 биопробах фекалий были обнаружены - ДНК *Cl. tetani*. Единично выделена ДНК - *Cl. novyi* типа A из паренхиматозных органов от павшего животного. В 2 пробах фекалий от коров обнаружено сочетание геномов *Cl. tetani*/ *Cl. difficile*, в 1 пробе фекалий ДНК *Cl. tetani* / *Cl. perfringens* тип A, в пробе паренхиматозных органов от павшего животного ДНК *Cl. difficile* / *Cl. sordellii*, в экссудате раневого отделяемого геномы *Cl. difficile* / *Cl. sordellii* / *Cl. perfringens* типов A/F. В пробах люцерны были единично выделены ДНК *Cl. difficile*, в пробах белковой добавки и в сенаже обнаружено ДНК *Cl. difficile* / *Cl. perfringens*,

Cl. tetani/ *Cl. difficile* / *Cl. perfringens* тип А, *Cl. sordellii* / *Cl. septicum*, в кукурузном силосе ДНК *Cl. difficile* А, В, СДТ/ *Cl. perfringens*.

Проведенная комплексная диагностика отдельных случаев клостридиозов у крупного рогатого скота в сельскохозяйственных предприятиях на территории Уральского региона с учетом эпизоотических данных, клинических признаков, характерных патологоанатомических изменений, с применением лабораторной диагностики позволила верифицировать диагнозы: инфекционная анаэробная энтеротоксемия телят в одном случае, некротический энтерит у трех особей, кишечная токсикоинфекция, вызванная *Cl. perfringens* тип А у двух коров и у пяти телят, также газовая гангрена у двух павших животных с выявленными геномами патогенных анаэробов (*Cl. difficile* / *Cl. sordellii* / *Cl. perfringens* типов А/В).

Выводы

Впервые были созданы тест-системы для детекции следующих возбудителей клостридиальных инфекций у крупного рогатого скота – *Cl. sordellii*, *Cl. novyi* (типы А, В) методом классической ПЦР и *Cl. histolyticum* в режиме реального времени. Кроме того, были оптимизированы ПЦР тест-системы для обнаружения в биоматериале ДНК *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum* в режиме реального времени, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum* методом классической ПЦР и мультиплексная тест-система для типизации изолятов *Cl. perfringens* (А-Е).

На основании проведенного мониторинга в сельскохозяйственных организациях, где у животных не проводили вакцинацию от клостридиальной инфекции и в биопробах которых обнаруживали патогенные изоляты и генетический материал анаэробов, было предложено применение вакцин против клостридиозов с учетом видового разнообразия клинических изолятов бактерий рода *Clostridium*, циркулирующих на предприятиях. В ходе проведенных работ были даны рекомендации по профилактике и лечению раневых инфекций у коров и телят, рекомендации по дезинфекции и вакцинации против клостридиозов.

Заключение комитета по этике. Проведение исследований было одобрено Комитетом по институциональной этике ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук».

Информация о конфликте интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Информация о финансировании. Исследование проведено в рамках проекта № 23-26-00053 «Разработка тест-систем для молекулярно-генетической диагностики клостридий с идентификацией токсинотипов и генов антибиотикорезистентности» при финансовой поддержке Российского научного фонда.

Список литературы

1. Безбородова Н.А., Соколова О.В., Кожуховская В.В., Томских О.Г., Печура Е.В., Суздальцева М.А. Патогенные виды клостридий и их устойчивость к антибиотикам, факторы вирулентности и геномные особенности // Инновации и продовольственная безопасность. 2023. Т. 3. С. 39-51. <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2023-41-3-39-51>
2. Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Глотов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2017. Т. 47. № 1. С. 90-96.
3. Данилюк А.В., Капустин А.В. Распространенность и видовое разнообразие клостридий – возбудителей анаэробных инфекций крупного рогатого скота // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 2019. Т. 81. С. 19-26. <https://doi.org/10.30917/ATT-PRINT-2019-10>
4. Predicting DNA duplex stability from the base sequence / K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, L. A. Marky // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, vol. 83, no. 11, pp. 3746-3750. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746>
5. Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections / G. P. Carter, A. Chakravorty, T. A. Pham Nguyen, S. Mileto, F. Schreiber, L. Li, P. Howarth, S. Clare, B. Cunningham, S. P. Sambol, A. Cheknis, I. Figueroa, S. Johnson, D. Gerding, J. I. Rood, G. Dougan, T. D. Lawley, D. Lyras // mBio, 2015, vol. 6, no. 3, art. e00551. <https://doi.org/10.1128/mBio.00551-15>
6. Chandrasekaran R., Lacy D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection // FEMS microbiology reviews, 2017, vol. 41, no. 6, pp. 723–750. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>
7. Prevention of the main Clostridial diseases in cattle / R. Compiani, S. Grossi, L. Lucini, C.A. Sgoifo Rossi // Large Animal Review, 2021, vol. 27, no. 1, pp. 51-56.
8. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T. L. Madden // BMC bioinformatics, 2012, vol. 13, art. 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

9. Revisiting the evolution and taxonomy of *Clostridia*, a phylogenomic update / P. Cruz-Morales, C. A. Orellana, G. Moutafis, G. Moonen, G. Rincon, L. K. Nielsen, E. Marcellin // *Genome biology and evolution*, 2019, vol. 11, no. 7, pp. 2035-2044. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz096>
10. Edwards A. N., Suárez J. M., McBride S. M. Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment // *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2013, no. 79, art. e50787. <https://doi.org/10.3791/50787>
11. Popoff M. R., Brüggemann H. Regulatory networks controlling neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* // *Toxins*, 2022, vol. 14, no. 6, art. 364. <https://doi.org/10.3390/toxins14060364>
12. The utilization of a commercial soil nucleic acid extraction kit and PCR for the detection of *Clostridium tetanus* and *Clostridium chauvoei* on farms after flooding in Taiwan / S. W. Huang, J. P. Chan, W. Y. Shia, C. L. Shyu, K. C. Tung, C. Y. Wang // *The Journal of veterinary medical science*, 2013, vol. 75, no. 4, pp. 489-495. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0271>
13. Lange M., Neubauer H., Seyboldt C. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* // *Molecular and cellular probes*, 2010, vol. 24, no. 4, pp. 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.03.003>
14. NetF-producing *Clostridium perfringens* and its associated diseases in dogs and foals / I. Mehdizadeh Gohari, S. Unterer, A. E. Whitehead, J. F. Prescott // *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2020, vol. 32, no. 2, pp. 230-238. <https://doi.org/10.1177/1040638720904714>
15. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, UGENE team // *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
16. Popoff M. R., Brüggemann H. Regulatory networks controlling neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* // *Toxins*, 2022, vol. 14, no. 6, art. 364. <https://doi.org/10.3390/toxins14060364>
17. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme / J. I. Rood, V. Adams, J. Lacey, D. Lyras, B. A. McClane, S. B. Melville, R. J. Moore, M. R. Popoff, M. R. Sarker, J. G. Songer, F. A. Uzal, F. Van Immerseel // *Anaerobe*, 2018, vol. 53, pp. 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
18. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 / A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, J. A. Leunissen // *Nucleic acids research*, 2007, vol. 35(Web Server issue), pp. W71-W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
19. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease / F. A. Uzal, J. C. Freedman, A. Shrestha, J. R. Theoret,

- J. Garcia, M. M. Awad, V. Adams, R. J. Moore, J. I. Rood, B. A. McClane // *Future microbiology*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 361–377. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.168>
20. Clostridial diseases of horses: a review / F. A. Uzal, M. A. Navarro, J. Asin, E. E. Henderson // *Vaccines*, 2022, vol. 10, no. 2, art. 318. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020318>
21. Weese J. S. Clostridium (Clostridioides) difficile in animals // *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2020, vol. 32, no. 2, pp. 213–221. <https://doi.org/10.1177/1040638719899081>
22. Vaccine production to protect animals against pathogenic Clostridia / N. E. Zaragoza, C. A. Orellana, G. A. Moonen, G. Moutafis, E. Marcellin // *Toxins*, 2019, vol. 11, no 9, art. 525. <https://doi.org/10.3390/toxins11090525>

References

1. Bezborodova N. A., Sokolova O. V., Kozhukhovskaya V. B., Tomskikh O. G., Pechura E. V., Suzdal'tseva M. A. Patogennyye vidy klostridiy i ikh ustoychivost' k antibiotikam, faktory virulentnosti i genomnye osobennosti [Pathogenic species of clostridia and their antibiotic resistance, virulence factors, and genomic feature]. *Innovacii i proizvod'stvennaya bezopasnost'*, 2023, vol. 3, pp. 39-51. <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2023-41-3-39-51>
2. Glotova T. I., Terent'eva T. E., Glotov A. G. Vozbuditeli i vozrastnaya vospriimchivost' krupnogo rogatogo skota k klostridiozam [Pathogens and age susceptibility of cattle to Clostridiosis]. *Sibirskij vestnik sel'skhozâjstvennoj nauki*, 2017, vol. 47, no. 1, pp 90-96.
3. Danilyuk A. V., Kapustin A. V. Rasprostranennost' i vidovoe raznoobrazie klostridiy – vozbuditeley anaerobnykh infektsiy krupnogo rogatogo skota [The prevalence and species diversity of clostridia, the causative agents of anaerobic infections in cattle]. *Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko*, 2019, vol. 81, pp. 19-26. <https://doi.org/10.30917/ATTPRINT-2019-10>
4. Breslauer K. J., Frank R., Blöcker H., Marky L. A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, vol. 83, no. 11, pp. 3746-3750. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746>
5. Carter G. P., Chakravorty A., Pham Nguyen T. A., Mileto S., Schreiber F., Li L., Howarth P., Clare S., Cunningham B., Sambol S. P., Cheknis A., Figueroa I., Johnson S., Gerding D., Rood J. I., Dougan G., Lawley T. D., Lyras D. Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, system-

- ic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 3, art. e00551. <https://doi.org/10.1128/mBio.00551-15>
6. Chandrasekaran R., Lacy D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS microbiology reviews*, 2017, vol. 41, no 6, pp. 723–750. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>
 7. Compiani R., Grossi S., Lucini L., Sgoifo Rossi C.A. Prevention of the main Clostridial diseases in cattle. *Large Animal Review*, 2021, vol. 27, no. 1, pp. 51–56.
 8. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 2012, vol. 13, art. 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
 9. Cruz-Morales P., Orellana C. A., Moutafis G., Moonen G., Rincon G., Nielsen L. K., Marcellin E. Revisiting the evolution and taxonomy of *Clostridia*, a phylogenomic update. *Genome biology and evolution*, 2019, vol. 11, no. 7, pp. 2035–2044. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz096>
 10. Edwards A. N., Suárez J. M., McBride S. M. Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2013, no. 79, art. e50787. <https://doi.org/10.3791/50787>
 11. Popoff M. R., Brüggemann H. Regulatory networks controlling neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *Toxins*, 2022, vol. 14, no. 6, art. 364. <https://doi.org/10.3390/toxins14060364>
 12. Huang S. W., Chan J. P., Shia W. Y., Shyu C. L., Tung K. C., Wang C. Y. The utilization of a commercial soil nucleic acid extraction kit and PCR for the detection of *Clostridium tetanus* and *Clostridium chauvoei* on farms after flooding in Taiwan. *The Journal of veterinary medical science*, 2013, vol. 75, no. 4, pp. 489–495. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0271>
 13. Lange M., Neubauer H., Seyboldt C. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Molecular and cellular probes*, 2010, vol. 24, no. 4, pp. 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.03.003>
 14. Mehdizadeh Gohari I., Unterer S., Whitehead A. E., Prescott J. F. NetF-producing *Clostridium perfringens* and its associated diseases in dogs and foals. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2020, vol. 32, no. 2, pp. 230–238. <https://doi.org/10.1177/1040638720904714>
 15. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

16. Popoff M. R., Brüggemann H. Regulatory networks controlling neurotoxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* // *Toxins*, 2022, vol. 14, no. 6, art. 364. <https://doi.org/10.3390/toxins14060364>
17. Rood J. I., Adams V., Lacey J., Lyras D., McClane B. A., Melville S. B., Moore R. J., Popoff M. R., Sarker M. R., Songer J. G., Uzal F. A., Van Immerseel F. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, 2018, vol. 53, pp. 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
18. Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 2007, vol. 35(Web Server issue), pp. W71-W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
19. Uzal F. A., Freedman J. C., Shrestha A., Theoret J. R., Garcia J., Awad M. M., Adams V., Moore R. J., Rood J. I., McClane B. A. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future microbiology*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 361–377. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.168>
20. Uzal F. A., Navarro M. A., Asin J., Henderson E. E. Clostridial diseases of horses: a review. *Vaccines*, 2022, vol. 10, no. 2, art. 318. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020318>
21. Weese J. S. *Clostridium* (Clostridioides) *difficile* in animals. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2020, vol. 32, no. 2, pp. 213–221. <https://doi.org/10.1177/1040638719899081>
22. Zaragoza N. E., Orellana C. A., Moonen G. A., Moutafis G., Marcellin E. Vaccine production to protect animals against pathogenic *Clostridia*. *Toxins*, 2019, vol. 11, no. 9, art. 525. <https://doi.org/10.3390/toxins11090525>

ВКЛАД АВТОРОВ

Безбородова Н.А.: разработка концепции научной работы, составление черновика рукописи, постановка ПЦР, статистическая обработка данных.

Мартынов Н.А.: постановка ПЦР, сбор и анализ данных.

Шилова Е.Н.: редактирование черновика рукописи.

Зубарева В.Д.: редактирование черновика рукописи, написание рукописи.

Кожуховская В.В.: выделение ДНК, постановка ПЦР.

Соколова О.В.: редактирование черновика рукописи.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Natalia A. Bezborodova: study conception and design, drafting of the manuscript, performing PCR, statistical data analysis.

Nikolai A. Martynov: performing PCR, data collection and analysis.

Evgenia N. Shilova: editing of the draft of the manuscript.

Vladlena D. Zubareva: editing of the draft of the manuscript, writing of the manuscript.

Veronika V. Kozhukhovskaya: DNA extraction and performing PCR.

Olga V. Sokolova: editing of the draft of the manuscript.

ДАнные ОБ АВТОРАХ

Безбородова Наталья Александровна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник

ФГБНУ Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН

ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Российская Федерация

n-bezborodova@mail.ru

Мартынов Николай Александрович, студент, лаборант

ФГБНУ Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН

ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Российская Федерация

martynov_kolya98@mail.ru

Шилова Евгения Николаевна, доктор ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник

ФГБНУ Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН

ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Российская Федерация

adelaida.gurgenovna@mail.ru

Зубарева Владлена Дмитриевна, аспирант, старший специалист

ФГБНУ Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН

ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Российская Федерация

zzub97@mail.ru

Кожуховская Вероника Валентиновна, младший научный сотрудник

ФГБНУ Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН

*ул. Белинского 112а, г. Екатеринбург, 620142, Российская Федерация
tetramegon@yandex.ru*

Соколова Ольга Васильевна, доктор ветеринарных наук, руководитель
Уральского НИВИ – структурного подразделения ФГБНУ УрФА-
НИЦ УрО РАН
*ФГБНУ Уральский федеральный аграрный научно-исследователь-
ский центр УрО РАН
ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Российская Федерация
наука_sokolova@mail.ru*

DATA ABOUT THE AUTHORS

Natalia A. Bezborodova, Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher
*FSBSI Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, UrB of RAS
112a, Belinski Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation
n-bezborodova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>
SPIN-code: 7012-0999
Scopus Author ID: 57210813542*

Nikolai A. Martynov, Student, Laboratory Assistant
*FSBSI Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, UrB of RAS
112a, Belinski Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation
martynov_kolya98@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9251-0056>
SPIN-code: 7332-1403
Scopus Author ID: 57671574200*

Evgenia N. Shilova, Doctor of Veterinary Sciences, Leading Researcher
*FSBSI Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, UrB of RAS
112a, Belinski Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation
adelaida.gurgenovna@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9506-6883>
SPIN-code: 5142-2256
Scopus Author ID: 57221335358*

Vladlena D. Zubareva, Postgraduate, Senior Specialist
*FSBSI Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, UrB of RAS
112a, Belinski Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation*

zzub97@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0284-0276>

SPIN-code: 6040-0488

Scopus Author ID: 57719695400

Veronika V. Kozhukhovskaya, Junior Researcher

FSBSI Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, UrB of RAS

112a, Belinski Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation

tetramegon@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7924-6844>

SPIN-code: 1458-2375

Scopus Author ID: 57218577277

Olga V. Sokolova, Doctor of Veterinary Sciences, Head

FSBSI Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, UrB of RAS

112a, Belinski Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation

nauka_sokolova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1169-4090>

SPIN-code: 7437-2300

Scopus Author ID: 57218576755

Поступила 05.03.2024

После рецензирования 11.04.2024

Принята 20.04.2024

Received 05.03.2024

Revised 11.04.2024

Accepted 20.04.2024