

УДК 619:616-076:619:579.852.13:636.22/.28

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент  
Дубаневич О.В., старший научный сотрудник  
Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент  
Щемелева Н.Ю., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск, Республика Беларусь

## ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР

### Резюме

ПЦР – это инструмент молекулярной диагностики, важный дополнительный метод, который существенно повышает точность и скорость диагностики инфекционных заболеваний. Выявление генетического материала *Clostridium perfringens* методом ПЦР свидетельствует о потенциальной возможности наличия патогенных типов *C. perfringens*. Генетический материал *Clostridium perfringens* выявлен в различных образцах: посмертно – во внутренних органах (42 %, n=274), прижизненно – в фекалиях (39 %, n=120) и сыворотке крови (12 %, n=184). Диагноз должен устанавливаться комплексно с учетом эпизоотологических данных, анамнеза, клинической картины, патологоанатомических изменений, результатов ПЦР-диагностики, типирования, определения патогенности.

**Ключевые слова:** ПЦР, *Clostridium perfringens*, крупный рогатый скот, бактериальная инфекция.

### Summary

PCR is a powerful tool for molecular diagnostics, it is an important additional method that significantly improves the accuracy and speed of diagnostics of infectious diseases. Detection of the *Clostridium perfringens* genome by PCR indicates the presence of dysbacteriosis and the potential for the development of an infectious process. The diagnosis of anaerobic enterotoxemia should be established comprehensively taking into account epidemiological data, anamnesis, clinical picture, results of microbiological research, results of PCR diagnostics (determine the toxinotypes of *Clostridium perfringens* taking into account the main toxins produced), results of pathological examination.

**Keywords:** PCR, *Clostridium perfringens*, cattle, bacterial infection.

Поступила в редакцию 15.11.2024 г.

### ВВЕДЕНИЕ

*Clostridium perfringens* типа А (альфа-токсин) являются условно-патогенными микроорганизмами, которые могут присутствовать в кишечнике жвачных животных, в том числе крупного рогатого скота (КРС) в небольших количествах, не вызывая заболевания, но при определенных условиях, когда нарушается нормальный баланс между полезной и патогенной микрофлорой кишечника на фоне основного заболевания, способны вызвать развитие инфекционного процесса [1, 2].

Условия, способствующие развитию инфекции [3, 4].

- дисбактериоз на фоне изменения рациона, стресса, других заболеваний, лечения антибиотиками может привести к дисбалансу микрофлоры кишечника и дать преимущество *Clostridium perfringens*. Усиленное размножение данного микроорганизма приводит к активной продукции токсинов и развитию интоксикации организма;

- повреждение кишечного барьера: любое повреждение слизистой оболочки кишечника (например паразитарные инвазии, воспалительные процессы, тепловой стресс) повышает вероятность развития инфекции;

- избыточная концентрация углеводов в рационе может стимулировать рост *C. perfringens*.

Анаэробная энтеротоксемия (некротический энтерит) вызывается, как правило, типами В, С, D. Тип А при нормальном состоянии организма животного не провоцирует инфекционный процесс [5].

Диагноз должен устанавливаться комплексно. При выявлении в ПЦР генетического материала *Clostridium perfringens* для постановки окончательного диагноза необходимо провести типизацию (таблицы 1, 2), определить патогенность. При постановке диагноза надо учитывать эпизоотологические данные, анамнез, клиническую картину (симптомы, вызванные типом А,

могут быть невыраженными), результаты бактериологических исследований (выделение *Clostridium perfringens* из биологического материала, биопроба на лабораторных животных), патологоанатомического исследования, ПЦР-диагностики, дифференциальной диагностики [6].

ПЦР подтверждает наличие только ДНК *C. perfringens*, что является свидетельством потенциальной возможности наличия патогенных типов *C. perfringens*. На это указывают и проведенные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» исследования, в ходе которых из 53 образцов патологического материала от молодняка КРС было выделено 11 изолятов *Clostridium perfrin-*

*gens*, и все они были идентифицированы как тип А [7].

Интерпретация результатов ПЦР должна проводиться ветеринарным специалистом с учетом анализа результатов вышеперечисленных методов исследований.

Наличие специфического токсина и установление его типа позволяют поставить окончательный диагноз на инфекционную энтеротоксемию. Окончательный диагноз считается установленным при выделении чистой культуры *C. perfringens*, продуцирующей токсин, установлении ее типа и патогенности, а также при обнаружении токсина в фильтрате содержимого тонкого кишечника и установлении его типа.

Таблица 1 – Определение типа основного токсина *Clostridium perfringens* [6]

Тип <i>C. perfringens</i>	Основной токсин	Антитоксическая сыворотка типов				Контроль
		А	С	Д	Е	
А	альфа	–	Х	Х	Х	+
В, С	бета	+	–		+	+
Д	эпсилон	+	+	–	–	+
Е	йота	+	+	+	–	+

Примечание – «+» – белые мыши пали, у кроликов или свинок некроз на месте введения; «–» – мыши живы, у кроликов или свинок некроза нет; «Х» – результат не учитывается

Таблица 2 – Деление микроорганизмов *Clostridium perfringens* на токсинотипы с учетом основных продуцируемых токсинов [6]

Тип <i>C. perfringens</i>	Альфа	Бета	Эпсилон	Йота	Энтеротоксин	Бета-2
А	++	–	–	–	+	++
В	+	++	+	–	+	–
С	+	++	–	–	+	++
Д	+	–	++	–	+	–
Е	+	–	–	++	+	–
F	+	–	–	–	–	–

Инфекционную энтеротоксемию телят необходимо дифференцировать от эшерихиоза, сальмонеллеза, диплококковой инфекции и вирусной диареи, диспепсии, а у взрослых животных – также от сибирской язвы, эмфизематозного карбункула, пастереллеза и отравлений, а у овец – от браздота, некротического гепатита, сибирской язвы, пастереллеза, листериоза, отравлений [6].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выявление генетического материала *Clostridium perfringens* проводили методом ПЦР. Материалом для исследования явля-

лись сыворотка крови КРС, фекалии, слизь, кусочки органов и тканей от павших животных. Лабораторная работа выполнена на базе отдела молекулярно-генетической диагностики и геной инженерии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Выделение ДНК/РНК проводили российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» согласно инструкции по его применению. Молекулярно-генетические исследования по выявлению генома *Clostridium perfringens* осуществляли методом ПЦР согласно Методическим указаниям по проведению обязательного минимума исследований в вете-

ринарных лабораториях при диагностике болезней животных (утверждены ГУВ МСХиП РБ 16.01.2008 г., № 10-1-5/34), Методическим указаниям по постановке полимеразной цепной реакции в ветеринарных диагностических лабораториях (утверждены ГУВ МСХиП РБ 03.03.2008 г., № 10-1-5/127), инструкции по применению набора для выделения ДНК/РНК «АмплиПрайм РИБО-сорб», инструкции по применению тест-систем для детекции генома *Clostridium perfringens* КРС в поли-

меразной цепной реакции производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

За 2024 г. материал для исследования был отобран от КРС из 137 животноводческих хозяйств всех областей Республики Беларусь (таблица 3). Отдельные исследования проводились с типированием альфа-токсина в рамках научных исследований методом ПЦР.

Таблица 3 – Мониторинг хозяйств, в которых проводились ПЦР-исследования для выявления в биологическом материале генетического материала *Clostridium perfringens*

Области, в которых проводились исследования	Количество исследованных районов	Количество хозяйств, в которых проводились исследования
Брестская	5	8
Витебская	2	3
Гродненская	9	19
Гомельская	5	6
Минская	21	101
Итого	42	137

Установлено, что из 137 исследованных сельскохозяйственных предприятий генетический материал *Clostridium perfringens* был обнаружен в 55 хозяйствах (40 %).

Результаты ПЦР по выявлению генетического материала *Clostridium perfringens* в биологическом материале от крупного рогатого скота отражены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Выявление *Clostridium perfringens* в биологическом материале от крупного рогатого скота методом ПЦР

Области	Количество исследованных проб биологического материала		
	положительных	отрицательных	всего
Брестская	60	16	76
Витебская	13	4	17
Гродненская	79	28	107
Гомельская	5	10	15
Минская	172	272	444
Итого	329	330	659

Таблица 5 – Результаты ПЦР по выявлению генетического материала *Clostridium perfringens* в биологических пробах от телят и коров

Возрастная группа	Количество исследованных проб биологического материала		
	положительных	отрицательных	всего
Коровы	63 (21 %)	240	303
Телята	109 (44 %)	139	248
Итого	172	379	551

При этом в 42 % случаев генетический материал *Clostridium perfringens* выявляли из внутренних органов, в 39 % случаев – из фекалий. В сыворотке крови ге-

ном *Clostridium perfringens* обнаружен только в 12 % случаев (рисунок), в другом биологическом материале (смешанные объединенные пробы) – в 7 % случаев.



Рисунок – Результаты ПЦР по выявлению генетического материала *Clostridium perfringens* прижизненно – в сыворотке (n=184), носовой слизи и фекалиях (n=120) и посмертно – из внутренних органов (n=274)

Несмотря на то, что этиологическая значимость выявления генетического материала *Clostridium perfringens* в сыворотке крови выше, так как это свидетельствует о бактериемии, однако это может быть и результатом транслокации микроорганизмов, когда непатогенные, условно-патогенные и др. микроорганизмы могут попадать в кровеносное русло в результате повреждения кишечного барьера слизистой оболочки кишечника, вызванного паразитарными инвазиями, воспалительными и др. процессами.

Скрининг биологических проб проводился по нескольким инфекциям КРС: вирусная диарея, рота- и коронавирусная инфекция, парагрипп-3, респираторно-синцитиальная инфекция, аденовирусная инфекция, микоплазмоз, пастереллез, мангеймиоз, сальмонеллез, псевдомоноз, лептоспироз, туберкулез, бруцеллез, хламидиоз.

В 55 хозяйствах из биологических проб выявлен генетический материал *Clostridium perfringens*, из них в 38 хозяйствах – в ассоциациях с другими бактериями и вирусами. Например, в ассоциации с вирусом вирусной диареи КРС генетический материал *Clostridium perfringens* выявлен в 14 случаях, *Pasteurella multocida* – в 11, *Mannheimia haemolytica* – в 11, *Mycoplasma species* – в 29. Это свидетельствует о том, что *Clostridium perfringens* не является первопричиной заболеваний и падежа.

Из 15 хозяйств на исследования было предоставлено только по одной пробе, из них 9 хозяйств исключали только клостридиоз. Такой подход не является ин-

формативным, а отсутствие скрининга на другие инфекции не позволяет сделать заключение, что клостридия выступает в роли главного этиологического фактора.

Только в 2 хозяйствах генетический материал *Clostridium perfringens* был выявлен как моноинфекция на фоне скрининга других инфекций КРС при одновременном исследовании 4 и 6 проб.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПЦР является инструментом молекулярной диагностики. Это важный метод, который существенно улучшает точность и скорость диагностики инфекционных заболеваний.

Особенностью при диагностике клостридиозов является то, что выявления генетического материала *Clostridium perfringens* методом ПЦР без типизации токсинов, маркеров патогенности, недостаточно для постановки заключительного диагноза, это лишь свидетельствует о возможности наличия патогенных типов *Clostridium perfringens*.

Интерпретация результатов ПЦР должна проводиться ветеринарным специалистом с учетом результатов других методов исследований.

Заключительный диагноз должен устанавливаться комплексно, с учетом эпизоотологических данных, анамнеза, клинической картины, результатов дифференциальной диагностики, микробиологического исследования, ПЦР-диагностики (определение токсинотипов *Clostridium perfringens* с учетом основных продуциру-



емых токсинов), патологоанатомического исследования, бактериологических исследований (выделение *Clostridium perfringens* из биологического материала, биопроба на лабораторных животных).

Установлена значительная распространенность *Clostridium perfringens* среди КРС, подтвержденная выявлением генетического материала в различных биоматериалах (42 % – посмертно в органах, 39 % – прижизненно в фекалиях, 12 % – в сыворотке крови).

Мы согласны с выводом ученых из России и Италии, утверждающих, что «так как *Clostridium perfringens* часто выделяют у клинически здоровых животных, сам факт изоляции этих микроорганизмов имеет небольшое диагностическое значение. Необходимо молекулярное генотипирование/типирование токсинов, что позволит поставить окончательный диагноз и оценить в полной мере эпидемиологическое значение этих результатов, в особенности в пробах от здоровых животных» [8].

Дальнейшие исследования должны быть направлены на несколько ключевых аспектов:

1. Идентификация типов *C. perfringens*. Полученные данные о распростра-

ности относятся к типу А. Однако другие типы (В, С, D, Е, F, G) обладают значительно большей патогенностью и вызывают специфические заболевания. Необходимо определить распространенность других типов *Clostridium perfringens* среди КРС на территории Республики Беларусь.

2. Продолжение изучения ассоциаций с другими инфекциями. Высокая частота выявления ДНК *Clostridium perfringens* в ассоциациях свидетельствует о сочетании инфицировании, при котором *C. perfringens* усугубляет течение заболевания, вызванного другими возбудителями. Необходимо провести дальнейшие исследования, направленные на выявление ассоциаций *C. perfringens* с другими бактериальными и вирусными инфекциями, распространенными у КРС.

3. Определение уровня патогенности штаммов. Не все штаммы *Clostridium perfringens* одинаково патогенны. Необходимо исследовать выраженность продукции токсинов (альфа-токсина и других), а также наличие генов патогенности у выявленных штаммов разных типов. Это позволит оценить их потенциальный вклад в патогенез заболевания.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Current notions about etiopathogenic and genetics specific features of *Clostridium perfringens* toxins. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology* / Yu. V. Lobzin, A. S. Kvetnaya, N. V. Skripchenko, L. I. Zhelezova // *Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. – 2021. – Vol. 98 (1). – P. 91–103.
2. Пулипенко, И. В. *Clostridium perfringens*: характеристика, биологическое действие, индикация в пищевых продуктах / И. В. Пулипенко // *Технологический аудит и резервы производства*. – 2015. – Т. 2, № 4 (22). – С. 4–8. – DOI 10.15587/2312-8372.2015.39107.
3. Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease / K. Brown, D. DeCoffe, E. Molcan, D. L. Gibson // *Nutrients*. – 2012. – 4 (8). – P. 1095–1119. doi:10.3390/nu4081095.
4. Effects of High Carbohydrate Diet-Modulated Microbiota on Gut Health in Chinese Perch / Y. Zhang, X.-F. Liang, S. He [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – 11. doi:10.3389/fmicb.2020.575102.
5. *Clostridium perfringens* strains from bovine enterotoxemia cases are not superior in in vitro production of alpha toxin, perfringolysin O and proteolytic enzymes / E. Goossens, S. Verherstraeten, L. Timmermont [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2014. – 10 (1). – P. 32. doi:10.1186/1746-6148-10-32.
6. Терехов В. И. Инфекционные болезни животных. Клостридиозы и другие анаэробные инфекции : учеб. пособие для СПО / В. И. Терехов, А. С. Тищенко. – 2-е изд. – СПб. : Лань, 2021. – 220 с.
7. Изучение биологических свойств эпизоотических изолятов *Clostridium perfringens*, выделенных от крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Республики Беларусь / О. Н. Новикова, М. А. Ананчиков, М. М. Мистейко, Е. Л. Красникова // *Экология и животный мир*. – 2023. – № 1. – С. 59–62.
8. Оссипранди, М. К. Молекулярное ПЦР-типирование токсинов изолятов *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile*, полученных от крупного рогатого скота / М. К. Оссипранди, Л. Зербини, Е. Болдырева // *Российский ветеринарный журнал*. – 2013. – № 3. – С. 20–23.