

DOI: 10.12731/2658-6649-2025-17-2-1178

EDN: PCSOZR

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



Научная статья

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ПРИ ПОМОЩИ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

*А.В. Нефедченко, Т.Е. Судоргина, Т.И. Глотова,
С.В. Котенева, А.Г. Глотов*

Аннотация

Обоснование. Болезни, вызываемые клостридиями, широко распространены у крупного рогатого скота. В организме животных помимо патогенных клостридий, постоянно обитают непатогенные виды и для постановки правильного диагноза необходимо дифференцировать выделенные культуры этих бактерий. Перспективным направлением для решения этой задачи является поиск высоко специфичных и чувствительных методов генетического анализа. Основанных на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, которые дают возможность в короткие сроки выявлять и определять видовую принадлежность микроорганизмов.

Цель. Разработать мультиплексную полимеразную цепную реакцию в реальном времени, позволяющую выявлять токсигенные виды клостридий: *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens* и *Clostridium sordellii* в смешанных и чистых бактериальных культурах, определить ее чувствительность и специфичность.

Материалы и методы. В своих исследованиях использовали пробы биологического материала от больных животных, из которых выделяли культуры клостридий на искусственных питательных средах с последующей их идентификацией по результатам изучения культуральных и биохимических свойств. Праймеры и зонды разрабатывали с использованием инструмента PrimerQuest, затем определяли чувствительность и специфичность ПЦР с использованием референтных штаммов и изолятов бактерий.

Результаты. В период с 2023 г. по 2024 г. исследовали 90 проб биоматериала от крупного рогатого скота, отобранных в животноводческих хозяйствах Новосибирской области. В результате бактериологических исследований было получено

44 изолята клостридий девяти видов рода *Clostridium*. Для осуществления подбора праймеров и зондов провели анализ, в результате которого выбрали три пары праймеров и зондов, которые использовали для обнаружения у *C. sporogenes* гена **gerKA**, *C. perfringens* – **plc**, *C. sordelli* – **NanS**. Кроме того в работе использовали пару праймеров для выявления видов рода *Clostridium* по гену 16S РНК. С целью определения рабочих концентраций праймеров и зондов, обеспечивающих необходимую чувствительность анализа, была проведена серия исследований, которые позволили оптимизировать условия его проведения. Анализируя результаты исследований, определили чувствительность реакции, которая составила для чистых культур бактерий видов *C. sporogenes*, *C. perfringens* и *C. sordelli* не менее 10^2 КОЕ/мл, а для других видов *Clostridia spp.* 10^1 КОЕ/мл.

Заключение. Разработанная мультиплексная ПЦР в реальном времени позволяет в короткие сроки проводить диагностику клостридиозов крупного рогатого скота и видовую идентификацию возбудителей. В этиологии клостридиозов крупного рогатого скота помимо *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. sordelli* могут принимать участие и другие виды *Clostridium spp.* Необходимо совершенствовать методы диагностики клостридиозов и расширять спектр выявляемых видов клостридий.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; клостридии; изолят; полимеразная цепная реакция

Для цитирования. Нефедченко, А. В., Судоргина, Т. Е., Глотова, Т. И., Котенева, С. В., & Глотов, А. Г. (2025). Видовая идентификация бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота, при помощи мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 17(2), 315-333. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1178>

Original article

SPECIES IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE GENUS CLOSTRIDIUM, ISOLATED FROM CATTLE, BY MULTIPLEX REAL-TIME PCR

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

Abstract

Background. Diseases caused by clostridia are widespread in cattle. In addition to pathogenic clostridia, non-pathogenic species are constantly living in the organism

of animals, and to make a correct diagnosis it is necessary to differentiate isolated cultures of these bacteria. A promising direction for solving this problem is the search for highly specific and sensitive methods of genetic analysis. Based on the application of real-time polymerase chain reaction (PCR), which makes it possible to detect and determine the species affiliation of microorganisms in a short period of time.

Purpose. To develop a multiplex real-time polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Clostridium* species: *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens* and *Clostridium sordellii* in mixed and pure bacterial cultures, to determine its sensitivity and specificity.

Materials and methods. In our studies we used samples of biological material from sick animals, from which clostridia cultures were isolated on artificial nutrient media with their subsequent identification based on the results of culture and biochemical properties. Primers and probes were designed using the PrimerQuest tool, and then the sensitivity and specificity of PCR were determined using reference strains and bacterial isolates.

Results. In the period from 2023 to 2024, 90 samples of biomaterial from cattle collected in livestock farms of the Novosibirsk Region were investigated. As a result of bacteriological studies, 44 isolates of clostridia of nine species of the genus *Clostridium* were obtained. For the selection of primers and probes, we analysed three pairs of primers and probes, which were used to detect the gerKA gene in *C. sporogenes*, *C. perfringens* - plc, *C. sordelli* - NanS. In addition, a pair of primers was used to detect species of the genus *Clostridium* by the 16S RNA gene. In order to determine the working concentrations of primers and probes that would provide the necessary sensitivity of the analysis, a series of studies were carried out to optimise the conditions of the analysis. Analysing the results of the studies, we determined the sensitivity of the reaction, which was not less than 102 CFU/ml for pure bacterial cultures of *C. sporogenes*, *C. perfringens* and *C. sordelli* species, and for other species of *Clostridium* spp. 101 CFU/ml.

Conclusion. The developed multiplex real-time PCR allows short-term diagnosis of bovine clostridiosis and species identification of pathogens. In addition to *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. sordellii*, other species of *Clostridium* spp. may be involved in the etiology of bovine clostridiosis. It is necessary to improve diagnostic methods of clostridiosis and expand the range of detectable clostridium species.

Keywords: cattle; clostridia; isolate; polymerase chain reaction

For citation. Nefedchenko, A. V., Sudorgina, T. E., Glotova, T. I., Koteneva, S. V., & Glotov, A. G. (2025). Species identification of bacteria of the genus *Clostridium* isolated from cattle by multiplex real-time PCR. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 17(2), 315-333. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1178>

Введение

Инфекционные болезни крупного рогатого скота широко распространены и являются одной из важных причин экономического ущерба в животноводстве [11]. Патогенными видами клостридий, оказывающими наибольший ущерб животноводству являются: *C. chauvoei* (эмфизематозный карбункул), *C. novyi* (*C. oedematiens*) тип А, *C. septicum*, *C. sordellii* (злокачественный отек), *C. haemolyticum* (*C. novyi* тип D) (бациллярная гемоглобинурия), *C. perfringens* тип А и D (злокачественный отек, газовая гангрена, некротизирующие энтериты, метриты, маститы), *C. septicum*, *C. oedematiens* (*C. novyi*), *C. histolyticum* (злокачественный отек, браздотоподобные инфекции) и *C. difficile* (некротические энтериты, диареи) [3; 7; 8; 10; 19]. Эти бактерии вызывают болезни, которые широко распространены в мире и часто приводят к гибели, снижению скорости роста, привесов и молочной продуктивности животных. Их роль возрастает в связи с интенсификацией молочного животноводства. Установлено, что наиболее восприимчивыми к заболеванию являются высокопродуктивные коровы после первого-второго отелов, а также телята [8; 9].

Установлено, что в разных отделах кишечника животных могут присутствовать десятки видов клостридий. Поэтому, достаточно сложно при вспышке клостридиозов в хозяйстве установить этиологическую структуру заболевания. Кроме того, некоторые клинические формы клостридиозов могут быть вызваны несколькими видами бактерий. Так, в этиологии злокачественного отека могут участвовать одновременно *C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. histolyticum* и другие виды. Заболевания, вызванные несколькими видами бактерий, обычно клинически протекают в более сложных формах, чаще всего в острых и, как правило, заканчиваются летально [5; 6].

Известно, что *C. perfringens* – патоген, наиболее распространенный среди крупного рогатого скота. Эту бактерию могут выделять из содержимого кишечника здоровых животных [11], но при определенных условиях, она способна вызывать энтерит и абомазит у КРС [12; 14]. *C. sordellii* – причина синдрома внезапной гибели овец всех возрастов, острого абомазита телят и ягнят, геморрагического энтерита, гангренозных поражений органов репродуктивного тракта новотельных коров. Она часто присутствует в ранах вместе с анаэробными и аэробными бактериями других видов [18]. *C. sporogenes* – близкий родственник *C. botulinum*, широко распространенная патогенная бактерия, часто выделяемая от здоровых людей и животных, но также способная вызывать в редких случаях сепсис [14].

Определение распространения и частоты клинических форм клостридиозов у крупного рогатого скота является актуальным в настоящее время в связи интенсификацией животноводства. В этой связи большое значение имеет идентификация и определение токсигенности возбудителей. Традиционно основным методом видовой идентификации выделенных культур клостридий является определение их фенотипических свойств [15; 16] и определение их токсигенных свойств в биологической пробе на лабораторных животных или культурах клеток [2; 4].

Молекулярно-генетические методы предлагают широкий спектр для изучения клостридий. К ним относятся: секвенирование маркерных генов, 16SrRNA, полногеномный анализ бактерии и изучение специфических участков ДНК, поиск мутаций, связанных с антибиотик устойчивостью, филогенетический анализ микроорганизмов [17], выявление генов токсинов [2, 22].

Безусловно, перспективным направлением является разработка высокочувствительных и специфичных методов выявления бактерий *Clostridium spp.* с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. Она позволит в короткие сроки выявлять и идентифицировать клостридии [20-23].

Целью исследования являлась разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени для выявления клостридий: *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens* и *Clostridium sordellii* в смешанных и чистых бактериальных культурах и определение ее специфичности и чувствительности.

Материалы и методы

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии-диагностический центр СФНЦА РАН в период с 2023 г. по 2024 г. с использованием проб биоматериала, которые отбирали не позднее 3-5 часов с момента гибели или вынужденного уоя животных, для лечения которых не использовали антибиотики, а также культур бактерий, полученных в ходе наших исследований.

Комплексные бактериологические исследования. Бактериологические исследования проб биоматериала от животных проводили в соответствии ГОСТу 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. Методы выделения клостридий не будут полностью отражены в рамках данной статьи, а лишь обозначено, что они были выделены на

агаре Шедлера и тиогликолевой среде, при инкубировании в термостате при 37 °С в анаэробных условиях в течение 48-72 часов.

Референтные штаммы для оценки чувствительности и специфичности ПЦР

В качестве положительных контролей применяли вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота: Ван Шот Ультра 8 (Zoetis, США, содержащая штаммы *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens* типов С и D, *C. haemolyticum*) и Клоствовак-8 (Ветбиохим, Россия, содержащая штаммы *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* тип В, *Cl. perfringens* типов А, С D, *C. tetani*). Использовали также культуры бактерий, имеющиеся в нашем распоряжении: *C. sordellii* (Т2308), *C. perfringens* (Т2304) и *C. sporogenes* (К2301), 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».

Выделение ДНК

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

Конструирование праймеров и зондов

Специфические прямые и обратные праймеры и зонды, нацеленные на консервативные фрагменты геномов клостридий, 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>).

Таким образом, были подобраны род специфичные праймеры и зонды, которые использовали для постановки ПЦР в реальном времени с целью выявления токсигенных для крупного рогатого скота видов рода *Clostridium* по гену 16S РНК, а также для выявления клостридий трех

видов: *C. sporogenes*, *C. perfringens* и *C. sordellii* по генам токсигенности. Праймеры и зонды представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Структура праймеров и зондов для выявления бактерий *Clostridium spp.* и трех видов: *C. sporogenes*, *C. perfringens* и *C. sordellii*

Бактерия	Названия праймеров и зондов	Последовательность (5' → 3')	Ген мишень	Размер ампликона (п.н.)
<i>Clostridium spp.</i>	ClospF	CGGTGAAATGCGTAGATATTAGG	16S PHK	273
	ClospR	GAATTA AACACATGCTCCGCT		
	ClospZ	5(Cy5) -TAGATACCCTGGTAGTCCACGC- CG-3(BHQ2)		
<i>C. perfringens</i>	ClperfF	5- GCTAGATATGAATGGCAAAGAGG -3	plc	115
	ClperfR	5- CGGCAGTAACATTAGCAGGA -3		
	ClperfZ	5(FAM)- AGCTACATTCTATCTTGAGAGGGCTATGCA -3(BHQ1)		
<i>C. sporogenes</i>	ClsporF	5- CAGTGTGGTGGGTATTAT -3	gerKA	96
	ClsporR	5- GCCACTGTAGAAACCTACT -3		
	ClsporZ	5(HEX)- TAGGTGATGCAGCCATAAGGG- CAA -3(BHQ1)		
<i>C. sordellii</i>	ClsordF	5- TCAGACTTTGGCAGATGGTACTATG -3	NanS	119
	ClsordR	5- AGTCCCATGTTTGTCCATTATCAGT -3		
	ClsordZ	5(ROX)- TGGAGCAGMRGATCATGCATA- CAT -3(BHQ2)		

Постановка ПЦР

Реакцию проводили на приборе CFX96(BioRad, США) с использованием набора реактивов БиоМастер ПЦР РВ(2X) (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 °С – 5 мин - 1 цикл; 95 °С – 15 сек., 60°С – 60 сек. - 45 циклов. Измерение флуоресценции осуществляли при температуре 60°С на всех 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 и их обсуждение

Специфичность ПЦР в реальном времени определяли с использованием панели контрольных образцов. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты определения специфичности разработанной ПЦР

Контрольный образец	Результат исследования (значение Ct)			
	<i>C. perfringens</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>Clostridium spp</i>
<i>C. perfringens</i> (изолят Т2304)	16,28	-	-	15,11
<i>C. sporogenes</i> (изолят К2301)	-	15,37	-	14,17
<i>C. sordellii</i> (изолят Т2308)	-	-	13,35	12,03
<i>C. perfringens</i> (ATCC 13124)	18,03	-	-	17,22
<i>C. sporogenes</i> (ATCC 19404)	-	19,25	-	18,13
<i>C.sordellii</i> (AM370)	-	-	17,10	16,18
Ван шот ультра 8	24,54	-	30,30	20, 18
Клостбовак-8	27,2	-	-	25,13
<i>S.typhimurium</i> (ATCC 14028)	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i> (ATCC 6380)	-	-	-	-
<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	-	-	-	-

Примечание: «16, 28» - значение порогового цикла (Ct) положительного образца; «-» - отрицательная реакция

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

Особенно важно было определить специфичность праймеров и зондов для выявления *Clostridium spp.* Батаева Д.С. с соавт. [1] сообщили, что разработанная ими реал-тайм ПЦР на основе алкилирующего красителя для выявления *Clostridium spp.* с род специфическими праймерами на ген 16S РНК давала положительную реакцию с культурами *E. coli*, *B. cereus*, *P. vulgaris* и *S. typhimurium*. Поэтому мы провели исследования разработанной ПЦР на специфичность с референтными штаммами этих бактерий и получили отрицательные результаты. Таким образом, разработанная мультиплексная ПЦР в реальном времени является специфичной и выявляет только искомые мишени.

Для определения диагностической чувствительности использовали суспензии суточных культур *C. sporogenes*, *C. perfringens* и *C. sordellii* с определенной в них концентрацией бактерий. Из суспензий выделили

ДНК и готовили ряд последовательных 10-кратных разведений, которые исследовали в ПЦР. Эффективность амплификации оценивали в трех повторях. Расчет эффективности реакции, коэффициента детерминации и коэффициента вариации проводили автоматически с использованием программного обеспечения амплификатора CFX96 (таблица 3, рисунок 1).

Таблица 3.

Показатели эффективности амплификации анализируемых образцов

Анализируемый образец	Эффективность реакции (E)	Коэффициент детерминации (R ²)	Минимально кол-во выявляемое в реакции (КОЕ/мл)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>C. perfringens</i>	105,2	0,995	10 ³	1,48
<i>C. sporogenes</i>	97,95	0,998	10 ³	1,91
<i>C. sordellii</i>	103,89	0,993	10 ²	1,71
<i>Clostridium spp</i>	86,97	0,986,7	10 ¹	2,71

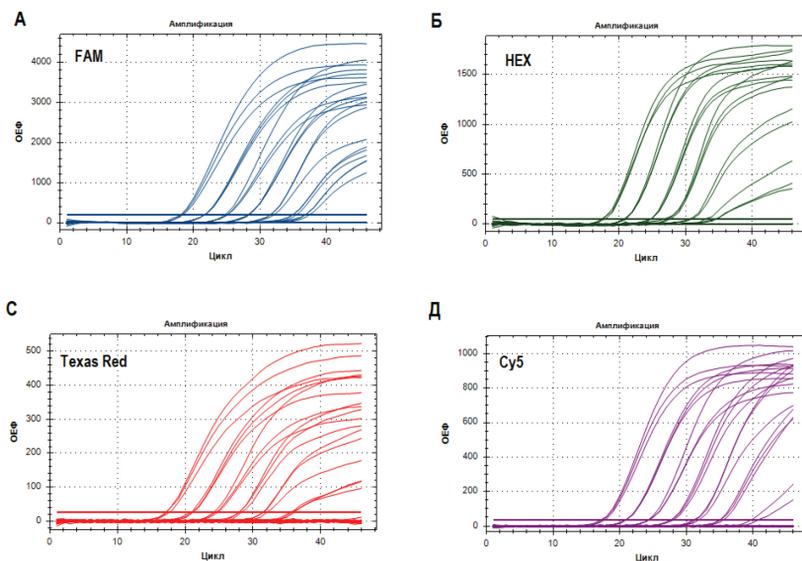


Рис. 1. Результаты амплификации серийных разведений анализируемых образцов в трех повторях – А - *C. perfringens*, Б - *C. sporogenes*, С - *C. sordellii*, Д - *Clostridium spp*.

В результате проведенных исследований установили, что эффективность реакции составила 86,97-105,20, коэффициент вариации при

тестировании минимально выявляемой концентрации клостридий составил 1,48-2,71, а коэффициент детерминированности (r^2) при этом - от 0,986 до 0,998 для разных образцов.

Полученные результаты исследований свидетельствуют о высокой аналитической чувствительности разработанной ПЦР при использовании в мультиплексных условиях для выявления клостридий трех видов.

Последующие исследования были направлены на определение сравнительной эффективности ПЦР при выявлении клостридий непосредственно в пробах биоматериала от животных, бактериальных культурах, а также их анализ с результатами выделения бактерий на искусственных питательных средах и идентификации по результатам изучения биохимических свойств.

Таблица 4.

Сравнение эффективности выявления клостридий при помощи ПЦР и бактериологических методов

Метод типирования	Всего исследовано проб	Результаты исследований в ПЦР/%			
		<i>Clostridium spp.</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sordellii</i>
Органы животных (ПЦР)	90	47/52,2	14/15,5	13/14,4	10/11,1
Бактериальные культуры (ПЦР)	90	65/72,2	34/37,8	27/30,0	21/23,3
Идентифицированные культуры клостридий	44	44/100,0	13/29,5	14/31,8	10/22,7

С помощью бактериологического метода из 90 исследованных проб биоматериала от больных животных было выделено и типировано 44 изолята клостридий, из которых 13 принадлежали к *C. perfringens*, 14 – *C. sporogenes*, 10 – *C. sordellii*. Все выделенные изоляты оказались положительными в тесте на *Clostridium spp.* При этом 9 из них отнесены к видам *C. histolyticum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. oedematiens*, что подтверждено секвенированием по 16S рРНК.

При помощи ПЦР в бактериальных культурах чаще всего выявляли *C. perfringens* (37,8%), *C. sporogenes* (30,0%) и реже *C. sordellii* (23,3%). В бактериальных культурах чаще всего выявляли ассоциации клостридий, а при исследовании органов – только одного возбудителя.

При этом в тесте на *Clostridium spp.* были положительны 25,2% проб органов животных и 72,2% бактериальных культур, выделенных из этих органов, что выше количества проб, в которых были выявлены три вида

кlostридий. Такое различие, вероятно, связано с присутствием в исследуемых пробах биоматериала других видов кlostридий.

Заключение

Разработана мультиплексная полимеразная цепная реакция в реальном времени, которая позволяет в короткие сроки эффективно проводить диагностику кlostридиозов крупного рогатого скота. Для ее постановки необходимо предварительно проводить бактериологические исследования проб биоматериала. Наши исследования показали, что в этиологии кlostридиозов крупного рогатого скота помимо *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. sordellii* могут принимать участие и другие виды *Clostridium spp.* В связи с этим, необходимо совершенствовать методы диагностики кlostридиозов и расширять спектр выявляемых видов кlostридий.

Информация о спонсорстве. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда по проекту 23-26-00009 «Видовой состав и токсигенные свойства кlostридий у крупного рогатого скота в Западно-Сибирском регионе и разработка тест-системы для их быстрой идентификации».

Sponsorship information. This work was financially supported by the Russian Science Foundation under the project 23-26-00009 “Species composition and toxigenic properties of clostridia in cattle in the West Siberian region and development of a test system for their rapid identification”.

Список литературы

1. Батаева, Д. С., Махова, А. А., Зайко, Е. В., & Сатабаева, Д. М. (2020). Ускоренная диагностика кlostридий в пищевых продуктах с использованием ПЦР в реальном времени. *Все о мясе*, 2, 50-53. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2020-2-50-53>. EDN: <https://elibrary.ru/TRLXAC>
2. Безбородова, Н. А. (2020). Современный подход к проблеме кlostридиозов в животноводстве: отбор проб, лабораторная диагностика, профилактика. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»*, 3(35), 392-402. <https://doi.org/10.36871/vet.san.hyг.ecol.202003016>. EDN: <https://elibrary.ru/JHUVAN>
3. Глотова, Т. И., Судоргина, Т. И., Котенева, С. В., Глотов, А. Г., Велькер, Д. А., & Нефедченко, А. В. (2023). Патогенные виды анаэробных бактерий и их роль в патологии крупного рогатого скота. *Успехи медицинской микологии*, XXV, 14-19. EDN: <https://elibrary.ru/NTPITW>

4. Данилюк, А. В., & Капустин, А. В. (2019). Распространенность и видовое разнообразие клостридий — возбудителей анаэробных инфекций крупного рогатого скота. *Труды всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко*, 81, 19-26. [https://doi.org/10.30917/ATTPRINT-2019-10\(3\)](https://doi.org/10.30917/ATTPRINT-2019-10(3))
5. Колесникова, Ю. Н., Пименов, Н. В., & Капустин, А. В. (2016). Этиология анаэробных инфекций крупного рогатого скота и сравнительная характеристика выделенных штаммов клостридий. *Российский журнал сельскохозяйственных и социально-экономических наук*, 8, 39-48. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-08.07>. EDN: <https://elibrary.ru/WIBLWP>
6. Наумова, Н. Б., Батурина, О. А., Локтева, А. С., Плешакова, В. И., Лешева, Н. А., Лоренгель, Т. И., Золотова, Н. С., Алексева, И. Г., & Кабилов, М. Р. (2023). Влияние декстраналя на бактериобиом кишечника телят. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 15(6), 197-221. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2023-15-6-956>. EDN: <https://elibrary.ru/UVVYIJ>
7. Нефедченко, А. В., Глотов, А. Г., Глотова, Т. И., Судоргина, Т. Е., & Котенева, С. В. (2023). Использование молекулярно-генетических методов для типирования клостридий видов *C. sporogenes*, *C. perfringens* и *C. sordellii*. В *Сборник трудов XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика»* (с. 354-355). Москва. EDN: <https://elibrary.ru/DTRHTW>
8. Судоргина, Т. Е., Глотова, Т. И., Нефедченко, А. В., Котенева, С. В., Велькер, Д. А., & Глотов, А. Г. (2024). Частота выделения бактерий *Clostridium* spp. и их ассоциаций при различных формах клостридиоза крупного рогатого скота. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*, 54(3), 55-62. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-3-6>. EDN: <https://elibrary.ru/ZZVDGV>
9. Судоргина, Т. Е., Глотова, Т. И., Котенева, С. В., Нефедченко, А. В., & Глотов, А. Г. (2023). Современные представления о возбудителях клостридиальной анаэробной инфекции крупного рогатого скота. В *Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной Дню Белорусской науки и 95-летию кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней* (с. 109-111). Витебск. EDN: <https://elibrary.ru/ELNBCW>
10. Судоргина, Т. Е., Глотова, Т. И., Котенева, С. В., Нефедченко, А. В., Велькер, Д. А., & Глотов, А. Г. (2023). Клостридиозы крупного рогатого скота: характеристика основных возбудителей, меры профилактики и борьбы. Часть 1. *Ветеринария*, 5, 3-9. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2023.26.5.03-09>. EDN: <https://elibrary.ru/QLUFXE>

11. Сунцова, О. В., Пар, В. А., Лисак, О. В., Мельцов, И. В., Дорошенко, Е. К., Савинова, Ю. С., Тикуннов, А. Ю., & Козлова, И. В. (2023). Эпизоотическая ситуация в отношении гемопаразитарных заболеваний сельскохозяйственных животных в Иркутской области. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 15(4), 210-235. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2023-15-4-210-235>. EDN: <https://elibrary.ru/RFJMLR>
12. Abreu, C. C., Edwards, E. E., Edwards, J. F., Gibbons, P. M., Leal de Araújo, J., Rech, R. R., & Uzal, F. A. (2017). Blackleg in cattle: A case report of fetal infection and a literature review. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 29(5), 612-621. <https://doi.org/10.1177/1040638717713796>
13. Abusnina, W., Shehata, M., Karem, E., Koc, Z., & Khalil, E. (2019). Clostridium sporogenes bacteremia in an immunocompetent patient. *IDCases*, 15, e00481. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00481>
14. Awad, M. M., Singleton, J., & Lyras, D. (2016). The Sialidase NanS Enhances Non-TcsL Mediated Cytotoxicity of Clostridium sordellii. *Toxins (Basel)*, 8(6), 189. <https://doi.org/10.3390/toxins8060189>
15. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes* (2nd ed.). (2009). New York: Springer-Verlag. pp. 1309-1329. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_2
16. Chean, R., Kotsanas, D., Francis, M. J., Palombo, E. A., Jadhav, S. R., Awad, M. M., Lyras, D., Korman, T. M., & Jenkin, G. A. (2014). 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. *Anaerobe*, 30, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.007>
17. Goossens, E., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P. R., & Van Immerseel, F. (2017). Rethinking the role of alpha toxin in Clostridium perfringens-associated enteric diseases: a review on bovine necrohaemorrhagic enteritis. *Veterinary research*, 48(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0413-x>. EDN: <https://elibrary.ru/KMLWKY>
18. Moore, R. J., & Lacey, J. A. (2019). Genomics of the Pathogenic Clostridia. *Microbiol Spectr*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
19. Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H. R., Duffield, T., Peregrine, A. S., Trotz-Williams, L. A., Arroyo, L. G., Brazier, J. S., & Weese, J. S. (2006). Clostridium difficile PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg. Infect. Dis*, 12(11), 1730-1736. <https://doi.org/10.3201/eid1211.051581>
20. Seise, B., Pollok, S., Seyboldt, C., & Weber, K. (2013). Dry-reagent-based PCR as a novel tool for the rapid detection of Clostridium spp. *J. Med. Microbiol*, 62(Pt 10), 1588-1591. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.060061-0>

21. Silva, R. O. S., Uzal, F. A., Oliveira Jr, C. A., & Lobato, F. C. F. (2016). Clostridial Diseases of Animal. In *John Wiley & Sons, Ltd.* (pp. 243-254). Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781118728291.ch20>
22. Morandi, S., Cremonesi, P., Silvetti, T., Castiglioni, B., & Brasca, M. (2015). Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *Anaerobe*, 34, 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.005>
23. Uzal, A., & Songer, J. G. (2019). Clostridial Diseases (pp. 792-806). <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch51>

References

1. Bataeva, D. S., Makhova, A. A., Zayko, E. V., & Satabaeva, D. M. (2020). Rapid diagnosis of *Clostridium* in food products using real-time PCR. *All About Meat*, 2, 50-53. <https://doi.org/10.21323/2071-2499-2020-2-50-53>. EDN: <https://elibrary.ru/TRLXAC>
2. Bezbordova, N. A. (2020). Modern approach to the problem of clostridiosis in animal husbandry: sampling, laboratory diagnostics, prevention. *Russian Journal "Problems of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology"*, 3(35), 392-402. <https://doi.org/10.36871/vet.san.hyg.ecol.202003016>. EDN: <https://elibrary.ru/JHUVAH>
3. Glotova, T. I., Sudorgina, T. I., Koteneva, S. V., Glotov, A. G., Velker, D. A., & Nefedchenko, A. V. (2023). Pathogenic species of anaerobic bacteria and their role in the pathology of cattle. *Advances in Medical Mycology*, XXV, 14-19. EDN: <https://elibrary.ru/NTPITW>
4. Danilyuk, A. V., & Kapustin, A. V. (2019). Prevalence and species diversity of *Clostridium* — causative agents of anaerobic infections in cattle. *Proceedings of the All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya. R. Kovalenko*, 81, 19-26. [https://doi.org/10.30917/ATT-PRINT-2019-10\(3\)](https://doi.org/10.30917/ATT-PRINT-2019-10(3))
5. Kolesnikova, Yu. N., Pimenov, N. V., & Kapustin, A. V. (2016). Etiology of anaerobic infections in cattle and comparative characteristics of isolated *Clostridium* strains. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 8, 39-48. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-08.07>. EDN: <https://elibrary.ru/WIBLWP>
6. Naumova, N.B., Baturina, O.A., Lokteva, A.S., Pleshakova, V.I., Lesheva, N.A., Lorengel, T.I., Zolotova, N.S., Alekseeva, I.G., & Kabilov, M.R. (2023). Effect of dextranol on calves' intestinal bacteriome. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 15(6), 197-221. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2023-15-6-956>. EDN: <https://elibrary.ru/UVVYIJ>

7. Nefedchenko, A. V., Glotov, A. G., Glotova, T. I., Sudorgina, T. E., & Koteneva, S. V. (2023). Use of molecular genetic methods for typing *Clostridium* species *C. sporogenes*, *C. perfringens* and *C. sordellii*. In *Proceedings of the XI International Scientific and Practical Conference "Molecular Diagnostics"* (pp. 354-355). Moscow. EDN: <https://elibrary.ru/DTRHTW>
8. Sudorgina, T. E., Glotova, T. I., Nefedchenko, A. V., Koteneva, S. V., Velker, D. A., & Glotov, A. G. (2024). Frequency of isolation of *Clostridium* spp. bacteria and their associations in various forms of clostridiosis in cattle. *Siberian Herald of Agricultural Science*, 54(3), 55-62. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-3-6>. EDN: <https://elibrary.ru/ZZVDGV>
9. Sudorgina, T. E., Glotova, T. I., Koteneva, S. V., Nefedchenko, A. V., & Glotov, A. G. (2023). Current views on the causative agents of clostridial anaerobic infection in cattle. In *Actual problems of infectious pathology of animals and ways to solve them: Proceedings of the International Scientific and Practical Conference dedicated to the Day of Belarusian Science and the 95th anniversary of the Department of Epizootology and Infectious Diseases* (pp. 109-111). Vitebsk. EDN: <https://elibrary.ru/ELNBCW>
10. Sudorgina, T. E., Glotova, T. I., Koteneva, S. V., Nefedchenko, A. V., Velker, D. A., & Glotov, A. G. (2023). Clostridiosis in cattle: characterization of the main causative agents, preventive measures and control. Part 1. *Veterinary Medicine*, 5, 3-9. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2023.26.5.03-09>. EDN: <https://elibrary.ru/QLUFXE>
11. Suntsova, O. V., Rar, V. A., Lisak, O. V., Meltsov, I. V., Doroshenko, E. K., Savinova, Yu. S., Tikunov, A. Yu., & Kozlova, I. V. (2023). Epidemiological situation regarding hemoparasitic diseases of farm animals in the Irkutsk region. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 15(4), 210-235. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2023-15-4-210-235>. EDN: <https://elibrary.ru/RFJMLR>
12. Abreu, C. C., Edwards, E. E., Edwards, J. F., Gibbons, P. M., Leal de Araújo, J., Rech, R. R., & Uzal, F. A. (2017). Blackleg in cattle: A case report of fetal infection and a literature review. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 29(5), 612-621. <https://doi.org/10.1177/1040638717713796>
13. Abusnina, W., Shehata, M., Karem, E., Koc, Z., & Khalil, E. (2019). *Clostridium sporogenes* bacteremia in an immunocompetent patient. *IDCases*, 15, e00481. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00481>
14. Awad, M. M., Singleton, J., & Lyras, D. (2016). The Sialidase NanS Enhances Non-TcsL Mediated Cytotoxicity of *Clostridium sordellii*. *Toxins (Basel)*, 8(6), 189. <https://doi.org/10.3390/toxins8060189>

15. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes* (2nd ed.). (2009). New York: Springer-Verlag. pp. 1309-1329. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5_2
16. Chean, R., Kotsanas, D., Francis, M. J., Palombo, E. A., Jadhav, S. R., Awad, M. M., Lyras, D., Korman, T. M., & Jenkin, G. A. (2014). 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. *Anaerobe*, 30, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.007>
17. Goossens, E., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., De-prez, P. R., & Van Immerseel, F. (2017). Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Veterinary research*, 48(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0413-x>. EDN: <https://elibrary.ru/KMLWKY>
18. Moore, R. J., & Lacey, J. A. (2019). Genomics of the Pathogenic *Clostridia*. *Microbiol Spectr*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
19. Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H. R., Duffield, T., Peregrine, A. S., Trotz-Wil-liams, L. A., Arroyo, L. G., Brazier, J. S., & Weese, J. S. (2006). *Clostridium dif-ficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg. Infect. Dis*, 12(11), 1730-1736. <https://doi.org/10.3201/eid1211.051581>
20. Seise, B., Pollok, S., Seyboldt, C., & Weber, K. (2013). Dry-reagent-based PCR as a novel tool for the rapid detection of *Clostridium* spp. *J. Med. Microbiol*, 62(Pt 10), 1588-1591. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.060061-0>
21. Silva, R. O. S., Uzal, F. A., Oliveira Jr, C. A., & Lobato, F. C. F. (2016). *Clos-tridial Diseases of Animal*. In *John Wiley & Sons, Ltd.* (pp. 243-254). Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781118728291.ch20>
22. Morandi, S., Cremonesi, P., Silvetti, T., Castiglioni, B., & Brasca, M. (2015). Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *Anaerobe*, 34, 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.005>
23. Uzal, A., & Songer, J. G. (2019). *Clostridial Diseases* (pp. 792-806). <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch51>

ДАнные об авторах

Нефедченко Алексей Васильевич, д.в.н., доцент, ведущий научный со-трудник лаборатории биотехнологии-диагностический центр ИЭ-ВСиДВ
СФНЦА РАН

р.п. Краснообск, Новосибирская область, 630501, Российская Федерация
nefedchenkoav@sfsca.ru

Судоргина Татьяна Евгеньевна, к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии-диагностический центр ИЭВСиДВ
СФНЦА РАН
р.п. Краснообск, Новосибирская область, 630501, Российская Федерация
tatjana177@mail.ru

Глотова Татьяна Ивановна, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии-диагностический центр ИЭВСиДВ
СФНЦА РАН
р.п. Краснообск, Новосибирская область, 630501, Российская Федерация
t-glotova@mail.ru

Котенева Светлана Владимировна, к.в.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии-диагностический центр ИЭВСиДВ
СФНЦА РАН
р.п. Краснообск, Новосибирская область, 630501, Российская Федерация
koteneva-sv@mail.ru

Глотов Александр Гаврилович, д.в.н., профессор, заведующий лабораторией, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии-диагностический центр ИЭВСиДВ
СФНЦА РАН
р.п. Краснообск, Новосибирская область, 630501, Российская Федерация
glotov_vet@mail.ru

DATA ABOUT THE AUTHORS

Alexey V. Nefedchenko, Doctor of Veterinary Science, Associate Professor, Leading Research Assistant
Siberian Federal Research Center for Agro-BioTechnologies Russian Academy of Science, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East

Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

nefedchenkoav@sfsca.ru

SPIN-code: 1583-5776

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4181-4268>

ResearcherID: Q-2568-2016

Scopus Author ID: 56662231300

Tatiana E. Sudorgina, Candidate of Veterinary Science, Senior Research Assistant

Siberian Federal Research Center for Agro-BioTechnologies Russian Academy of Science, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East

Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

tatjana177@mail.ru

SPIN-code: 3697-6010

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4226-5421>

Researcher ID: LIF-9100-2024

Tatiana I. Glotova, Doctor of **Biological** Science, Professor, Chief Research Assistant

Siberian Federal Research Center for Agro-BioTechnologies Russian Academy of Science, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East

Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

t-glotova@mail.ru

SPIN-code: 7488-5915

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>

ResearcherID: A-5596-2014

Scopus Author ID: 7003677877

Svetlana V. Koteneva, Candidate of Veterinary Science, Leading Research Assistant

Siberian Federal Research Center for Agro-BioTechnologies Russian Academy of Science, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East

Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

koteneva-sv@mail.ru

SPIN-code: 7545-7206

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2649-7505>

ResearcherID: Q-7924-2016

Scopus Author ID: 57191955208

Alexander G. Glotov, Doctor of Veterinary Science, Professor, Chief Research Assistant, Head of Laboratory

Siberian Federal Research Center for Agro-BioTechnologies Russian Academy of Science, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East

Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

glotov_vet@mail.ru

SPIN-code: 5020-6503

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>

ResearcherID: L-7720-2017

Scopus Author ID: 7004340265

Поступила 16.10.2024

После рецензирования 25.10.2024

Принята 07.11.2024

Received 16.10.2024

Revised 25.10.2024

Accepted 07.11.2024