

age to the tissues of the host organism, which significantly limits the possibility of their eradication.

Along with clinically significant isolates, there are colonizing isolates that do not cause infection at a specific site. It should be noted that under certain conditions, the colonizing isolate can cause an infectious process.

Irrational use of antimicrobials is a key reason for the development of tolerance. Also, the untimely detection of enzyme inactivation of antibiotics by laboratory methods and the spread of resistance genes play an important role. Currently, disks and media with antibacterial drugs are widely used to detect multidrug resistance of microorganisms. Along with these methods, PCR diagnostics and sequencing are used to accurately determine antibiotic resistance genes.

Due to the importance and relevance of this topic, many scientists are conducting research to detect and study the multiresistance of enterobacteria such as *E. coli*, and their spread among animals.

Key words: antibiotic resistance, bacteria, beta-lactamase, enterobacteria, horses.

REFERENCES

1. Afinogenova, A.G. Microbial isolates - causative agents of infectious complications: clinical significance, resistance to antimicrobial drugs and ways to overcome it / Afinogenova A.G., Afinogenov G.E., Spiridonova A.A. // Bulletin of Hematology. -2018.-14(4). -WITH. 20-21.
2. Makavchik, S.A. Laboratory methods for the control of multiresistant pathogens of bacterial animal diseases and the rational use of antimicrobial drugs: monograph / Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Engashev S.V., Krotova A.L. - St. Petersburg: publishing house VVM, 2021.-p. 152s.:ill.
3. Apostolakis, I. Occurrence and molecular characteristics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in faecal samples from horses in an equine clinic/ I. Apostolakis, Eelco Franz, Angela H. A. M. van Hoek, Alice Florijn, Christiaan Veenman, Marianne M. Sloet-van Oldruitenborgh-Oosterbaan, Cindy Dierikx, Engeline van Duijken // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 72, Is. 7.- 2017.-P. 1915-1921.
4. De Lagarde, M. Risk Factors, and Characterization of Multidrug Resistant and ESBL/AmpC Producing *Escherichia coli* in Healthy Horses in Quebec, Canada, in 2015-2016/M. de Lagarde, J. M. Fairbrother, and J. Arsenault // Animals.- 2020.- 10(3).- P. 523.
5. Dolejska, M. Plasmids carrying bla(CTX-M-1) and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre/ M. Dolejska, E. Duskova, J. Rybarikova, D. Janoszowska, et al. // The Journal of antimicrobial chemotherapy.-2011.-66.-P. 757-764.
6. Shnaiderman-Torban, A. Extended spectrum β lactamase-producing *Enterobacteriaceae* shedding by race horses in Ontario, Canada/ Shnaiderman-Torban A., Navon-Venezia S., Paitan Y. et al. // BMC Vet Res16.-2020.-P. 479
7. Shnaiderman-Torban, A. Extended-Spectrum β -lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Shedding in Farm Horses Versus Hospitalized Horses: Prevalence and Risk Factors/ Shnaiderman-Torban A., Navon-Venezia S., Dor Z, Paitan Y, Arielly H, Abu Ahmad W, Kelmer G, Fulde M, Steinman A. // Animals.- 2020.- 10(2).-P. 282
8. Sukmawinata, E. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy Thoroughbred racehorses in Japan/ E. Sukmawinata, W. Sato, S. Mitoma, et al. // Journal of Equine Science.-2019;30(3)7-P. 47-53.
9. Valcek, A. Horsing Around: *Escherichia coli* ST1250 of Equine Origin Harboring Epidemic IncH11/ST9 Plasmid with blaCTX-M-1 and an Operon for Short-Chain Fructooligosaccharide Metabolism/A. Valcek, P. Sismova, K. Nesporova, S. Overballe-Petersen, I. Bitar, I. Jamborova // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 65(5).- 2021.-P. 1-11.
10. Walther, B. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* among horses entering a veterinary teaching hospital: The contemporary "Trojan Horse"/ B. Walther, Klein K-S, Barton A-K, Semmler T., Huber C., Wolf S.A., et al. // Plos One.-2018.-P. 1-12.

УДК: 579.[844.12+852.13].083.18

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.2.42

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* И *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM*

Моисеева Карина Абдукажоревна¹, orcid.org/0000-0003-4526-7430

Сухинин Александр Александрович¹, д-р.биол.наук, профессор, orcid.org/0000-0002-1245-3440

Попова Маргарита Руслановна², младший научный сотрудник

¹Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Россия

РЕФЕРАТ

Статья посвящена дифференциальной диагностике штаммов *Clostridium perfringens* и *Fusobacterium necrophorum* в исследуемом материале крупного рогатого скота. Тема исследования актуальна, так как рациональная, своевременная и точная диагностика этиологии инфекционных болезней крупного рогатого скота в условиях промышленного скотоводства предупреждает возникновение и передачу инфекционных агентов, обеспечивая тем самым экономически выгодное бесперебойное производство высокопитательных продуктов и сырья.

Своевременный и точный диагноз позволяет ветеринарным врачам назначить эффективный план лечения и профилактики для предупреждения возникновения и распространения инфекционных болезней крупного рогатого скота, в том числе, болезней кишечной группы [2,6]. Одной из причин геморрагического энтерита, снижения продуктивности и летальности от 25% молодняка может являться энтеротоксемия, ассоциированная с токсинпродуцирующими штаммами *Clostridium perfringens*. Дифференциальная диагностика является обязательным этапом комплексной постановки диагноза, учитывая эпизоотологические данные, клинические признаки больных и условно больных животных, патологоанатомических данных вынужденно убитых и павших животных, лабораторных методов диагностики, в том числе бактериологический и молекулярно-генетический методы.

В результате исследования были применены оптимальные методы лабораторной диагностики, включая бактериоскопию, метод чистых культур и полимеразную цепную реакцию (ПЦР), что позволило идентифицировать штаммы *Fusobacterium necrophorum* и *Clostridium perfringens*. Точная и быстрая идентификация возбудителей *Fusobacterium necrophorum* и *Clostridium perfringens* позволит ветеринарным врачам в короткие сроки разработать план лечебно-профилактических мероприятий.

Ключевые слова: *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens*, крупный рогатый скот, диагностика, энтеротоксемия.

ВВЕДЕНИЕ

Энтеротоксемия крупного рогатого скота, вызванная *Clostridium perfringens* и ассоциациями с бактериями, вирусами и грибами, относится к актуальной проблеме здравоохранения и ветеринарии [4,5]. *Clostridium perfringens* является грамположительной, анаэробной, спорообразующей, неподвижной, полиморфной палочкой, широко распространенной в окружающей среде: почве, сточных водах, продуктах животноводства [3,4,8]. Патогенное действие *Clostridium perfringens* обусловлено факторами патогенности – способностью к продукции токсина, экзотоксина и ферментов агрессии [3,4,9].

Дифференциальная диагностика смешанных инфекций проводится бактериологическим, серологическим и молекулярно-генетическим методами: наиболее частыми возбудителями инфекционной диареи крупного рогатого скота являются энтеропатогенные штаммы *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus spp*, *Salmonella enteridis* и *Salmonella dublin*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella spp*, а также рота-, корона-вирусы [8].

В Северо-Западном регионе в процессе исследования были изучены пробы – содержимое прямой кишки и ран дистальных отделов конечностей 49 голов крупного рогатого скота с целью дифференциальной диагностики бактерий. У животных регистрировали такие клинические признаки, как повышение температуры тела, отказ от корма, общая интоксикация, диарея с примесью слизи и крови, обильное газообразование, раны с гнойным содержимым, нервные явления и др. Такие клинические и патологоанатомические признаки, как некротический или гемморагический энтерит, энтеротоксемия и раны дистальных отделов конечностей могут быть вызваны другими возбудителями, например, *Fusobacterium necrophorum* [1].

Некробактериоз — зооантропонозная инфекционная болезнь, характеризующаяся гнойно-некротическим поражением кожи, слизистых оболочек, внутренних органов и конечностей, распространяющаяся с током крови, образуя в органах вторичные некротические очаги – метастазы, вызываемая полиморфной палочкой *Fusobacterium necrophorum* [7]. Возбудитель некробактериоза — неподвижная грамтрицательная полиморфная палочка, являющаяся строгим анаэробом, спор и капсул не образует [7,10].

Проблема идентификации возбудителей является актуальной, учитывая повсеместную распространенность *Clostridium perfringens* и *Fusobacterium necrophorum*. Идентификация возбудителей проводится бактериологическим, серологическим и молекулярно-генетическим методами, в

зависимости от оснащения оборудованием, реагентами, культуральными средами лабораторий [2,5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификацию микроорганизмов проводили бактериологическим и биологическим методами, штамм *Clostridium perfringens* подтверждали молекулярно-генетическим методом, а именно, ПЦР в режиме реального времени. Исследовали гнойное содержимое с примесью крови копыт и межпальцевой щели телят и коров, содержимое прямой кишки.

Бактериологический метод включал в себя бактериоскопию и метод чистых культур. Мазки гнойного содержимого с примесью крови копыт и межпальцевой щели телят и коров, содержимое прямой кишки окрашивали по Граму.

Метод чистых культур включал в себя культивирование на селективной и дифференциально-диагностической средах, а именно сахарокровяном агаре и среде Китта-Тароцци в анаэробных условиях, при температуре 37°C, pH=7,6 с помощью системы атмосферной генерации для in vitro диагностики AnaeroGen W-ZIP Compact, чашки Петри помещали в анаэростат Anaerobic MLAB 3,0л (Россия) (Рис. 1).

ПЦР включала в себя выделение нуклеиновой кислоты микроорганизмов в пробе комплектом реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В», подбор праймеров, кодирующих ген α -токсина *Clostridium perfringens* и амплификацию в режиме реального времени с помощью амплификатора Real-Time ДТ-96.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В молодой культуре, где патологическим материалом для исследования служило содержимое с примесью крови копыт и межпальцевой щели телят и коров, обнаруживали длинные зернисто-окрашенные нити, окрашивали карболовым фуксином и метиленовым синим (Рис. 2).

Наиболее чувствительны к возбудителю некробактериоза кролики и белые мыши [1,7,10]. Белую мышь заражали эмульсией из патологического материала – суспензии из содержимого копыта и межпальцевой щели на физиологическом растворе. Заражение проводили под кожу хвоста в дозе 0,4 мл. На 3 день в окружности инъекции наблюдали опухоль и нагноение, на 6 день – некроз.

На 12 день регистрировали гибель мыши, при патологоанатомическом вскрытии наблюдали некроз мышц конечностей, гнойные очаги в печени, легких, сердце, откуда получили чистую культуру (Рис. 3).

Мазки-отпечатки печени на глюкозо-

кровяном агаре культивировали по вышеупомянутой технологии. Через 48 часов регистрировали очень мелкие колонии S-формы, диаметром менее 1 мм, выпуклые, серо-белого цвета с ровными краями (Рис. 4).

В молодой культуре, из колоний среды Китта-Тароцци, где патологическим материалом для исследования служило содержимое прямой кишки телят и коров, обнаруживали грамположительные, овальные, толстые палочки, расположенные одиночно, по морфологии схожих с *Clostridium perfringens* (Рис. 5).

На сахаро-кровяном агаре регистрировали серовато-белые, круглые, сочные, куполообразные S-колонии, с гладкими ровными краями, мутные с зоной β – гемолиза.

Методом ПЦР установили содержание в 12 из 49 исследуемых проб ДНК α –токсина *Clostridium perfringens*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были применены оптимальные методы лабораторной диагностики, включая бактериоскопию, метод чистых культур и полимеразную цепную реакцию, что позволило идентифицировать штаммы *Fusobacterium necrophorum* и *Clostridium perfringens*. Результаты бактериологической диагностики *Fusobacterium necrophorum* согласуются с данными Сущих В.Ю., Мусаевой А. К., Егоровой Н. Н. в 2022 году – культуры возбудителя обладали высокой патогенностью для лабораторных животных [7]; результаты бактериологической диагностики *Clostridium perfringens* согласуются с данными Литусова Н.В. [3].

Точная и быстрая идентификация возбудителей *Fusobacterium necrophorum* и *Clostridium perfringens* позволит ветеринарным врачам в короткие сроки разработать план лечебно-профилактических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кисленко, В. Н. Ветеринарная микробиология

и иммунология. Часть 3. Частная микробиология: учебник / В. Н. Кисленко, Н. В. Колычев, О. С. Суворина. – М.: КолосС, 2007 – 215 с.

2. Кулагина, М. Г. "Дифференциальная диагностика острых диарейных инфекций" Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение, 2013– № 4 – С. 39-47.

3. Литусов Н.В. Возбудители клостридиальной анаэробной инфекции. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: УГМУ, 2017. – 19 с.

4. Лобзин Ю. В. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens* /Кветная А.С., Скрипченко Н.В., Железова Л. И.//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021. Том.98. №1. – С. 91-97.

5. Макавчик, С. А. Механизмы резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от крупного рогатого скота/ Макавчик С.А., Кротова А.Л., Баргман Ж.Е., Сухинин А.А., Приходько Е.И.// Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии.- 2020; 4: 41–46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41.

6. Смирнова Л.И., Макавчик С.А.Клиническая ветеринарная микробиология: учебное пособие - Санкт-Петербург: изд-во ВВМ, 2022., с. 228.: ил.

7. Сущих В.Ю., Мусаева А.К., Егорова Н.Н. Некробактериоз крупного рогатого скота. Национальная ассоциация ученых, № 77, 2022, с. 10-18.

8. Хурамшина М.Т., Махмутов А.Ф., Спиридонов Г.Н., Макаев Х.Н. Распространение желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят в регионе Среднего Поволжья // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2020. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranenie-zheludochno-kishechnykh-zabolevaniy-novorozhdennykh-telyat-v-regione-srednego-povolzhya> (дата обращения: 07.03.2023).

9. McClane, B.A.; Uzal, F.A.; Miyakawa, M.F.; Lyster, D.; Wilkins, T.D. The enterotoxigenic clostridia. In The Prokaryotes, 3rd ed.; Dworkin, M., Falkow,



Рисунок 1. Чашки Петри в анаэрокате Anaerobic MLAB 3,0л.



Рисунок 2. *Fusobacterium* spp., x100.

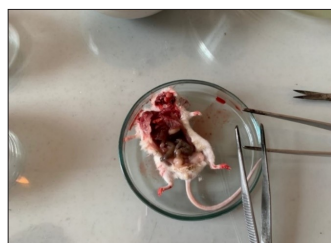


Рисунок 3. Вскрытие белой мыши, зараженной эмульсией из патологического материала



Рисунок 4. Колонии *Fusobacterium* spp. на глюкозо-кровяном агаре

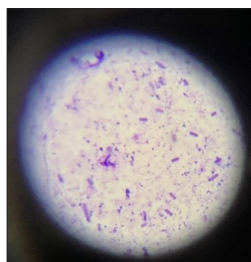


Рисунок 5. *Clostridium perfringens* spp., x100.

IDENTIFICATION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* AND *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* ISOLATES

Karina A. Moiseeva¹, postgraduate student, [orcid.org/ 0000-0003-4526-7430](https://orcid.org/0000-0003-4526-7430)

Alexander A. Sukhinin¹, Dr. Habil. in Biological Sciences, Professor, [orcid.org/ 0000-0002-1245-3440](https://orcid.org/0000-0002-1245-3440)

Margarita R. Popova², junior researcher

¹St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

²Saint-Petersburg Pasteur Institute

The article is devoted to the differential diagnosis of strains of *Clostridium perfringens* and *Fusobacterium necrophorum* in the studied material of cattle. The research topic is relevant, since rational, timely and accurate diagnosis of the etiology of infectious diseases in cattle in the conditions of industrial cattle breeding prevents the occurrence and transmission of infectious agents, thereby ensuring cost-effective uninterrupted production of highly nutritious products and raw materials.

Timely and accurate diagnosis allows veterinarians to prescribe an effective treatment and prevention plan to prevent the occurrence and spread of infectious diseases in cattle, including intestinal diseases [2,6]. One of the causes of hemorrhagic enteritis, reduced productivity and mortality from 25% of young animals may be enterotoxemia associated with toxin-producing strains of *Clostridium perfringens*. Differential diagnosis is an obligatory step in a comprehensive diagnosis, taking into account epizootological data, clinical signs of sick and conditionally sick animals, pathoanatomical data of forcedly killed and dead animals, laboratory diagnostic methods, including bacteriological and molecular genetic methods.

As a result of the study, optimal methods of laboratory diagnostics were applied, including bacterioscopy, the method of pure cultures and polymerase chain reaction (PCR), which made it possible to identify strains of *Fusobacterium necrophorum* and *Clostridium perfringens*. Accurate and rapid identification of pathogens *Fusobacterium necrophorum* and *Clostridium perfringens* will allow veterinarians to develop a plan of treatment and preventive measures in a short time.

Key words: *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens*, cattle, diagnostics, enterotoxemia.

REFERENCES

1. Kislenco VN Veterinary microbiology and immunology. Part 3. Private microbiology: textbook / V. N. Kislenco, N. V. Kolychev, O. S. Suvorina. - M.: KolosS, 2007 - 215 p.
2. Kulagina, M. G. "Differential diagnosis of acute diarrheal infections" Infectious diseases: News. Opinions. Education, 2013 - No. 4 - P. 39-47.
3. Litsov N.V. Causative agents of clostridial anaerobic infection. Illustrated tutorial. - Yekaterinburg: USMU, 2017. - 19 p.
4. Lobzin Yu. V. Modern ideas about the etiopathogenetic and genetic features of *Clostridium perfringens* toxins / Kvetnaya A.S., Skripchenko N.V., Zhelezova L. I. // Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology. 2021. Vol.98. No. 1. - S. 91-97.
5. Makavchik, S. A. Mechanisms of resistance to antimicrobial drugs in microorganisms isolated from cattle / Makavchik S. A., Krotova A. L., Bargman Zh. E., Sukhinin A. A., Prikhodko E. I. // Issues of legal regulation in veterinary medicine. - 2020; 4:41-46. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2020.4.41.
6. Smirnova L.I., Makavchik S.A. Clinical veterinary microbiology: textbook - St. Petersburg: VVM publishing

S., Rosenberg, E., Schleifer, H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer NY /Press: New York, NY, USA, 2006; pp. 688-752.

10. Tadepalli S, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM, Nagaraja TG. *Fusobacterium necrophorum*: a ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. *Anaerobe*. 2009 Feb-Apr;15(1-2):36-43. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.05.005. Epub 2008 May 24. PMID: 18595747.

house, 2022., p. 228.: ill.

7. Suschi V. Y., Musaeva A. K., and Egorova N. N. "NECROBACTERIOSIS OF CATTLE" National Association of Scientists, no. 77, 2022, pp. 10-18.

8. Khuramshina M.T., Makhmutov A.F., Spiridonov G.N., Makaev Kh.N. The spread of gastrointestinal diseases of newborn calves in the Middle Volga region // *Uchenye zapiski KGAVM im. N.E. Bauman*. 2020. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostraneniye-zheludochno-kishechnyh-zabolevaniy-novorozhdennyh-telyat-v-regione-srednego-povolzhya> (date of access: 03/07/2023).

9. McClane, B.A.; Uzal, F. A.; Miyakawa, M. F.; Lyerly, D.; Wilkins, T.D. The enterotoxigenic clostridia. In *The Prokaryotes*, 3rd ed.; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer NY /Press: New York, NY, USA, 2006; pp. 688-752.

10. Tadepalli S, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM, Nagaraja TG. *Fusobacterium necrophorum*: a ruminal bacterium that invades the liver to cause abscesses in cattle. *Anaerobe*. 2009 Feb-Apr;15(1-2):36-43. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.05.005. Epub 2008 May 24. PMID: 18595747.

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстового анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35, Моб. тел.: 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**