

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

КОСТАНАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А.
БАЙТУРСЫНОВА

Г. Чужебаева, И. Бейшова, А. Ковальчук, А. Елеусизова, А. Батырбеков, Н. Кауменов

**Экспресс-диагностика клостридиозов животных и
идентификация штаммов *Clostridium* методом полимеразной цепной реакции**

Монография



Костанай, 2017

УДК 619:579.852.13

ББК 48.61

Э-41

Рецензенты: доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ «ВНИИ генетики и разведения с./х. животных» РФ, д.б.н., профессор Терлецкий В.П., PhD, ст. преподаватель кафедры биологии и химии КГУ им. А. Байтурсынова Ергалиев Т.М.

Чужебаева Г.Д., Бейшова И.С., Ковальчук А.М., Елеусизова А.Т., Батырбеков А.Н., Кауменов Н.С.

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА КЛОСТРИДИОЗОВ ЖИВОТНЫХ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ CLOSTRIDIUM МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Монография Г. Чужебаевой, И. Бейшовой, А. Елеусизовой, А. Ковальчук, А. Батырбекова, Н. Кауменова - Костанай.: Костанайский государственный университет имени Ахмета Байтурсынова, 2017.- 96 с.

ISBN 978-601-7933-71-5

В монографии описан принцип метода полимеразной цепной реакции, преимущества этого метода, подробно изложена методика постановки ПЦР для диагностики возбудителей клостридиозов. Приведены результаты исследований по разработке протокола реакции. Указанный метод способствует развитию фундаментальных исследований в области изучения инфекционных заболеваний животных и пищевой безопасности. Для преподавателей, студентов, магистрантов и докторантов ветеринарных факультетов сельскохозяйственных ВУЗов.

УДК 619:579.852.13

Монография рассмотрена и рекомендована к изданию научно-техническим советом КГУ им. А. Байтурсынова (протокол № 5 от 23.05.2017г.).

ISBN 978-601-7933-71-5

© Чужебаева Г.Д.
2017

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 Обзор литературы	7
1.1 Клостридиозы - острые инфекционные заболевания человека и животных.....	7
1.2 Основные биологические свойства клостридий.....	10
1.3 Характеристика наиболее опасных возбудителей клостридиозов.....	19
1.3.1 Клостридиоз перфрингенс.....	19
1.3.2 Клостридиоз диффициле.....	22
1.3.3 Клостридиум сорделли.....	25
1.3.4 Ботулизм.....	26
1.4 Диагностика клостридиозов.....	29
2. Экспериментальная часть	32
2.1. Материалы и методы.....	32
2.1.1 Микробиологические исследования.....	32
2.1.2 Получение высокоочищенной ДНК штаммов <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. chauvoei</i>	34
2.1.3 Конструирование праймеров и зондов.....	36
2.1.4 Определение специфичности и чувствительности сконструированных праймеров.....	40
2.1.5 Конструирование положительных контролей.....	41
3. Результаты исследований.....	44
3.1 Выделение эпизоотических штаммов <i>Clostridium septicum</i> , сравнительное изучение их основных биологических свойств, мониторинг распространенности клостридиозов.....	44
3.2 Получение высокоочищенной ДНК штаммов <i>Clostridium</i> , отбор и обработка способов выделения ДНК	48
3.3 Компьютерное моделирование и синтез праймеров и зондов.....	51
3.4 Обработка и оптимизация параметров ПЦР. Подбор и обработка температурно-временного режима.....	61
3.5 Подбор оптимальных условий проведения ПЦР (концентрация компонентов реакционной смеси, буферного раствора).....	65
3.6 Определение чувствительности и специфичности, разработанной ПЦР. Проведение исследований с разными концентрациями ДНК.	66
3.7 Определение специфичности, разработанной ПЦР, проведение ПЦР исследований с ДНК близкородственных микроорганизмов.....	68
3.8 Создание рекомбинантного положительного контрольного образца....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	79
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	81
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	88

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете НИР применялись следующие термины с соответствующими определениями:

Амплификация – процесс образования (умножения) дополнительных копий определенных участков ДНК

А, С, G, Т - азотистые основания, входящие в состав ДНК.

Геном – совокупность последовательностей ДНК, свойственная отдельному организму (или любой клетке внутри организма), определяющая характер его онтогенетического развития и наследственную передачу в ряду поколений всех его структурных и функциональных признаков, а также его положение в иерархии живых существ, населяющих нашу планету.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – высокополимерное природное соединение, содержащееся в ядрах клеток всех живых организмов, в хромосомах бактерий, в составе многих вирусов, носитель генетической информации.

Денатурация (плавление) ДНК – переход молекул ДНК из двуцепочной формы в одноцепочную в результате разрыва водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур, а также в щелочной среде.

ДНК-диагностика – молекулярные методы диагностики мутаций.

ДНК-полимераза – фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки со свободной 3'-ОН-группой; является нуклеотидилтрансферазой.

Отжиг – процесс образования двуцепочных молекул из одиночных полинуклеотидных комплементарных цепей.

Опероны - группа функционально связанных между собой генов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации (умножения числа копий) фрагментов нуклеиновых кислот *in vitro*, с помощью которого можно достаточно быстро (в течение нескольких часов) получить миллионы копий определенных нуклеотидных последовательностей (генов).

Праймер (затравка) – короткий олигодезоксирибонуклеотид (в случае ПЦР), комплементарный соответствующему участку ДНК - матрицы и имеющий на конце свободную 3'-ОН-группу. Праймер служит затравкой при копировании матрицы.

Рестрикция ДНК – один из методов генетической инженерии, необходимый для выделения генов и манипуляций с ними. Для рестрикции используют специфические ферменты – рестриктазы, с помощью которых из ДНК выделяют фрагменты (гены), используемые далее для клонирования или получения рекомбинантных молекул ДНК.

Рибосомные РНК (рРНК) – молекулы РНК, входящие в состав рибосом, составляют около 80 % всех клеточных РНК. Существуют низкомолекулярные

рРНК: для прокариота 5S рРНК (120 н.), для эукариота 5S рРНК (120 н.) и 5,8 рРНК (158 н.), и высокомолекулярные рРНК: для прокариота 16S рРНК (1600 н.).

Секвенирование – определение первичной структуры биополимеров (белков и нуклеиновых кислот), т.е. последовательности расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка или нуклеотидных остатков в полинуклеотидной цепи (ДНК или РНК). Под секвенированием обычно понимают прямое (непосредственное) определение первичной структуры макромолекул с использованием соответствующих физико-химических (биохимических) методов, а не косвенные (основанные на правилах генетического кода) приемы, использующие соответствующие возможности биоинформатики.

Штамм возбудителя - образец определенной локальной популяции с оригинальными свойствами, отражающими своеобразие эволюционирующих паразитарных систем. Природные штаммы характеризуют возбудителей при конкретных эпизоотических ситуациях (эпизоотические, межэпизоотические, природно-ослабленные и т. п.).

Электрофорез – разделение электрически заряженных молекул в электрическом поле.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

МОН	Министерство образования и науки
РГП	Республиканское государственное предприятие
НИЦ	Научно-инновационный центр
КГУ	Костанайский государственный университет
РК	Республика Казахстан
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
т. п. о.	тысяч пар оснований
п. о.	пар оснований
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection organization
dNTPs	дезоксинуклеотидтрифосфаты
T _m	температуру плавления
K-	отрицательный контрольный образец
K+	положительный контрольный образец

Введение

Среди заразных заболеваний животных значительное место занимают заболевания, вызываемые анаэробными микроорганизмами. Анаэробные микроорганизмы находятся повсеместно там, где происходит разложение органических веществ без доступа кислорода: в разных слоях почвы, в прибрежном иле, в кучах навоза, в созревающем сыре и т. п.

Животноводство в республике несет существенный урон от дизентерии ягнят, браздота и энтеротоксемии, в том числе и эмфизематозный карбункул поражает крупный рогатый скот. Не обходит стороной животные всех видов заболевания злокачественный отек, некробациллез, столбняк, ботулизм.

Основным резервуаром и местом пребывания клостридий является почва. Она служит потенциальным источником возникновения анаэробных инфекций у животных и представляет определенную угрозу вспышек в зависимости от природно-климатических характеристик по формированию эмерджентных ситуаций по клостридиозам.

Клостридии широко распространены в почве (десятки тысяч возбудителей в 1 г почвы), в испражнениях людей и животных. Все это создает возможности для обсеменения продуктов. Чаще клостридиозные отравления бывают обусловлены мясными продуктами домашнего приготовления, мясными и рыбными консервами.

Бактерии рода клостридий (*Clostridium*) относятся к числу микроорганизмов, имеющих всесветное распространение. Они часто вызывают тяжелейшие заболевания, которые могут заканчиваться смертельным исходом.

Применяемые на сегодняшний день в практике методы диагностики инфекции имеют определенные ограничения и недостатки. Современный подход к изучению клостридиозов состоит в использовании молекулярно-генетических методов исследования. Данные методы представляют собой различные модификации полимеразной цепной реакции (ПЦР). Достоинства ПЦР обусловлены практической простотой и скоростью, чувствительностью и специфичностью данного метода. В связи с этим крайне актуально освоение и активное внедрение в работу ветеринарных лаборатории методов диагностики, основанных на выявлении уникальных фрагментов генома возбудителя. Указанные методы выявления инфицированности клостридиями являются перспективными, высокая чувствительность, специфичность и относительная простота метода позволяет его использовать в постановке диагноза.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клостридиозы - острые инфекционные заболевания человека и животных.

Клостридиозы - острые инфекционные заболевания человека и животных, вызываемые патогенными штаммами анаэробов из рода клостридий.

По механизму возникновения клостридиозы делятся на энтеральные и травматические. При энтеральных клостридиозах (клостридиоз перфрингенс, клостридиоз диффициле, ботулизм) входными воротами инфекции является желудочно-кишечный тракт, при травматических или раневых (столбняк, газовая гангрена) - поврежденные кожные покровы и слизистые оболочки [1,2,3].

Род клостридий объединяет штаммы анаэробов более 100 видов, которые для удобства идентификации разделены на 5 групп. Большинство из них непатогенны для человека и животных, являясь сапрофитами желудочно-кишечного тракта, или находятся в почве, размножаясь в зоне корней растений. Патогенны для человека только некоторые представители клостридий 2-й и 4-й групп: *Cl. perfringens*, *Cl. difficile* и *Cl. botulinum* - возбудители энтеральных клостридиозов, а также возбудитель столбняка и *Cl. septicum*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. sordellii*, *Cl. perfringens* и др. - возбудители газовой гангрены. Патогенность этих бактерий определяется их адгезивностью и главным образом способностью вырабатывать специфические экзотоксины высокой биологической активности [4,5].

В род *Clostridium* объединены патогенные и сапрофитные анаэробные спорообразующие палочковидные микроорганизмы, за исключением нескольких сульфатредуцирующих пигментообразующих видов.

Родовое название дано на основании сходства этих микроорганизмов с веретеном (*closter* – лат. маленькое веретено), которое они приобретают в результате раздувания бактериальных клеток крупными спорами, располагающимися в центре или ближе к одному концу.

По классификации Bergey (1974) род *Clostridium* включен в семейство *Bacillaceae*. В восьмом издании определителя бактерий Bergey (1974) описан 61 вид клостридий, из них только 12 патогенные, а остальные – непатогенные микробы, вызывающие процессы брожения и гниения разнообразных субстратов растительного и животного происхождения.

Клостридии обладают рядом общих характеристик. Они представляют собой палочки размером 0,3...2 x 1,5...20 мкм с закругленными концами, часто располагающиеся попарно или в виде коротких цепочек. В целом клостридии — облигатные анаэробы, но среди них есть аэротолерантные (*C. perfringens*, *C. histolyticum*); умеренные анаэробы (*C. butyricum*); строгие анаэробы (*C. tetani*, *C. novyi* и др.). В молодых культурах обычно грам-положительные, чаще подвижные, сахаролитическая и протеолитическая активность различна. Одни виды – сахаролитические, другие – протеолитические, третьи – обладают

обоими этими свойствами (сбраживают углеводы, многоатомные спирты, аминокислоты, пурины и другие органические соединения) [5,6,7,8].

В биохимическом отношении характерным для клостридий является отсутствие каталазы – фермента, катализирующего разложение перекиси водорода. Вследствие этого вегетативные клетки многих видов клостридий, которым свойственно высокое содержание флавиновых ферментов, быстро погибают при контакте с кислородом в результате образования избытка перекиси водорода. Толерантность к воздуху, наблюдающаяся у некоторых видов, возможно, обуславливается более слабым образованием перекиси.

Содержание Г + Ц в ДНК 23.,50 мол. %. Образуют токсины, образуют споры, расположенные по центру, что придает форму веретена (кроме возбудителя столбняка, спора которого располагается на одном из концов, придавая форму барабанной палочки).

Возбудители клостридиозов — сапрофиты, они широко распространены в природных средах: почве, осадках водоемов, составляют часть микрофлоры пищеварительного, респираторного и урогенитального тракта животных и человека, осуществляющую процессы брожения и гниения, работающую по принципу кишечник—почва. Некоторые виды образуют сильные экзотоксины и патогенны для животных и человека. Для них характерен как летальный, так и нелетальный паразитизм, а сами клостридиозы таким образом являются сапронозами (рисунок 1).



Рисунок 1 – теленок больной энтеротоксемией

Бактерии отлично существуют во внешней среде, сохраняя способность к размножению при оптимальных условиях (отсутствие кислорода, температура и влажность). Кроме того, микробы проявляют повышенную резистентность к большинству дезинфицирующих средств. Споровые формы весьма устойчивы к нагреванию (при кипячении инактивируются только за 10-20 минут), а в замороженном состоянии могут храниться годами.

У клостридии в целом не обнаружены факторы, вызывающие привыкание к антибактериальным препаратам, о чем говорит опыт многолетнего использования антибиотиков в терапии вызываемых ими болезней.

Характерным для болезней клостридиальной этиологии является отравление организма токсинами, т. е. все они представляют собой токсикоинфекции. При отдельных клостридиозах наряду с токсемией отмечается и бактериемия [8,9,10].

Факторами патогенности клостридии являются инвазивность и токсигенность. Инвазивность лидирует в локальных поражениях тканей и обусловлена действием ферментов. Экзотоксины вызывают более широкие системные поражения организма и служат основными факторами патогенности клостридии. У некоторых клостридии, токсигенность которых невысока (*C. chauvoei*, *C. septicum*), факторами патогенности, очевидно, являются жгутики, обеспечивающие подвижность, адгезию и гемагглютинацию.

Различные виды как патогенных, так и сапрофитных клостридий имеют близкое родство и в антигенном отношении. Установлено наличие перекрестных серологических реакций между отдельными видами клостридий, обусловленное не только соматическими и жгутиковыми антигенами, но и антигенами токсинов и ферментов, продуцируемых этими микроорганизмами.

В процессе эволюционного развития и дифференциации видов клостридии приспособились к существованию в самых различных условиях. Они являются нормальными обитателями почвы. Различные их виды существуют в морских и пресноводных отложениях, в пищеварительном тракте различных представителей фауны, особенно позвоночных. Принимают участие в разложении органических веществ растительного и животного происхождения. Некоторые являются фиксаторами атмосферного азота. Отдельные виды находят применение в микробиологической промышленности как продуценты для получения химических веществ (ацетона, бутанола), ферментов и т.д. Патогенные виды являются возбудителями болезней человека и животных [11,12,13,14].

Отличительными признаками патогенных клостридий, как отмечалось выше, являются особенности питания и способность продуцировать высокоактивные токсины, которым принадлежит ведущая роль в патогенезе вызываемых ими болезней, объединенных под общим названием – клостридиозы. Клостридиозы, вызванные патогенными клостридиями: инфекционная энтеротоксемия (браззотоподобное заболевание) овец; браззот (овец); столбняк (болеют лошади, овцы, козы и человек); ботулизм (все виды теплокровных и холоднокровных животных, чаще лошади, КРС, МРС, куры, а также человек); злокачественный отек (все виды животных), газовая гангрена у человека; некротический гепатит овец; анаэробная дизентерия ягнят; эмфизематозный карбункул и бациллярная гемоглобинурия крупного рогатого скота; остеомиелит буйволов; некротический энтерит и токсикоинфекции людей [15].

Механизм инфекционного процесса

Клостридии подразделяются на два типа, в зависимости от патогенного действия – механическое повреждение и токсический эффект. При этом большинство возбудителей продуцируют сильнейшие токсины, приводящие к

поражению нервной системы и некрозу тканей. Механическое действие редко и оказывает незначительный эффект у небольшого числа возбудителей.

Микроорганизмы подразделяются по способу проникновения в организм животного и дальнейшему патологическому действию на кормовые (ботулизм, бродзот, энтеротоксемия) и раневые (столбняк, эмкар, злокачественный отек) инфекции. Алиментарные заболевания встречаются в практике животноводства значительно чаще, нанося огромный экономический эффект. Травматические инфекции регистрируются реже, но сопровождаются высокой летальностью.

Основная опасность клостридиозов крупного рогатого скота заключается в образовании возбудителями патогенных токсинов, приводящих к стремительному летальному исходу.

Болезнь не отличается видовой специфичностью, хотя крупный рогатый скот более восприимчив к злокачественному отеку, эмкару, ботулизму и столбняку, а вот плотоядные и человек обладают большей резистентностью к данным микробам. Во внешнюю среду бактерии попадают с калом, содержимым ран (эмкар, злокачественный отек), другими выделениями. Также возбудители могут размножаться во внешней среде [16,17].

1.2 Основные биологические свойства клостридий

В инфекционной патологии животных из клостридиозов наибольшее значение имеют злокачественный отек животных, инфекционная энтеротоксемия овец, бродзот овец, анаэробная дизентерия ягнят, эмкар, столбняк и ботулизм.

Возбудители клостридиозов:

- *Cl. perfringens* (*Bac. perfringens*, *Cl. welchii*) типа А – возбудитель газовой гангрены людей; выделяется при злокачественном отеке животных, гастроэнтеротоксемии молодняка животных, вызывает пищевые токсикоинфекции у людей, некротический мастит овец, коз и крупного рогатого скота;

- *Cl. perfringens* (*Lamb dysentery bacillus*) типа В – возбудитель анаэробной дизентерии ягнят, некротического энтерита козлят, телят, поросят, жеребят и цыплят;

- *Cl. perfringens* (*Bac. paludis*) типа С – вызывает геморрагическую энтеротоксемию овец, иногда энтеротоксемию телят, ягнят, поросят, коз и верблюдов;

- *Cl. perfringens* (*Bac. ovitoxicus*) типа D – возбудитель классической инфекционной энтеротоксемии овец, для которой характерно размягчение почек; выделяется также при энтеротоксемии коз, телят и при «травяной болезни» лошадей;

- *Cl. perfringens* типа E – вызывает инфекционную энтеротоксемию у телят и ягнят;

- *Cl. perfringens* (*Bac. enterotoxicus*) типа F – вызывает некротические энтериты у людей;

- *Cl. perfringens* типов В, С, D – вызывают инфекционную энтеротоксемию у ягнят, козлят, телят, поросят, жеребят, верблюжат, пушных зверей, диких животных и птиц;

- *Cl. septicum* (*Vibrion septique*, *Bacillus oedematis maligni*) – возбудитель бродзота овец, основной возбудитель злокачественного отека животных;

- *Cl. chauvoei* – возбудитель эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота, редко овец и коз, буйволов, оленей и других жвачных животных;

- *Cl. novyi* (*Clostridium oedematiens*) типа А – выявляется среди возбудителей злокачественного отека животных (возбудитель газового отека лошади), газовой гангрены людей; выделяется также при бродзоте;

- *Cl. novyi* (*Clostridium gigas*) типа В – выделяется при бродзоте овец, вызывает некротический гепатит овец и злокачественный отек у овец, газовую гангрену;

- *Cl. novyi* (*Cl. bubalorum*) типа С – выделяется при остеомиелите у буйволов;

- *Cl. novyi* (*Cl. haemolyticum*) типа D – возбудитель гемоглинурии крупного рогатого скота – очень редко у овец, в единичных случаях у свиней;

- *Cl. tetani* (*Bacillus tetani*) – возбудитель столбняка; восприимчивы лошади, овцы, козы и человек;

- *Cl. botulinum* (*Bacillus botulinus*) – возбудитель ботулизма, к которому чувствительны все виды теплокровных и холоднокровных животных, а также человек;

- *Cl. histolyticum* – возбудитель раневой инфекции, выделяется при злокачественном отеке животных, газовой гангрене людей;

- *Cl. sporogenes* – непатогенный анаэроб, способствует гнилостному распаду отмерших тканей;

- *Cl. sordellii* – выделяется при газовой гангрене людей; описаны единичные случаи выделения при злокачественном отеке животных. У *Cl. sordellii* есть патогенный вариант – *Cl. bifermentans*.

Таким образом, у клостридиоза могут быть основной и второстепенные возбудители болезни [18,19]. Основные и второстепенные возбудители наиболее значимых клостридиозов приведены в таблице 1.

Таблица 1- Возбудители наиболее опасных клостридиозов

№ п.п.	Наименование болезни	Основной возбудитель (синоним)	Второстепенные возбудители (основное название и синоним)			
1.	Газовая гангрена людей	<i>Cl. perfringens</i> (<i>Bac. perfringens</i> , <i>Cl. welchii</i> , <i>B. Fraenkeli</i>) типа А	<i>Cl. novyi</i> (<i>Cl. Oedematiens</i> , <i>Bac. oedematiens</i>) типа А	<i>Cl. histolyticum</i> (<i>Bac. histolyticus</i>)	<i>Cl. novyi</i> типа В (<i>Clostridium gigas</i>)	Непатогенный анаэроб <i>Cl. Sporogenes</i> (<i>B. sporogenes</i>)
2.	Анаэробная дизентерия ягнят	<i>Cl. perfringens</i> (<i>Lamb dysentery bacillus</i>) типа В				
3.	Инфекционная энтеротоксемия овец	<i>Cl. perfringens</i> (<i>Bac. ovitoxicus</i>) типа D				
4.	Злокачественный отек животных	<i>Cl. septicum</i> (<i>Vibrion septicum</i> , <i>Bacillus oedematis maligni</i>)	<i>Cl. perfringens</i> (<i>Bac. Perfringens</i> , <i>Cl. welchii</i> , <i>B. fraenkeli</i>) типа А	<i>Cl. novyi</i> (<i>Clostridium oedematiens</i> , <i>Bac. oedematiens</i>) типа А	<i>Cl. histolyticum</i> (<i>Bac. histolyticus</i>)	Непатогенный анаэроб <i>Cl. sporogenes</i> (<i>B. sporogenes</i>)
5.	Брадзот овец	<i>Cl. septicum</i> (<i>Vibrion septicum</i> , <i>Bacillus oedematis maligni</i>)	<i>Cl. perfringens</i> (<i>Bac. paludis</i>) типа С	<i>Cl. novyi</i> (<i>Clostridium oedematiens</i>) типа А	<i>Cl. novyi</i> (<i>Cl. gigas</i>) типа В	
6.	Эмфизематозный карбункул	<i>Cl. chauvoei</i> (<i>Bacillus chauvoei</i>)				
7.	Столбняк	<i>Cl. tetani</i> (<i>Bacillus tetani</i>)				
8.	Ботулизм	<i>B. botulinus</i> (<i>Cl. botulinum</i>)				
9.	Раневая инфекция	<i>Cl. histolyticum</i> (<i>Bac. histolyticus</i>)				

Дифференциация патогенных клостридий основана на их способности образовывать токсины. Приведем основные токсины патогенных клостридий.

Cl. perfringens состоит из 5 типов (А, В, С, D, E), которые отличаются между собой по основным летальным токсинам (Bergey, 1974). Типы *Cl. perfringens* отличаются друг от друга по синтезируемым ими водорастворимым антигенам (экзотоксинам) – альфа, бета, гамма, дельта, эpsilon, эта, тэта, йота, каппа, лямбда, мю, ню, которые вырабатываются разными штаммами в различных сочетаниях. Токсины альфа, бета, эpsilon, йота обладают выраженными летальными и некротическими свойствами, играющими основную роль в этиологии болезней, вызываемых *Cl. Perfringens*:

— α (альфа-токсин) – летальный, некротический, гемолитический, лецитиназа – вырабатывается у типа А; у типов В, С, D, E – вырабатывается отдельными штаммами;

— β (бета-токсин) – летальный, некротический – вырабатывается у типов В и С; у типов А, D, E – не вырабатывается;

— ϵ (эpsilon-токсин) – вырабатывается всеми штаммами типа В; является главным токсином у типа D; у типов А, С, E – не вырабатывается;

— ι (йота-токсин) – вырабатывается только у типа E; у остальных типов не вырабатывается.

При изучении сахаролитических свойств *Cl. perfringens*, более 90% штаммов сбраживают с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, галактозу, инозит, крахмал, сахарозу, а также глицерин, целлюлозу, гликоген, инулин, рафинозу, рибозу, салицин, трегалозу, но не сбраживают маннит и дульцит [21].

Cl. septicum в питательных средах и организме пораженных животных вырабатывает токсин, состоящий из нескольких (альфа, бета, дельта, гамма) компонентов. Основным является α -токсин. Он отличается от лецитиназы *Cl. perfringens* и обладает летальными, гемолитическими и некротическими свойствами; β - и δ -токсины являются гемолизинами, действующими на эритроциты; γ -токсин представляет собой фермент гиалуронидазу.

Биохимические свойства *Cl. septicum*: молоко свертывает, свернутую сыворотку не изменяет, на мозговой среде почернения не дает. Разлагает с выделением газа и кислоты глюкозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, маннозу и салицин. Не ферментирует сахарозу, глицерин и маннит. Отсутствие ферментации сахарозы используется при дифференциации от *Cl. Chauvoei* [22].

Морфология и физиология. Бактерии *C. septicum* – полиморфные палочки длиной 3,1–14,1 мкм и шириной 1,1–1,6 мкм; в культурах встречаются и длинные нитевидные клетки, имеют перитрихально расположенные жгутики, образуют овальной формы споры, расположенные в клетке субтерминально [23].

Строгий анаэроб, хорошо растет на пептоиных средах с добавлением сбраживаемого бактериями углевода. На плотных питательных средах образует блестящие полупрозрачные колонии с неровным краем. В столбике 2% агара

образуют колонии, по форме напоминающие чечевицу. На кровяном агаре отмечается небольшая зона гемолиза [24].

Обладает сахаролитической активностью, ферментирует глюкозу, лактозу, мальтозу, маннозу и некоторые другие углеводы с образованием кислот, газа и небольшого количества спиртов. Бактерии *C. septicum* разжижают желатин, не гидролизуют казеина, не переваривают коагулированную сыворотку и яичный белок, не образуют индола.

Антигены. *C. septicum* содержит O- и H-антигены, изучены они мало. На основании различия H-антигенов выявлено шесть серологических вариантов.

Токсинообразование и патогенность. *C. septicum* при выращивании на пептонном бульоне с глюкозой при pH 7,6–7,8 образуют токсины, к которым относят также и некоторые ферменты. Бактерии образуют а-токсин, являющийся основным летальным, некротическим и гемолитическим фактором микроорганизма. Среди токсинов обнаруживается разрушающийся под влиянием кислорода d-гемолизин. В антигенном отношении этот гемолизин сходен с O-стрептолизинем и O-токсином *C. perfringens*. Кроме этих токсинов, *C. septicum* образует дезоксирибонуклеазу (р-токсин), гиалуронидазу (у-токсин), фибринолизин и коллагеназу [25,26,27].

Cl. chauvoei образует очень слабый токсин, патогенен для белых мышей и морских свинок. Вирулентность *Cl. chauvoei* зависит от индивидуальных свойств штамма и восприимчивости животных. Наиболее чувствительны к парентеральному заражению морские свинки, затем крупный рогатый скот и овцы.

Биохимические свойства *Cl. chauvoei*: молоко не свертывается, свернутую сыворотку не разжижает, мозговая среда не чернеет. Ферментирует те же углеводы что и *Cl. septicum* и сахарозу. *Cl. chauvoei* ферментирует сахарозу и не разлагает салицин, в то время как *Cl. septicum* ферментирует салицин и не изменяет среду с сахарозой. *Cl. chauvoei* синтезирует протеазу, медленно разжижающую желатину; яичный белок не разжижает. Индол не образует, большинство штаммов продуцирует незначительное количество сероводорода, нитраты в нитриты не редуцирует. Ферменты каталазу и лецитиназу не вырабатывает.

При дифференциации *Cl. chauvoei* от бациллы антракса и *Cl. septicum* возбудителя сибирской язвы можно отличить по капсульности, росту в аэробных условиях, неподвижности в культурах. Кроме того, добавление в элективные для анаэробов среды стрептомицина подавляет рост бацилл сибирской язвы и не оказывает влияния на *Cl. chauvoei*.

Септический вибрион дифференцируют на основе морфологических и биохимических характеристик. В препаратах-отпечатках с серозных покровов печени морской свинки, павшей в результате экспериментального заражения, *Cl. chauvoei* имеет вид равномерно или зернисто окрашенных палочек, расположенных одиночно или парно, *Cl. septicum* формирует длинные нити. Для дифференциации культур клостридий применима также реакция

агглютинации, гомологичные сыворотки агглютинируют культуры в титре до 1:1000, гетерологичные – не более 1:100.

Основная дифференциальная реакция – реакция нейтрализации на морских свинках. Антитоксическая сыворотка *Cl. septicum* нейтрализует гомологичный и гетерологичный токсин, защищая животное от заражения септическим вибрионом и возбудителем эмфизематозного карбункула; антитоксическая сыворотка *Cl. chauvoei* защищает только от заражения гомологичной культурой [28,29,30].

Cl. novyi Вид *C. novyi* состоит из трех биоваров: А, В и С. Биовары различаются по ряду биологических свойств и по образуемым ими токсинам. В патологии человека имеют значение только микроорганизмы биоваров А и В.

Морфология и физиология. Все биовары *C. novyi* морфологически представляют собой крупные прямые или слегка изогнутые палочки длиной 10–22,5 мкм и шириной 0,8–2,5 мкм; наиболее крупные палочки у биоваров В и С. Обладают перитрихально расположенными жгутиками капсулы не образуют. Грамположительны, при старении культуры клетки могут быть грамотрицательными. У бактерий через несколько дней роста образуются споры. Споры овальной формы, располагаются субтерминально, размеры их несколько больше ширины тела клетки. *C. novyi* является строгим анаэробом, все биовары очень чувствительны к кислороду. Культивируют бактерии в анаэротатах в условиях полного удаления кислорода, на питательных средах, содержащих гидролизат казеина, или мясо-пептонных средах с добавлением углеводов; используют и другие среды. На питательном агаре через 48 ч образуются круглые полупрозрачные, сочные, иногда со слегка зернистой поверхностью и неровным краем колонии. В столбике глюкозного агара образуются колонии, напоминающие комочки ваты, снежные хлопья. На агаре с добавлением эритроцитов лошади бактерии биоваров А и В образуют зону гемолиза. Оптимальная температура роста 37–45°C, pH 7,8–8,0.

Ферментативно бактерии *C. novyi* менее активны, чем бактерии *C. perfringens*. Они сбраживают только несколько углеводов (глюкозу, мальтозу и др.) с образованием ряда кислот, спиртов и газа, разжижают желатин, не образуют сероводорода и уреазы [30].

Антигены. Бактериальные, клетки биоваров *C. novyi* обладают О- и Н-антигенами. О-антиген общий для всех биоваров, на основании различия Н-антигенов выявлено наличие нескольких серогрупп.

Токсинообразование и патогенность. В патологии человека из биоваров *C. novyi* имеют значение только бактерии биоваров А и В в связи с их способностью образовывать токсины и некоторые ферменты [30,31].

C. novyi – возбудители анаэробной инфекции человека, образуют несколько типов токсинов. Бактерии биовара А образуют а-, g-, d-и e -токсин, бактерии биовара В– а-, b-, V,-и h-токсины). Альфа-токсин А и В типов имеет решающее значение в патогенезе болезней, вызываемых *Cl. novyi*. α-токсин обоих типов идентичен, но отличается от α-токсина *Cl. perfringens*. Это сильный капиллярный яд, который нарушает проницаемость стенок сосудов и

обуславлюет развитие желатинозного отека желтовато-розового цвета; β - и γ -токсины обладают лецитиназным, гемолитическим, летальным и некротическим действиями. По своей природе они соответствуют α -токсину *Cl. perfringens*, но в антигенном отношении все три отличаются между собой [32].

Резистентность. Бактериальные клетки очень чувствительны к кислороду и быстро погибают в аэробных условиях. Споры *C. novyi* довольно устойчивы к различным факторам внешней среды, они переносят кипячение в течение 1–2 ч.

По ферментативным свойствам *Cl. novyi* менее активен чем *Cl. perfringens*: ферментирует глюкозу, инозит и мальтозу, иногда маннозу, рибозу. Оптимальная температура роста для типа А составляет 40–45°C, для типа В – 37°C, для типа С – 45°C [33].

Cl. tetani вырабатывает сильный токсин, который состоит из 2 компонентов: тетаноспазмина и тетаногемолизина. Тетаноспазмин является главным летальным фактором, который действует на нервную систему животных и человека, вызывает тоническое сокращение поперечнополосатых мышц, характерное для столбняка.

Cl. tetani углеводов не расщепляет, обладает слабыми протеолитическими свойствами (молоко очень слабо подвергается свертыванию или пептонизации). Морфологически (микроскопированием окрашенных мазков) *Cl. tetani* не узнать невозможно – это грамположительные тоненькие палочки, у которых сферические споры располагаются на конце палочки (барабанная палочка) [34].

Cl. botulinum в антигенном отношении имеет 7 типов (А, В, С, D, Е, F, G). Все они отличаются между собой по антигенным свойствам вырабатываемых ими токсинов и некоторыми другими признаками. Токсины *Cl. botulinum* состоят из нескольких токсических факторов: нейротоксина, гемолизина, гемолизиномагглютинина, липазы, протеазы. Из них основным токсином для всех типов возбудителя, который имеет решающее значение в интоксикации организма, является нейротоксин. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта не разрушают токсины типа А, В, С, D, Е, F, G и усиливают активность токсина типа Е. Усиление токсина типа Е под действием протеолитических ферментов объясняется тем, что он в основном вырабатывается микробной клеткой в виде прототоксина. Многие штаммы типа А, В, F также могут вырабатывать прототоксины. Существует мнение, что бактерии всех типов образуют токсины в виде прототоксинов, которые активизируются эндогенными у протеолитических штаммов или экзогенными протеазами [35,36].

Сахаролитические свойства типов *Cl. botulinum* очень переменчивы, а тип G совсем не обладает способностью сбраживать углеводы. Некоторые штаммы возбудителя ботулизма обладают протеолитическими свойствами, у некоторых – они менее выражены, некоторые совсем не обладают этими свойствами. Единственным критерием, позволяющим идентифицировать типы *Cl. botulinum*, является антигенная структура образуемых ими токсинов, которая определяется в реакции нейтрализации с типоспецифическими антитоксическими сыворотками. Морфологически в окрашенных мазках *Cl.*

botulinum дифференцировать нетрудно: грамположительная палочка, образует споры овальной формы, расположенные в основном субтерминально, поэтому они похожи на теннисную ракетку или на пламя свечи; иногда споры располагаются центрально или терминально [37,38].

Cl. histolyticum – факультативный анаэроб, но при скудном росте в аэробных условиях спорообразование не наблюдается. *Cl. histolyticum* морфологически представляет собой небольшие палочки длиной 1,6–3,1 мкм и шириной 0,6–1 мкм. Палочки имеют жгутики, перитрихи. Образуют овальной формы споры, расположенные в клетке субтерминально. Факультативные анаэробы. На кровяном агаре при культивировании в анаэробных условиях через 24-48 ч образуются небольшие полусферические прозрачные, блестящие, с ровным краем колонии, вокруг колонии наблюдается небольшая зона гемолиза. *C. histolyticum* не ферментирует углеводов, но обладает ярко выраженными протеолитическими свойствами, разжижает желатин, гидролизует казеин. Кусочки мяса, помещённые в жидкую питательную среду, в которой выращиваются бактерии, подвергаются быстрому лизису, при этом в большом количестве – образуется сероводород [40].

В жидких мясных и казеиновых питательных средах продуцирует несколько растворимых антигенов. Основным является α -токсин, который обладает летальным и некротическим действием. Его поражающее действие связано с цитопатогенным действием. Также вырабатывает β -токсин, который представляет собой фермент коллагеназу, обладающую летальными и некротизирующими свойствами. Из известных бактериальных коллагеназ эта является наиболее активным ферментом, обладающим высокой специфичностью. Он разрушает нативный и денатурированный коллаген и желатину. Кроме коллагеназы этот микроорганизм вырабатывает и протеиназы 2 видов, гемолизин, дезоксирибонуклеазу и другие антигенные компоненты, среди которых преобладающими являются протеолитические ферменты, приводящие к лизису тканей. Причем протеолитические свойства резко выражены: разлагает желатину, свернутую сыворотку, яичный белок, коллаген, кусочки ткани и т.д. Переваривание белка происходит настолько глубоко, что в среде образуются отдельные аминокислоты. Молоко пептонизируется, мозговая среда чернеет. Сахаролитическими свойствами *Cl. histolyticum* не обладает [41].

Cl. haemolyticum продуцирует токсин, состоящий из 3 компонентов, основным является бета-токсин. Он обладает летальным, гемолитическим и лецитиназным эффектом, а также имеет протеолитический фермент (тропомеозиназу) и γ -токсин, вызывающий опалесценцию растворов куриного желтка. В антигенном отношении указанные токсины (ферменты) не отличаются от растворимых антигенов *Cl. novyi*, поэтому *Cl. haemolyticum* считается как тип D *Cl. novyi*.

У *Cl. haemolyticum* слабые протеолитические свойства (медленно разжижает желатину, молоко медленно свертывается или не изменяется), очень

слабые сахаролитические свойства: все штаммы разлагают только глюкозу и фруктозу [42,43].

Cl. sordellii – факультативный анаэроб, обладает сильными протеолитическими свойствами (молоко медленно пептонизируется; яичный белок, желатина, свернутая сыворотка разжижаются; мозговая среда не чернеет). Сахаролитические свойства: разлагает глюкозу, мальтозу, иногда арабинозу, фруктозу, глицерин, рафинозу, салицин, ксилозу. Вырабатывает индол, сероводород. Образует сильную уреазу, по этому признаку его отличают от *Cl. bifermentans*, очень сходного с ним по морфологическим свойствам [44].

Вирулентные штаммы *Cl. sordellii* вырабатывают специфический токсин, сходный по своим свойствам с токсином *Cl. novyi*, но нейтрализующийся только специфической сывороткой антисорделлии. Токсин обладает летальным и некротическим действием. Кроме того, он продуцирует лецитиназу, гиалуронидазу, желатиназу и коллагеназу [45].

В настоящее время разработаны общие меры борьбы и специфические препараты для профилактики клостридиозов. Профилактику против клостридиозов осуществляют путем использования специфических моно- и поливакцин, а также анатоксинов и антитоксинов. Однако специфические мероприятия нуждаются в усовершенствовании. Необходимо усилить исследования в области биохимии клостридиальных микроорганизмов, очистки антигенов, создания более совершенных диагностических препаратов, вакцин и сывороток [47].

В Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ», Россия) была разработана вакцина против эмфизематозного карбункула, злокачественного отека и пастереллеза крупного рогатого скота (Ф.И. Каган и др., 1958). А.Н. Бурдов (1962) изготовил ассоциированную вакцину против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула путем смешения деформализированной вакцины против эмфизематозного карбункула с живой сибиреязвенной гидроокисьалюминиевой вакциной [48].

Когда имеется угроза инфицирования травматических повреждений возбудителями злокачественного отека, рекомендуется пассивная иммунопрофилактика поливалентной антитоксической сывороткой, а также применение антибиотиков широкого спектра и пролонгированного действия. Для профилактики браздота овец используют концентрированную поливалентную гидроокисьалюминиевую вакцину против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят. При вакцинации убитой формалином цельной культурой *Cl. oedematiens* типа В достигается достаточно напряженный иммунитет против инфекционного некротического гепатита овец. Добавление к вакцине адьювантов увеличивает эффективность вакцинации. Гипериммунизация животных позволяет получать у продуцентов гипериммунную антитоксическую сыворотку против данной болезни [49,50].

Учеными ФГБУ «ВГНКИ» (В.И. Каган, Л.В. Кириллов, К.Р. Ургуев, 1975) был получен поливалентный анатоксин для специфической профилактики инфекционной энтеротоксемии, браздота, злокачественного отека, некротического гепатита овец и дизентерии ягнят (рисунок 2).



Рисунок 2 – Вакцины против основных клостридиозов

Для изготовления столбнячного анатоксина используют высокотоксичный и иммуногенный штамм *C. tetani* и благоприятную для токсинообразования питательную среду. Специфическая профилактика ботулизма людей и животных основана на создании антитоксического иммунитета, обеспечивающего невосприимчивость к ботулинической интоксикации. Анатоксины преципитируются квасцами и сорбируются на гидрате окиси алюминия [51].

Естественной средой обитания клостридий, в том числе и патогенных, является кишечник животных (особенно травоядных), а также человека, где они живут и размножаются, не вызывая заболевания. Попадая с испражнениями во внешнюю среду, в первую очередь в почву, они могут длительно сохраняться в виде спор, а при благоприятных условиях - даже размножаться [52].

1.3 Характеристика наиболее опасных возбудителей клостридиозов

1.3.1 Клостридиоз перфрингенс (A05.2) - острое инфекционное заболевание с энтеральным путем заражения, клинически проявляющееся инфекционным токсикозом и синдромом гастроэнтерита или энтероколита, реже - некротическим энтеритом или сепсисом.

Этиология Клостридии перфрингенс долгое время считались возбудителем только газовой гангрены. В середине XX века была установлена роль этих микроорганизмов в возникновении пищевых токсикоинфекций при энтеральном пути инфицирования.

Клостридии перфрингенс - короткие полиморфные палочки, без жгутиков, способны к образованию субтерминально расположенных спор, грамположительные, строгие анаэробы. Хорошо растут на жидких мясных или казеиновых средах, вызывая равномерное помутнение среды и обильное

газообразование. По способности вырабатывать экзотоксины и ферменты их разделяют на 6 типов - А, В, С, D, Е, F. Тип А вырабатывает энтеротоксины, а также в большом количестве - лецитиназу С, которая обладает летальными, некротическими и гемолитическими свойствами и играет основную роль в патогенезе газовой гангрены. В меньшем количестве тип А вырабатывает гемолизин, коллагеназу и гиалуронидазу. Типы В и С вырабатывают летальный, некротический и гемолитический токсины, коллагеназу. Тип D вырабатывает некротический протоксин, который активируется протеолитическими ферментами желудочно-кишечного тракта и переходит в токсин. Все типы клостридии перфрингенс вырабатывают дезоксирибонуклеазу [52,53,54].

Наиболее часто кишечный клостридиоз у детей вызывают клостридии перфрингенс типа А, реже - типов С и F. Роль клостридии перфрингенс типов В, D и Е в патологии людей изучена недостаточно, а у животных они имеют широкое распространение и вызывают тяжелые энтеротоксемии [55].

Эпидемиология Пищевые токсикоинфекции, обусловленные клостридиями перфрингенс типа А, регистрируются во многих странах мира, занимая 2-е место после сальмонеллеза в Великобритании и 3-е место после сальмонеллеза и стафилококкового энтероколита в США. В нашей стране кишечный клостридиоз перфрингенс типа А в общей структуре острых кишечных инфекций установленной бактериальной этиологии у детей составляет около 25% и занимает 3-е место после шигеллеза и кишечной инфекции стафилококковой этиологии [56].

Кишечный клостридиоз перфрингенс встречается в виде как спорадических заболеваний, так и эпидемических вспышек. Болеют преимущественно дети старших возрастных групп. Источником инфекции являются человек и животные. Заражение происходит алиментарным путем. Дети раннего возраста обычно заболевают при употреблении инфицированного молока (в том числе и донорского), творога и молочных смесей, дети старшего возраста - мясных и рыбных продуктов. В большинстве случаев источником инфицирования ребенка становятся колбасные изделия [57].

Минимальная инфицирующая доза для клостридиоза перфрингенс типа А - 10^6 - 10^9 микробных клеток в 1 г продукта. Накопление такого количества возбудителя может произойти только при грубых нарушениях технологии приготовления и особенно хранения пищевых продуктов. Возникновению заболевания способствуют ранний возраст, ослабление иммунореактивности и применение антибиотиков широкого спектра действия, особенно энтеральных аминогликозидов, которые, подавляя эндогенную микрофлору кишечника, создают условия для быстрой вегетации клостридии перфрингенс [58].

Кишечный клостридиоз перфрингенс не имеет выраженной сезонности, но все же несколько чаще встречается летом, реже - зимой в виде групповых или семейных вспышек.

Патогенез Входными воротами инфекции является желудочно-кишечный тракт. С инфицированной пищей клостридии попадают в желудок, затем в

тонкую кишку, где и происходит их интенсивное размножение. В процессе колонизации кишечника и взаимодействия микроорганизмов с энтероцитами развивается местный воспалительный процесс. Подобно сальмонеллам клостридии перфрингенс способны проникать через эпителий кишечника в подлежащую ткань и в кровь, вызывая тяжелые септические формы заболевания. Однако ведущий клинический симптомокомплекс определяется в основном способностью клостридии перфрингенс вырабатывать в процессе споруляции экзоэнтеротоксины с выраженными цитолитическими и некротическими свойствами [59,60].

Экзотоксины клостридии перфрингенс с капилляротоксическим, некротическим и гемолитическим свойствами вызывают функциональные и морфологические изменения не только в кишечнике, но и во многих органах и системах, в том числе и в ЦНС. Энтеротоксемия проявляется симптомами интоксикации вплоть до развития токсикоза (гипертермия, судорожный синдром и др.) и эксикоза с характерными клиническими признаками. Местный воспалительный процесс в кишечнике лежит в основе диарейного синдрома [60].

Патоморфология У умерших от кишечного клостридиоза перфрингенс типа А наибольшие морфологические изменения обнаруживаются в тонкой, реже - в толстой кишке: слизистая оболочка отечная, гиперемированная, с множественными кровоизлияниями, стазами, реже некрозами. Развитие выраженного некротического энтерита (или энтероколита) с глубокими некрозами, реже с язвами и даже прободением кишечника наблюдается при инфицировании клостридиями перфрингенс типа С. При кишечном клостридиозе перфрингенс определяются множественные кровоизлияния, явления дистрофии и некробиоза во внутренних органах (печени, легких, почках и др.) [61].

Клинические проявления Инкубационный период короткий - 6- 24 ч. Заболевание начинается остро, с болей в животе, рвоты, симптомов интоксикации (вялость, беспокойство, снижение аппетита), нередко - с повышения температуры тела до 38-39 °С и дисфункции желудочнокишечного тракта. Стул с 1-го дня болезни становится жидким, частым, энтеритным или энтероколитным. Заболевание имеет относительно легкое течение с выздоровлением на 3-4-й день болезни [62].

Тяжелые формы кишечного клостридиоза перфрингенс, протекающие по типу некротического энтерита или энтероколита, чаще всего обусловлены клостридиями перфрингенс типа С. Эти формы заболевания обычно развиваются у ослабленных детей с длительными дисфункциями желудочнокишечного тракта, леченных антибиотиками широкого спектра действия, а также у детей с кишечным дисбактериозом. Заболевание начинается как острый гастроэнтерит: с болей в животе, частой рвоты с примесью крови и обильного водянистого, иногда пенистого стула до 15-20 раз в сутки и более. Нередко в стуле имеется примесь слизи и крови. Дети жалуются на общую слабость, разбитость, головокружение, схваткообразные или постоянные боли в животе.

Быстро присоединяются явления обезвоживания организма, снижается артериальное давление (коллапс), увеличиваются печень и селезенка, отмечается резкое вздутие живота (парез кишечника). При прогрессировании болезни может наступить смерть от нарушения сердечно-сосудистой деятельности. У детей раннего возраста, ослабленных, с неблагоприятным преморбидным фоном не исключена генерализация инфекции с развитием сепсиса [63,64].

Диагностика Кишечный клостридиоз перфрингенс диагностируется на основании совокупных клинико-лабораторных и эпидемиологических данных. Заболеванию особенно свойственны острое начало и бурное развитие симптомов (рвота, диарея, повышение температуры тела, проявления интоксикации или нейротоксикоза и др.) с максимальной выраженностью в 1-2-е сутки от начала болезни и быстрой обратной динамикой. Поскольку клинические проявления болезни не строго специфичны, решающее значение имеет лабораторная диагностика: обнаружение энтеротоксина в фекалиях экспресс-методами - РНГА и ИФА - и определение энтеротоксигенности у выделенных штаммов клостридий.

Гематологические изменения у больных с кишечным клостридиозом перфрингенс проявляются умеренным лейкоцитозом с палочкоядерным сдвигом [65,66,67].

1.3.2 Клостридиоз диффициле (A04.7) - острое инфекционное заболевание с энтеральным путем заражения, вызываемое антибиотикоиндуцированными штаммами клостридий диффициле, клинически проявляющееся выраженными симптомами инфекционного токсикоза, диарейным синдромом с развитием псевдомембранозного колита [68].

Этиология Клостридии диффициле - строгие анаэробы, представляют собой длинные грамположительные палочки, образуют овальные субтерминально расположенные споры, синтезируют 2 экзотоксина, причастных к развитию диарейного синдрома: энтеротоксин А и цитотоксин В. Оба токсина обладают цитотоксической активностью, кислото- и термолабильны, инактивируются трипсином и химотрипсином, но различаются по биологическим и антигенным свойствам. В-токсин оказывает ярко выраженное цитотоксическое, а А-токсин - энтеротоксигенное действие. Роль каждого токсина в патогенезе заболевания до настоящего времени окончательно не изучена.

В споровой форме клостридии диффициле довольно устойчивы во внешней среде и сохраняются до 110-180 дней, а в кишечнике человека могут выживать даже при высоких концентрациях антибиотиков (ампициллина, клиндамицина, цефалоспоринов и др.) [69,70].

Эпидемиология Клостридии диффициле являются основными возбудителями псевдомембранозных колитов, которые у детей раннего возраста и новорожденных сопровождаются высокой летальностью (до 50%). Кроме того, клостридии диффициле часто становятся причиной развития

других колитов и энтероколитов, возникающих в результате нерациональной антибиотикотерапии.

Источником инфекции является человек - больной или носитель. Передача возбудителя осуществляется исключительно контактным путем через предметы окружающей среды (посуда, постельные принадлежности, игрушки, руки обслуживающего персонала и др.). Возможность пищевого пути передачи не установлена. Заболевание имеет нозокомиальный характер с тенденцией к эпидемическому распространению в госпитальных условиях.

Клостридии диффициле относительно часто встречаются в природе. Их обнаруживают в почве, воде, испражнениях домашних животных. В кишечнике детей старшего возраста и взрослых людей частота обнаружения этих бактерий колеблется от 2 до 10%, а дети 1-го года жизни, особенно 1-го полугодия, имеют повышенный риск в отношении кишечного клостридиоза диффициле [71].

Патогенез Заболевание развивается почти исключительно на фоне или после применения антибиотиков широкого спектра действия, особенно таких, как ампициллин, цефамизин, клиндамицин, линкомицин, широко используемых в педиатрической практике для лечения пневмоний, менингитов, синегнойного сепсиса и др [72].

Антибиотики, подавляя нормальную флору кишечника, способствуют его колонизации клостридиями диффициле, их размножению и токсинообразованию. Ряд антибиотиков стимулируют энтеротоксинообразование у бактерий. Кроме того, нормальная кишечная флора людей и животных продуцирует бета-лактамазу - фермент, разрушающий беталактамное кольцо бета-лактамов (ампициллин и др.), чем инактивируется действие антибиотика в кишечнике [28.73].

Таким образом, патогенез заболевания можно представить следующим образом. На фоне антибиотикотерапии различных заболеваний клостридии диффициле могут выживать, находясь в споровой форме или приобретая резистентность к данному антибиотику. Кроме того, росту и размножению бактерий способствуют низкие концентрации антибиотика в кишечнике в результате адсорбции препарата или разрушения его бета-лактамазой (в случае применения бета-лактамов). После отмены антибиотика при сниженной колонизационной резистентности кишечника (дисбактериоз) происходят бурное размножение клостридий диффициле и усиленное выделение ими экзотоксинов. Заболевание может возникать не только как антибиотикоиндуцированная эндогенная инфекция, но и как результат экзогенного инфицирования на фоне или сразу же после отмены антибиотика. В этих случаях болезнь развивается или непосредственно после отмены антибиотика, или спустя 1-2 нед после прекращения лечения. В ряде случаев псевдомембранозные колиты и некротические энтероколиты, обусловленные клостридиями диффициле, могут возникать спустя 1-2 мес после окончания антибиотикотерапии и принимать затяжное или хроническое течение.

Патоморфология При сигмоскопии, колоноскопии, а также при ректальной биопсии отмечают гиперемию и отечность слизистой оболочки кишечника, на поверхности которой обнаруживаются характерные фибринозные бляшки желтовато-белого цвета диаметром от 2 мм до 2 см, которые, сливаясь между собой, образуют так называемую псевдомембрану. В ряде случаев гистоморфологические изменения развиваются по типу фолликулярно-язвенных, язвенно-геморрагических и некротических энтероколитов [79].

Клинические проявления Кишечный клостридиоз диффициле клинически чаще всего протекает по типу псевдомембранозного колита, реже - некротического энтероколита или диарейного синдрома. Псевдомембранозному колиту более подвержены дети раннего возраста и новорожденные [80].

Псевдомембранозный колит развивается в среднем на 7-10-й день от начала антибиотикотерапии. Заболевание начинается остро, с подъема температуры тела, появления срыгиваний или повторной рвоты, болей в животе и диарейного синдрома. Дети отказываются от приема пищи, отмечаются вздутие живота, падение массы тела.

Кожные покровы становятся бледно-серыми, нередко обозначается сеть застойных вен на коже живота. Стул жидкий, водянистый, с примесью слизи и нередко крови. Иногда большая часть испражнений состоит из густой белесоватой слизи и обрывков фибринозных наложений. В других случаях стул гнойный и имеет примесь крови. В ряде случаев развивается кишечное кровотечение с высокой летальностью.

Течение болезни у новорожденных и особенно у недоношенных детей более тяжелое, с профузным поносом, обезвоживанием, расстройством периферического кровообращения (*холероподобный вариант*) или с расстройством кровообращения по типу коллапса без диареи (*гипертоксический вариант*).

При изъязвлении пораженных участков слизистой оболочки кишечника возможны перфорация кишечника и развитие калового перитонита. Состояние детей при этом тяжелое, кожные покровы серые, резко выражен парез кишечника, дыхание поверхностное, частое, черты лица заострены, отмечаются гиподинамия и гипорефлексия. Может развиваться отечность гениталий. При отсутствии адекватного лечения нередко наступает летальный исход [81].

Кроме тяжелых псевдомембранозных колитов, некротических энтероколитов, кишечного сепсиса, клостридии диффициле могут вызывать более легкие заболевания желудочно-кишечного тракта по типу энтеритов и энтероколитов без каких-либо специфических особенностей.

Диагностика Кишечный клостридиоз диффициле диагностируется по антибиотикотерапии в анамнезе, а также на основе соответствующих клинических и инструментальных данных, комплекса лабораторных исследований, направленных на обнаружение в кишечном содержимом специфических токсинов (энтеро- и цитотоксина) и возбудителя.

Для селективного выделения клостридий диффициле используют циклосерин-цефокситин-фруктозный агар. Токсины в испражнениях больных выявляют в цитотоксическом тесте на культурах клеток с использованием в РН коммерческих клостридиальных сывороток. Однако цитотоксический тест указывает лишь на присутствие цитотоксина в исследуемом материале и не выявляет энтеротоксин, играющий существенную роль в патогенезе заболевания. В последние годы для диагностики энтероклостридиоза диффициле используют высокочувствительные ИФА и РЛА.

Обнаружение клостридии диффициле и их токсинов в исследуемом биоматериале не является абсолютным доказательством этиологии диарейного синдрома (как и при клостридиозе перфрингенс), так как эти микроорганизмы и их токсины выявляются и у здоровых людей, в первую очередь у новорожденных и детей первого полугодия жизни. Это может быть обусловлено отсутствием в кишечнике таких детей рецепторов для токсинов клостридии, факторами резистентности слизистой кишечника, а также присутствием материнских антител [82,83].

1.3.3 Клостридиоз сорделли Бактерии вида *C. sordellii* - грамположительные прямые палочки длиной 3,1–4,5 мкм и шириной 1,1–1,6, имеют перитрихально расположенные жгутики. При росте на обычных питательных средах образуют овальной формы споры, которые в клетке могут располагаться центрально или субтерминально.

Анаэробы, но могут развиваться и в аэробных условиях. На плотных питательных средах образуют слабовыпуклые серовато-белые колонии с неровными краями. На агаре с добавлением эритроцитов лошади вокруг колоний наблюдается небольшая зона гемолиза. Хорошо растут в мясном бульоне, часто образуя слизь [41, 78].

Ферментируют некоторое количество углеводов: глюкозы, мальтозы и др. Обладают протеолитической активностью, разжижают желатин и свернутую сыворотку, гидролизуют казеин, образуют индол.

Вирулентные штаммы *C. sordellii* образуют токсины и протеолитические ферменты также гиалуронидазу и фибринолизин.

Экология Естественной средой обитания спорообразующих анаэробных бактерий, в том числе и возбудителей анаэробной инфекции, является кишечник животных, особенно травоядных и свиней. Некоторые анаэробы выделяются и из кишечника человека. С фекалиями клостридии попадают в почву, где их споры могут длительное время сохраняться. Патогенные клостридии могут быть обнаружены на коже и одежде человека. Количество клостридии, обнаруженных на коже человека, зависит от санитарно-гигиенических условий, в которых живет и работает человек.

В организм человека патогенные клостридии попадают либо при ранении, либо с пищей, в последнем случае может возникнуть токсикоинфекция [84].

Патогенез. В развитии болезни играет роль ряд факторов и в первую очередь характер раны, иммунологическое состояние организма и интенсивность микробного загрязнения. В патогенезе анаэробной инфекции

большую роль играет вторичная инфекция, возбудителями которой являются как анаэробные непатогенные клостридии, так и факультативные анаэробы и аэробы. Образованные клостридиями токсины и ферменты приводят к морфологическим изменениям соединительной ткани и мышечных волокон, а также к тяжелой общей интоксикации организма. При анаэробной инфекции наблюдаются воспалительные и дегенеративно-некротические изменения внутренних органов, иногда развивается анаэробный сепсис.

Обычно различают две основные клинические формы анаэробной инфекции – эмфизематозную (газовая гангрена) и отечную (злокачественный отек). Эмфизематозная форма анаэробной инфекции характеризуется обильным газообразованием вокруг раны. При этой форме чаще обнаруживается *C. perfringens*. При отечной форме отек преобладает над эмфиземой. В этом случае чаще обнаруживается *C. Novyi* [85].

Иммунитет. Имеются наблюдения, указывающие, что перенесенная инфекция не создает прочного иммунитета. При активной иммунизации анатоксинами или при введении антитоксической сыворотки создается невосприимчивость к анаэробной инфекции.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследования являются кусочки измененной ткани, полученные во время первичной операции, экссудат и кровь. Лабораторная диагностика состоит из нескольких этапов: проходят бактериоскопическое и бактериологическое исследования, ставят биологическую пробу на лабораторных животных с целью вызвать у них анаэробную инфекцию либо определить наличие токсина в исследуемом материале. Полученную чистую культуру идентифицируют по биологическим свойствам. Для определения вида возбудителя обязательным является изучение образуемого им токсина в реакции нейтрализации с диагностическими антитоксическими сыворотками [14,56].

Профилактика и лечение. Эффективным средством в профилактике анаэробной инфекции является полноценная и своевременная хирургическая первичная обработка раны. Специфическая профилактика осуществляется введением антитоксической сыворотки. Профилактическая доза составляет 30 000 МЕ (по 10 000 МЕ сывороток против *C. perfringens*, *C. novyi* и *C.septicum*). Сыворотку вводят внутримышечно в возможно более короткие сроки после ранения.

В качестве специфического метода лечения применяется антитоксическая сыворотка в дозе 150 000 МЕ (по 50 000 МЕ тех же сывороток, что и при профилактике). После идентификации возбудителя вводят сыворотку против данного вида. При лечении используют также антибиотики (пенициллин, канамицин и др.) к сульфаниламидные препараты [86].

1.3.4 Ботулизм - острое инфекционное заболевание с преимущественным поражением центральной и вегетативной нервной системы по типу вялых параличей. Сначала поражается бульбарная мускулатура, а затем и соматическая мускулатура (нисходящий паралич). По МКБ-10 ботулизм

обозначается как классическое пищевое отравление, вызванное *Clostridium botulinum* (A05.1)

Этиология Известно 7 типов возбудителей ботулизма, обозначаемых буквами А, В, С, D, Е, F, G. Морфологически палочки ботулизма не различаются, имеют длину 4-8 мкм и ширину 0,6-0,8 мкм, подвижны, образуют споры, располагающуюся на конце, вследствие чего микроорганизм принимает форму теннисной ракетки. По Граму молодые клетки окрашиваются положительно, старые - отрицательно. Возбудитель ботулизма - строгий анаэроб и растет без доступа воздуха на кровяном агаре, мясо-пептонном бульоне с кусочками печени или мясного фарша, хорошо размножается в пищевых продуктах, где и накапливается экзотоксин. Ботулинический экзотоксин - самый сильный в природе бактериальный токсин, 1 мг очищенного токсина составляет до 100 млн летальных доз для белой мыши. Смертельная доза для человека 0,005 мг. Ботулинический токсин термолабилен. При нагревании до 80 °С он разрушается в течение 30 мин. В желудочно-кишечном тракте человека под влиянием пищеварительных соков токсин не разрушается; напротив, его действие может усилиться в десятки и сотни раз. На территории нашей страны встречаются возбудители ботулизма типов А, В, С, Е, обнаруженные в воде, почве, кишечнике рыб, у больных животных и человека. Для человека патогенны токсины типов А, В, С и Е. Токсины D патогенны только для животных [3,71].

Эпидемиология Основным источником инфекции являются животные, преимущественно травоядные (коровы, козы, лошади и др.), в кишечнике которых *Clostridium botulinus* накапливаются в огромных количествах. Попадая в окружающую среду, они превращаются в споры и могут сохраняться в таком виде многие годы. Обсеменение почвы может быть весьма значительным, особенно в местах выгула скота, на пастбищах, в стойлах и др. Из почвы споры могут попадать на продукты питания, где при возникновении анаэробных условий они прорастают и выделяют токсин. Причиной отравления человека могут стать любые продукты, содержащие свободный токсин и живые микроорганизмы. Чаще отравление происходит при употреблении консервов домашнего приготовления: маринованных грибов, баклажанной икры, тыквенного сока, рыбы домашнего копчения, свиной колбасы и др [83].

Инфекция от человека человеку не передается. Восприимчивость не установлена. Человек высокочувствителен к ботулиническому токсину.

Патогенез Заболевание возникает в результате попадания ботулинического токсина в желудочно-кишечный тракт. В редких случаях возможно развитие болезни в результате попадания микроорганизмов в обширные раны (раневого ботулизм) или через дыхательные пути (при распылении токсина в воздухе). Человек заболевает даже тогда, когда разжевывает инфицированную пищу, но не проглатывает ее.

Всасывание токсина происходит почти исключительно в желудке и частично в верхних отделах тонкой кишки. Ботулинический токсин, являясь сильным сосудистым ядом, вызывает резкий спазм сосудов, что клинически

проявляется бледностью кожных покровов, нарушением зрения, головокружением, неприятными ощущениями в области сердца. С током крови токсин попадает во все органы и ткани и вызывает их поражение. Наиболее чувствительна к ботулиническому токсину нервная ткань. Поражаются главным образом мотонейроны спинного и продолговатого мозга, вследствие чего возникают паралитический синдром и бульбарные расстройства (нарушение глотания, речи).

В патогенезе заболевания имеет значение и инфекционный фактор при проникновении возбудителя из кишечника в органы и ткани, где он, размножаясь, выделяет токсин. Такой механизм развития болезни возможен в результате употребления пищи, содержащей малые дозы токсина, но сильно обсемененной спорами. В этих случаях инкубационный период продолжительный. Следовательно, с патогенетической точки зрения ботулизм можно рассматривать как пищевую токсикоинфекцию [84].

Клиническая картина Инкубационный период длится от нескольких часов до 10 сут, чаще составляет 5-24 ч. Его продолжительность зависит от дозы токсина, присутствия живых микроорганизмов в пище и восприимчивости, которая определяется состоянием желудочно-кишечного тракта, общей реактивностью и др.

При инфицировании высокой дозой ботулинического токсина инкубационный период составляет 2-10 ч. В этих случаях заболевание протекает особенно тяжело. Первыми симптомами болезни часто бывают бульбарные расстройства и нарушение зрения. Больные жалуются на «сетку», «мелькание», «туман» перед глазами, двоение предметов, затруднения при чтении. Зрачки резко и стойко расширены со слабой реакцией на свет или полным ее отсутствием. Относительно быстро обнаруживаются птоз век, нистагм, анизокория. Наряду с глазными симптомами отмечаются нарушение акта глотания, поперхивание, осиплость голоса, речь становится невнятной, язык малоподвижным, слова растянуты, иногда наступает афония. Больных беспокоят жажда, сухость во рту. При осмотре слизистые оболочки полости рта сухие, мягкое небо свисает, глоточный рефлекс понижен или отсутствует.

При прогрессировании болезни возникают расстройства дыхания. Больные ощущают недостаток воздуха, появляются паузы во время разговора, чувство сдавления или сжатия в груди, дыхание становится поверхностным, прерывистым, нарастает цианоз. Возможен паралич дыхательной мускулатуры с остановкой дыхания и смертью.

При попадании в желудочно-кишечный тракт небольшого количества токсина на первый план могут выступать диспепсические проявления. В этих случаях инкубационный период бывает более продолжительным - от 2 до 10 дней и более. Болезнь начинается с тошноты, рвоты, иногда появляются схваткообразные боли в животе, метеоризм, послабление стула без патологических примесей в каловых массах, но возможен и запор. Больной отмечает сухость слизистых оболочек полости рта, испытывает сильную жажду, общую слабость, головную боль, головокружение, беспокойство.

Температура тела часто остается нормальной или субфебрильной, редко повышается до 38-39 °С в течение только 1-2 дней от начала болезни. Диспепсические расстройства у таких больных отмечаются также лишь в первые 1-2 дня болезни. Вслед за ними появляются специфические для ботулизма симптомы, связанные с поражением ЦНС (расстройство зрения, глотания, дыхания и др.).

При ботулизме поражаются все органы и системы. Миастения проявляется резкой слабостью, повышенной утомляемостью. Часто ребенок не может стоять, не держит голову, падает. Мышцы бывают мягкими, тестоватыми. В крови обнаруживают умеренный лейкоцитоз с нейтрофилезом и палочкоядерным сдвигом, СОЭ незначительно увеличена.

Течение болезни зависит от тяжести поражения нервной системы. При тяжелых формах прогрессирует дыхательная недостаточность в связи с распространенными парезами дыхательной мускулатуры и параличом диафрагмы, что и становится основной причиной смерти. В случаях с благоприятным исходом восстановительный период затягивается до 3-5 мес. Длительно сохраняются общая слабость, повышенная утомляемость, боли в области сердца, сердцебиения при физических нагрузках. Описаны рецидивы болезни. Наряду с клинически выраженными формами встречаются стертые, легчайшие формы без признаков поражения ЦНС или с быстропреходящими расстройствами зрения и глотания, но не дыхания [84].

Диагностика Ботулизм диагностируют на основании нарушений зрения, глотания, речи и дыхания. Диагностика упрощается, если симптомы поражения ЦНС у ребенка сочетаются с резкой мышечной слабостью, общей бледностью, сухостью во рту, головокружениями. Помогают анамнестические данные об употреблении консервированных продуктов [85].

Материалом от больных заражают белых мышей или ставят РН с диагностическими ботулиническими сыворотками. При невозможности обнаружить токсин пытаются выявить возбудитель по общепринятой методике с использованием элективных питательных сред. Выделенную чистую культуру возбудителя идентифицируют с помощью специфических диагностических противоботулинических сывороток [86].

1.4 Диагностика клостридиозов

Диагноз на клостридиозы ставят с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Особо обращается внимание на дифференциальную диагностику по клиническим проявлениям (таблица 2).

Общие принципы лабораторной диагностики. Лабораторная диагностика Возбудитель обычно обнаруживают в месте проникновения в организм больного. Поэтому наиболее рационально исследование различного материала, взятого в месте ранения. В тех случаях, когда входные ворота неизвестны, следует тщательно осмотреть больного для выявления ссадин, царапин, катаральных и воспалительных процессов, необходимо обратить внимание на старые рубцы после ранения, т.к. возбудитель может долго в них сохраняться; в некоторых

случаях исследуют слизь из носа, бронхов, глотки, налет с миндалин, а также выделения из влагалища и матки (при послеродовом столбняке или аборте) [87].

Таблица 2 - Клиническая дифференциальная диагностика клостридиозов

Дифференциальная диагностика клостридиозов по клиническим признакам				
Болезнь	Возбудитель	Температура	Характерные изменения	Дополнительные признаки
Злокачественный отек	<i>C. perfringens</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i>	Повышение до 2 ⁰ С, часто в норме	Отеки подкожной клетчатки пенистым экссудатом, крепитация при простукивании. Стремительное течение (летальный исход на 3-5 сутки).	Общее угнетение, цианоз слизистых, понижение аппетита, повышение сердечных сокращений и дыхательных движений.
Ботулизм	<i>C. botulinum</i>	В норме	Нарушение акта глотания – длительное пережевывание корма, но пищевой ком не продвигается по пищеводу, а вода выделяется через ноздри.	Стремительное истощение, отмечается слюнотечение, частичная слепота. У коров часто наблюдают диарею.
Анаэробная энтеротоксемия	<i>C. perfringens</i>	41-42 ⁰ С	Нарушение координации, потеря равновесия, шаткость передвижения, мышечные спазмы. Болезнь характерна для молодняка.	Пульс и дыхание учащены, общая вялость и уменьшение аппетита. Возможно выделение жидких каловых масс бурого оттенка с кровью.
Столбняк	<i>C. tetani</i>	В норме	Судороги, параличи, мускулатура приобретает твердую консистенцию. Повышенное потоотделение в период судорог.	Отмечают параличи жевательной мускулатуры, остановку и угнетение пищеварительной системы. Общее состояние возбужденное.
Эмкар	<i>C. chauvoei</i>	Повышение до 41-42 ⁰ С	Хромота, шаткая походка. Горячие ограниченные отеки, сменяющиеся разлитыми холодными припухлостями. Пальпацией отмечают хруст. При вскрытии пораженного очага выделяется прогорклый грязный экссудат	Общее угнетение, аппетит снижен, дыхание поверхностное затрудненное. Сердечные сокращения учащены. У телят отмечают форму без образования отеков.

При бактериологическом исследовании трупов также принимают во внимание возможность генерализации инфекции. Для анализа забирают кровь (10 мл) и кусочки печени и селезенки (20-30 г) (таблица 3).

Таблица 3 – Лабораторная дифференциальная диагностика

Болезнь	Материал для исследований	Метод диагностики	Дифференциация
Злокачественный отек	Кусочки пораженных органов, патологический экссудат.	Микроскопическое исследование мазков-отпечатков, культивация возбудителя, пробы на лабораторных животных.	Сибирская язва, эмкар.
Столбняк	Содержимое раны, пораженные ткани.	Обнаружение и идентификация возбудителя или выделение его токсина с пробой на мышах.	Бешенство, тетания молочных коров, кормовые токсикозы.
Ботулизм	Корма, содержимое ЖКТ, кровь. От трупов берут долю печени.	Обнаружение токсина с последующей биопробой.	Сибирская язва, кормовые отравления, бешенство, кетоз, листериоз.
Эмкар	Кусочки пораженных мышц.	Микроскопия, биологическая проба.	Сибирская язва, злокачественный отек.
Анаэробная энтеротоксемия	Часть кишечника с содержимым.	Обнаружение и идентификация токсина.	Эмкар, пастереллез, алиментарные отравления.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в лаборатории микробиологического анализа КГУ им. А. Байтурсынова и лаборатории противобактериозной биотехнологии КазНАУ, в хозяйствах Костанайской и Алматинской областей.

2.1.1 Микробиологические исследования

Объектом исследований был эпизоотические штаммы клостридий выделенные от больных и павших животных (кровь, сыворотка крови, патматериал, фекалии) в хозяйствах, а также бактерии выделенные из почвы, воды, смывов со стен и полов животноводческих ферм, овощехранилищ.

Реагенты и наборы для молекулярно – биологических исследований:

Маркеры молекулярной массы 50, 100 bp (Thermo Scientific), набор для выделения ДНК из растительного материала (ООО «Агродиагностика»), pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, США), Taq-полимераза (Thermo Scientific, GenLab).

Праймеры Нуклеотидные последовательности генов получены из банков данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Для подбора и условий проведения ПЦР с праймерами использовали программу «Vector NTI 9.0». Выравнивания нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы AlignX (VectorNTI Advance 9.0). Оценки характеристик праймеров и зондов проводили с помощью программы Oligo 6.71. Специфичность олигонуклеотидов и анализ отсеквенированных последовательностей проверяли с помощью онлайн-программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Сконструированные праймеры были синтезированы.

Для бактериологического исследования отобрано 151 проб смывов с объектов окружающей среды, 53 образцов почвы животноводческих объектов, и 99 проб биологического материала (кусочки паренхиматозных органов, пораженная мышечная ткань и смывы с раневых участков) крупного рогатого скота, овец больных, павших или вынужденно убитых животных из хозяйств Сарыкольского, Костанайского, Карасуского, Тарановского районов Костанайской области.

Изучение культуральных, морфологических, тинкториальных, биохимических свойств выделенных микроорганизмов проводили методами общей микробиологии (Биргер М.О., 1986; Герхард), а также согласно ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов».

Для идентификации микроорганизмов были использованы следующие среды: Китта-Тароцци, Вильсона-Блера; МПА, МПБ, МППА с добавлением 10% крови барана и 0,5% глюкозы для создания анаэробнозиса были использованы газогенераторные пакеты.

Тинкториальные свойства и морфология изолятов были изучены микроскопически при окраске по Граму.

При исследованиях биоматериала от овец с подозрением на браздот, злокачественный отек крупного рогатого скота посевы производили из отечной подкожной клетчатки, подслизистой сычуга, паренхиматозных органов, экссудата грудной и брюшной полостей в среду Кита-Тароцци, глюкозо-красной агар в чашках Петри.

Для выделения бактерий *Clostridium* spp. из исследуемого материала делали посевы на дифференциальные питательные среды и инкубировали при температуре 37°C в течение 24-48 часов, посевы со средой Сабуро – при 22°C в течение 10 суток, МППА с кровью и глюкозой – в анаэроостате. После инкубации проводили отбор колоний, характерных для клостридий, для этого каждую отобранную колонию высевали параллельно на среду Кита-Тароцци, Вильсона-Блера, МППА с кровью и глюкозой в анаэроостате, МПБ и скошенный МПА. Изоляты относили к бактериям рода *Clostridium*, если они вырастали на средах Кита-Тароцци и на агаре в анаэроостате, при отсутствии роста на средах МПА и МПБ.

В случае если рост анаэробной микрофлоры заглушался факультативно-анаэробной микрофлорой, пробирки со средой Кита-Тароцци выдерживали в темном месте при комнатной температуре в течение 10-14 суток, после чего прогревали на водяной бане при 90°C в течение 15 минут. Образовавшиеся споровые формы анаэробной микрофлоры сохраняли жизнеспособность, а посторонняя микрофлора погибала.

При обнаружении в мазках характерных для клостридий палочек, не контаминированных посторонней микрофлорой, готовили бактериальную суспензию с концентрацией 3 Ед по McFarland. Для определения патогенных свойств, выделенных изолятов в опытах, использовали 12 беспородных мышей.

Идентификация *C. novyi* и *C. septicum* *C. perfringens*, *C. chauvoei* по ферментативным свойствам. При обнаружении в посевах бактерий с типичными культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами их пересеивали для получения чистых культур и определяли способность расщеплять глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, а также наличие лецитиназы, липазы, желатиназы, казеиназы, индола.

Всего выделено всего 86 культур, из них патогенных штаммов всего 45: *C. septicum* -11, *C. novyi* – 13, *C. perfringens* -12, *C. chauvoei* – 4.

Биопробы проводили в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике браздота овец» одновременно с посевом исследуемого материала на питательные среды для выделения культуры возбудителя и проверки вирулентности выделенной культуры на морских свинках массой 300-400 г.

Вводили подкожно в область брюшных мышц 0,5-1,0 мл тканевой суспензии или культуры. При выделении *C. septicum* животные погибали через 16-48 часов. Наблюдение за зараженными животными вели в течение 8 суток.

На месте инъекции обнаруживали следующие изменения: кожа легко отделяется от мышц, мышцы влажные, светло-красного цвета, в подкожной

клетчатке пузырьки газа, кишечник вздут, в сердечной сорочке и грудной полости значительный объем трансудата.

При заражение морских свинок *C. novyi* на месте инъекции наблюдали студенистый отек соединительной ткани, мышцы бледные.

Павших животных подвергали бактериологическому исследованию. Обязательно делают мазки-отпечатки с серозных покровов печени. Клетки *C. septicum* в таких препаратах имели форму длинных нитей (рисунок 3).

При подозрении на инфекционную энтеротоксемию проводились исследования по обнаружению токсина. Содержимое тонкого отдела кишечника суспендировали в равном объеме стерильного физиологического раствора, встряхивали, центрифугировали для осаждения крупных частиц. Для подавления микрофлоры надосадочную жидкость обрабатывали пенициллином.

Обнаружение токсинов. Определение типа основного токсина клостридий проводили с использованием диагностических антитоксических сывороток *Cl. perfringens* типа А, С, D, Е, F и физиологического раствора (контроль) на белых мышах одного возраста с массой тела 16–18 г. Токсигенность выделенных культур клостридий и эшерихий также изучали на белых мышах, согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии животных и анаэробной дизентерии ягнят» (1984). У мышей в положительном случае в течение 5 минут возможно развитие шока, летальный исход в течение 10 часов.

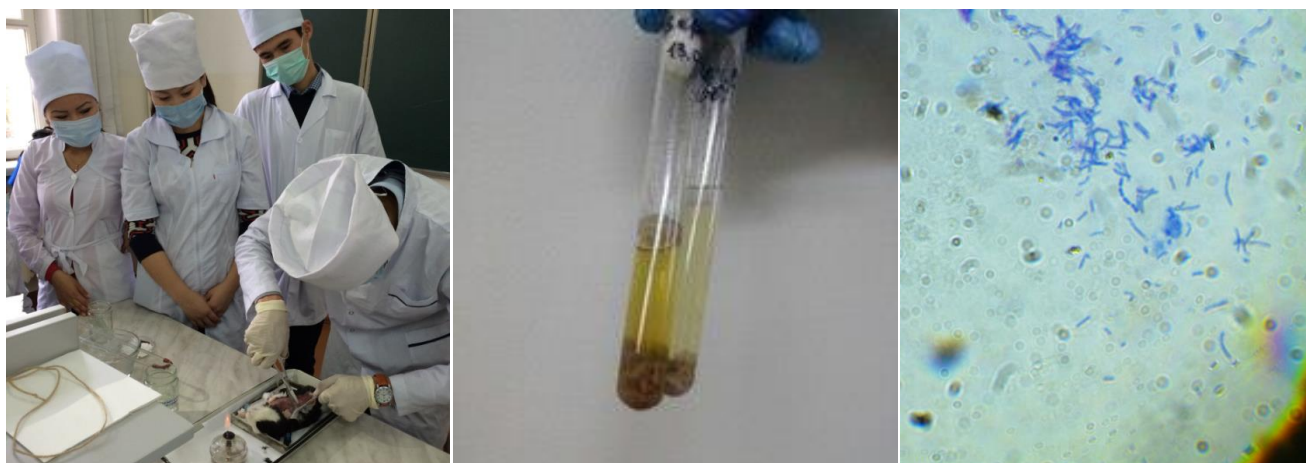


Рисунок 3 – Бактериологические исследования *Clostridium*

2.1.2 Получение высокоочищенной ДНК штаммов *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. chauvoei*.

Выделенные изоляты штаммов клостридий использовали для получения ДНК данных патогенов с целью дальнейшего исследования при разработке диагностической тест-системы. Бактериальную ДНК выделяли из штаммов иерсиний стандартным методом фенол-хлороформной депротеинизации с протеиназой К и коммерческим набором Genomics DNA Purification Kit (MPI Fermentas, Литва), (рисунок 4,5).



Рисунок 4 – Процесс выделения ДНК из биоматериала

Для выделения ДНК из образцов фекалий, эмульсий органов использовали коммерческий набор "ДНК-сорб-В" (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва); ДНК из смывов выделяли с использованием набора "ДНК-сорб-С" (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва), согласно прилагаемым инструкциям.

Для выявления *C. perfringens* в пробах и из выделенных культур использовали коммерческие тест-системы SureFood® Pathogen Salmonella PLUS для определения *Clostridium perfringens* PLUS (Стайлаб, Россия). Амплификацию, анализ и учет результатов в режиме «реального времени» проводили на градиентном амплификаторе Simpliamp (Applied Biosystems).



Рисунок 5 – Проведение ПЦР

Были использованы методы выделения ДНК с применением:

- фенол-хлороформа (фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1);
- додецилсульфата и протеиназы К (100mM Tris-pH8.0, 10mM EDTA, 2% SDS, 100ug/mL Proteinase K, 1% B-mercaptoethanol);

- метод сорбции на силикагеле.

Экстракцию НК проводили также с использованием набора реагентов «Рибо-преп» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (№ ФСР 2008/03147) согласно инструкции производителя.

Испытания ряда методик позволило подобрать оптимальный метод выделения ДНК с применением в качестве лизирующего агента гуанидинтиоцианата. Культуры *S. septicum*, *S. novyi*, *S. perfringens*, выращенные в анаэробных условиях, центрифугировали в 1,5 мл пробирках «Eppendorph» в течении 5 мин при 8000 g. Осадок бактериальных клеток суспендировали в 200 мкл 50 мМ ЭДТА, в суспензию вносили лизоцим в концентрации 100 мг/мл до конечной концентрации 10 мг/мл. Инкубировали смесь при 37°C в течении 10 мин. Короткого времени инкубации с лизоцимом было достаточно для частичного нарушения целостности клеточной стенки. Дальнейшее разрушение стенки достигалось внесением 200 мкл лизирующего буфера следующего состава: 5 М гуанидинтиоцианат, 25 мМ ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100. После инкубации в течении 1 мин в смесь вносили додецилсульфат натрия (SDS) до конечной концентрации 1%, инкубацию продолжали при комнатной температуре в течении 1 мин. После этого вносили равный объем (примерно 500 мкл) смеси фенол-хлороформ, пробирки встряхивали 3 мин и центрифугировали при 12000 g в течении 10 мин. Отбирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК в новую пробирку. ДНК осаждали равным объемом пропанола, промывали в 70% этаноле, подсушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE (10 мМ трис, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0). Через 30 мин растворения ДНК готова к использованию для генотипирования.

Статистическая обработка данных проведена методами статистического анализа при помощи программного пакета Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (t) и величины вероятности (p). За достоверность различий принимали значение $p < 0,05$, вероятность различий составляла 95% и более.

2.1.3 Конструирование праймеров и зонда. Выделение специфического гена из целого генома требует методики, с помощью которой можно среди миллиона сходных элементов найти один, нужный исследователю. Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, использовали биоинформационную базу данных NCBI. NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA) – национальный центр биотехнологической информации, который в числе прочего предоставляет сведения и о структуре генома живых организмов – о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Помимо этой базы данных нами были использованы и некоторые другие базы данных по биологическим молекулам (таблица 4).

Таблица 4 - Перечень баз данных по биологическим молекулам

Тип базы данных	Название	Электронный адрес
Таксономические базы	База данных расположенная при NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/
	NEWT	http://www.ebi.ac.uk/newt/
	The Tree of Life project	http://tolweb.org/tree/phylogeny.html
	Species 2000	http://www.sp2000.org/
	International Organization for Plant Information	http://iopi.csu.edu.au/iopi/
	Integrated Taxonomic Information System	http://www.itis.usda.gov/itis/
Базы данных по секвенированной ДНК	Европейская лаборатория молекулярной биологии (EMBL)	http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html
	Банк ДНК-данных Японии (DDBJ)	http://www.ddbj.nig.ac.jp
	STACK - 'Sequence Tag Alignment and Consensus Knowledgebase Соединяет сиквенсы, которые достаточно близки	http://www.sanbi.ac.za/Dbases.html
Базы данных белков	Швейцарский-ПРОТ	http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html
	Информационные ресурсы белков (PIR)	http://pir.georgetown.edu/pirwww/
	Банк данных белков (PDB)	http://www.rcsb.org/pdb/
Сервис по идентификации генов, сайты Био-портала	Геномные странички	http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/nc-geneid.html
	ВСМ поисковое устройство	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/
	МОЛБИОЛ	http://www.molbiol.net/
	Инструменты биомолекулярных исследований	http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/BioNet/Pedro/research_tools.html
Специализированные	'Ribosomal Database Project' – обеспечивает информацией касательно рибосомы, филогенетические деревья по рРНК.	http://rdp.cme.msu.edu/html/
	'HIV Sequence Database' собирает, курирует и аннотирует ДНК последовательности HIV и SIV; обеспечивает различными инструментами по анализу этих данных	http://hiv-web.lanl.gov/

Таксономические базы достаточно противоречивы из-за различных взглядов на классификацию организмов. Нуклеотидные базы данных

принимают информацию по последовательностям ДНК и предоставляют открытый доступ к ней. Доступ к приведенным базам данных бесплатный и возможен через интернет. DDBJ, GenBank и EMBL-Bank обмениваются информацией ежедневно, в результате чего содержат практически идентичную информацию. Среди разработок NCBI: банк данных геномов (Genbank); база данных «Нуклеотиды» (Nucleotides); база данных «Протеины» (Proteins); база данных «Пространственные структуры» (3Dstructures); база данных «Геномы» (Genomes) и другие. Банк данных Genbank содержит встроенные программные пакеты анализа структур геномов. Для подбора и условий проведения ПЦР с ними использовали программу «Vector NTI 9.0». Выравнивания нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы AlignX (VectorNTI Advance 9.0). Оценки характеристик праймеров и зондов проводили с помощью программы Oligo 6.71. Специфичность олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн-программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Экстракция ДНК Для выявления ДНК клостридий исследовали ткани и органы павших животных и мертворожденных, абортированные плоды, смывы с предметов окружающей среды, почву, бактериальные культуры.

Подготовка исследуемого материала. Пробы тканей и органов гомогенизировали с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовили 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию отстаивали при комнатной температуре в течение 2-3 мин и 50 мкл верхней фазы суспензии использовали для экстракции ДНК.

Из проб почвы готовили 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию отстаивали при комнатной температуре в течение 2-3 мин и 50 мкл верхней фазы суспензии использовали для экстракции ДНК.

Смывы с предметов окружающей среды использовали без предварительной подготовки. Для экстракции ДНК использовали 100 мкл.

Проведение секвенирования. Для проведения амплификации необходимо довести концентрацию ДНК с помощью добавления воды до 10 ng/mL.

Далее готовили реакционную смесь для проведения амплификации. Для амплификации использовали праймеры для 16S rRNA, изготовленные ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) (ПРИЛОЖЕНИЕ Ж). Реакцию амплификации проводили в объеме 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл. Для приготовления реакционной смеси смешивали в отдельной пробирке из расчета на каждую реакцию по 1,5 мкл праймеров 16S-F и 16S-R, по 3 мкл dNTP 2 mM, Buffer KCl 10x, MgCl₂ 25 mM, 12,8 мкл дионизированной воды и 0,2 мкл Taq-полимеразы.

Далее вносили в каждую пробирку по 25 мкл реакционной смеси и добавляли 5 мкл ДНК исследуемых образцов.

После этого, пробирки помещали в амплификатор. Программа амплификации представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Программа амплификации для секвенирования.

Этап	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	4 мин.	1
2	95	30 сек.	30
	62	1 мин.	
	72	1 мин.	
3	72	5 мин.	1

Для проведения амплификации использовали прибор SimpleAmp (Applied Biosystems, США).

Анализ амплификата проводили методом электрофореза в геле агарозы. Пробы ДНК (по 10 мкл) смешивали с 2 мкл буфера для нанесения и вносили пробы в лунки геля. По окончании электрофореза и окрашивания геля бромистым этидием на основании размеров фрагментов и расстояний их пробегов в геле вычисляли размеры исследуемых фрагментов.

Очистка амплификата от остаточных реагентов. Методика основана на очистке исследуемого материала при помощи фермента. Общий принцип метода заключался в следующем. К 10 мкл амплификата добавляли следующую реакционную смесь, имеющий следующий состав: фермент FastAmp в количестве 0,5 мкл, EhoI - 0,25 мкл, Buf - 1 мкл, H₂O - 8,25 мкл. Далее полученную смесь инкубировали в амплификаторе по следующей программе: 37°С – 30 мин., 85°С – 15 мин. Полученную смесь нужно хранить при -20°С.

Секвенирование проводили методом циклического секвенирования по Сэнгеру с набором ABI PRISM Big DyeTM Terminator v.1.1 («Applied Biosystems», США), согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyze («Applied Biosystems», США).

Реакция секвенирования проводилась по следующей программе: 1 мин при 96°С, затем 26 циклов: 96°С – 10 сек, 55°С - 5 сек, 60°С - 4 мин и хранение 12°С. В качестве праймеров для секвенирования использовались те же праймеры, которые были использованы в ПЦР.

Для осаждения к 3 М ацетату Na в количестве 3 мкл добавляли 96% этаноловый спирт (120 мкл). Далее добавляли по 130 мкл полученной смеси в каждую лунку с амплификатом. После этого инкубировали в темном месте в течении 10 мин. Далее центрифугировали в центрифуге с охлаждением в течении 30 мин. при 4°С (3700 об/мин). Затем жидкость сбрасывается и добавляется 70% этаноловый спирт в количестве 150 мкл. После этого снова центрифугируем при 4°С (3500 об/мин). Далее жидкость сбрасывается и просушиваем лунки в течении 15-20 мин. Затем добавляем формамид в объеме 14 мкл. Плашка ставится в термостат при 95°С в течении 5 мин и резко охлаждается в течении 5 мин. Далее проводилось секвенирование.

Корректировку хроматограмм проводили в SeqMan. Поиск наилучшей эволюционной модели согласно полученному множественному выравниванию нуклеотидных последовательностей проводили в MEGA v. 6. Гомологию нуклеотидных последовательностей оценивали в MEGA v. 6. Филогенетическое дерево и постериорную вероятность формирования монофилетических групп проводили с использованием программного обеспечения MEGA v. 6.

2.1.4 Определение специфичности и чувствительности сконструированных праймеров

Работы по определению специфичности и чувствительности, сконструированных праймеров ПЦР-реакции выполнялись на градиентном термоциклере с тремя независимыми температурными блоками ProFlex и амплификаторах с возможностью детекции в режиме Real-Time – QuantStudio5 (Applied Biosystems, США).

Специфичность разработанной тест системы изучали с использованием препаратов ДНК, выделенных из близкородственных бактерий родов *Clostridium difficile*, *Clostridium oedematiens*, *Clostridium sordellii*, *B. melittensis*, *Mycobacterium bovis*, *E. coli*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, а также с препаратами ДНК, пораженных тканей животных. Для определения чувствительности тест-системы использовали образцы ДНК исследуемых бактерий с начальным титром 10^5 нг/мкл. Далее готовили серию последовательных десятикратных разведений образцов ДНК исследуемых бактерий.

ДНК была выделена по оптимизированной методике с применением лизирующего раствора, содержащего гуанидинтиоцианат, ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100 с добавлением додецилсульфата натрия (SDS). ПЦР проводили в реакционной смеси следующего состава, указанного в таблице 6.

Таблица 6 - Состав и объем реакционной смеси для проведения амплификации

Компонент реакционной смеси (концентрация)	Количество на одну реакцию
праймер F (10 пмоль)	1,5 мкл
праймер R (10 пмоль)	1,5 мкл
Зонд Taq Man (5 пмоль)	1,5 мкл
dNTP (2 mM)	3 мкл
Bufer KCl 10x	3 мкл
MgCl ₂ (25 mM)	3 мкл
Nuclease-free water	11,3 мкл
Taq Polymeraza	0,2 мкл
DNA	5 мкл
Общий объем смеси	30 мкл
Примечание - для проведения ПЦР-РВ также добавлялся зонд (3,5 пмоль) – 1,5 мкл	

Режим проведения амплификации представлен в таблице 7

Таблица 7 – Режим проведения амплификации

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	4 мин.	1
95	30 сек.	30
52	30 сек.	
72	20 сек.	
72	5 мин.	1

Результаты амплификации, и, как следствие, специфичность праймеров оценивались с помощью метода гель-электрофореза. Электрофорез проводили при 110 В в 2% агарозном геле в буфере TBE. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК 50 и 100 bp GeneRuler. Результаты электрофореза визуализировали с помощью гель – документирующей системы QUANTUM модель 1000 SUPER (Viber-Lourmat, Франция).

2.1.5 Конструирование положительных контролей

Положительный контроль конструировали при помощи компьютерных программ SnapGene и SnapGene Viewer.

Для получения генно-инженерного контроля ПЦР был использован фирменный вектор pGEM – T Easy (Promega, США).

Для получения генноинженерного положительного контроля использовали пары праймеров, разработанные для диагностических тест-систем. Наименования пар праймеров представлены в таблице 1.

Наработанный ПЦР – продукт подвергали хлороформной экстракции.

Наращивание «липких» концов

Для наращивания липких концов применялся следующий протокол, указанный в таблице 8.

Таблица 8 – Протокол наращивания липких концов

Компонент реакционной смеси (концентрация)	Количество на одну реакцию
PCR продукт	1 мкл
10x Taq buffer	1 мкл
dATP (10 mM)	0,2 мкл
MgCl ₂	0,6 мкл
Taq Pol	1 мкл
MQ	6,2 мкл

Далее проводили инкубацию при 72°С на 30-60 мин.

Реакцию лигирования проводили в конечном объеме 10 мкл. Реакционная смесь содержала 1-2 мкл фрагмента ДНК, 0,5 – 1 мкл вектора, 0,5 мкл лигазы T4, 1 мкл буфера. Часть реакционной смеси инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре, в темноте, остальную часть амплификата хранили 10 – 12 часов при 4°С, для случая если реакция лигирования не прошла в первом случае.

Получение компетентных клеток

Свежую колонию клеток *E. coli* переседали вольфрамовой петлёй (стерильно) и растили в течение ночи при 37°C в режиме качания. Далее производили посев ночной культуры в 200 мл среды LB и инкубировали культуру при 37°C на качалке, контролируя величину оптической плотности культуры. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре при $\lambda = 600$ нм, по достижении середины логарифмической фазы роста оптическая плотность составляет 0,4-0,6. Затем культуру быстро переносили в центрифужные пробирки и охлаждали во льду. Клетки осаждали центрифугированием на центрифуге при 6000g в течение 10 минут при +4°C. К осадку добавляли 20 мл СС буфера (10 mM HEPES 2.38 g/L, 15 mM CaCl₂ 2.21 g/L, 55 mM MnCl₂ 4H₂O 10.89 g/L, 250 mM KCl 18.64 g/L). Клетки ресуспендировали и инкубировали во льду 10 минут, затем центрифугировали при 4000g в течение 10 минут при +4°C. Тщательно удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали в 7,44 мл СС буфера с 500 мкл DMSO. Инкубировали клетки во льду в течении 10 мин. Клетки расфасовывали по 50-55 мкл в 0,5-1,5 мл стерильные полипропиленовые пробирки, охлаждали при помощи азота и хранили при -80°C.

Скрининг рекомбинантных плазмид проводили при помощи теста на экспрессию β -галактозидазы.

Трансформация компетентных *E. coli*

Для трансформации был использован штамм DH5 α . Выполнение работы включало в себя следующие этапы:

- размораживание 55 мкл компетентных клеток на льду в течении 20 мин.;
- добавление к клеткам плазмиды в количестве 5 мкл (в зависимости от ее концентрации);
- постановка смеси в лед на 30 мин.;
- постановка смеси в водяную баню, разогретую до 42°C на 60 сек.;
- постановка смеси в лед на 5 мин.;
- добавление среды SOC (250 мкл) в пробирку со смесью;
- инкубация 1-1,5 часа при 37°C, и высевание клеток на чашки Петри (LB-Agar+amp, IPTG, X-gal) по 150 мкл;
- инкубация чашек Петри в термостате при 37°C в течение ночи.

Скрининг клонов

Первичный скрининг клонов осуществляли с помощью сине-белой селекции (синие – нет вставки, белые – есть вставка), отбирали белые колонии.

Для скрининга, определения клонов с нужной вставкой, проводили амплификацию с M13-праймерами: M13F - 5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3' и M13R - 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Вместо ДНК в реакцию добавляли 1 белую колонию из «клонов» в микропробирках. Затем продукты амплификации анализировали на электрофореze. Клоны, несущие вставку, соответствовали размеру клонированного продукта плюс 220 п.н. из фланкирующих участков вектора.

Плазмиды, содержащие в качестве вставки продукт амплификации с праймерами, подвергались секвенированию.

Положительные клоны переносили в пробирку с 5 мл жидкой среды LB с 50 мг/мл ампициллина и растили ночь при 37°C для выделения плазмидной ДНК.

Выделение ДНК. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор реагентов «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Реакционную смесь осаждали смесью этанола (90%) и ацетата натрия (3М). Перемешивали и откручивали при 7000 об., 45 минут при +4°C, удаляли супернатант. Промывали 140 мкл 70% этанола, откручивали при 7000 об., 15 минут при +4°C, удаляли супернатант. Высушивали в течение 15 минут (в темноте) при комнатной температуре для удаления этанола и добавляли 14 мкл формамида (Hi-Di, Applied Biosystems, N4311320) в каждую пробирку, выдержали 5-10 минут, денатурировали при 95°C 2-3 минуты. Переносили на плашку для сиквенса.

Секвенирование ДНК. Первичную структуру ДНК определяли с использованием наборов Big Dye 1.1 (Life technologies) на автоматическом анализаторе AB 3500 (Applied Biosystems).

Для проведения реакции использовали 2.5x Ready Reaction premix (Applied Biosystems, N4337455), 5x Big Dye Sequencing buffer, FD и RS праймеры, матрицу и дополняли до 20 мкл водой.

Программа для сиквенс-ПЦР: 1 мин – 96°C, 10 сек – 96°C (денатурация), 5 сек – 50°C (отжиг), 4 мин – 60°C (элонгация), хранение при +10°C. Количество циклов – 25.

Полученные результаты анализировали при помощи программы MEGA.

3 Результаты исследований

3.1 Выделение эпизоотических штаммов *Clostridium septicum*, сравнительное изучение их основных биологических свойств, мониторинг распространенности клостридиозов

С целью диагностики клостридиозов, обсемененности объектов внешней среды и пищевых продуктов животного происхождения данными патогенными анаэробами проведены бактериологические исследования (таблица 1). Из известных видов патогенных анаэробов возбудителей эпизоотологически значимых клостридиозов были выявлены возбудители злокачественного отека, браздота, эмкара, анаэробной энтеротоксемии, а также непатогенные для животных клостридии - *C. difficile*, *Clostridium coccoides*, *Cl. sphenoides* и другие виды бактерий (таблица 9).

Таблица 9 - Результаты исследований по выделению патогенных клостридий в пробах биоматериала от животных, продуктах и объектах ветеринарно - санитарного надзора

№	Материал для исследований	Всего исследований	Выделены бактерии рода <i>Clostridia</i>						
			<i>C. septicum</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. chauvoei</i>	Непатогенные виды	Всего выделено	% патогенных клостридий
1	Биоматериал от КРС	52	2	2	1	-	3	8	9,6
2	Биоматериал от овец	39	2	1	-	-	4	7	7,7
3	Почва	65	5	2	5	1	21	34	20,0
4	Сточная вода	15	1	-	2	-	7	10	20,0
5	Смывы с животн. ферм и корм	28	-	-	1	2	6	9	10,7
6	Консервы мясные и колбасные изделия	10	-	-	-	-	1	1	10,0
7	Молоко	11	-	-	-	-	1	1	9,0
	ИТОГО:	303	11	13	12	4	46	86	12,2

Из патологического материала овец и крупного рогатого скота павших от болезней с невыясненной этиологией, больных желудочно-кишечными заболеваниями, были выделены культуры микроорганизмов, отнесенных к бактериям рода *Clostridia*. При исследованиях 52 проб биоматериала от крупного рогатого скота и 39 проб от овец было выделено всего 15 видов клостридий, по результатам биопробы к патогенным отнесены 7 культур: *C. septicum* - 4, *C. novyi* – 3 и *C. novyi* -1

При исследованиях молока реализуемого на рынках, колбас и консервов патогенные клостридии выделены не были.

Основным резервуаром и местом пребывания клостридий является почва. Она служит потенциальным источником возникновения анаэробных инфекций у животных и представляет определенную угрозу вспышек в зависимости от природно-климатических характеристик по формированию эмерджентных ситуаций по клостридиозам [9]. При исследованиях образцов почвы, как с территорий животноводческих ферм, так и за их пределами в сельских округах выделено 34 культуры клостридий, из них патогенных 13.

3.1.1 Дифференциация изолятов клостридий по культурально-морфологическим признакам.

При росте *C. septicum* на среде Кита-Тароцци наблюдали интенсивное равномерное помутнение и образование газа. На глюкозо-кровяном агаре - кружевные сплетения в виде «нитей-арабесок» с зоной гемолиза. В 1% агаре столбиком формировались колонии диаметром 1-2 мм с уплотненным центром и радиально отходящими нитевидными перепутанными отростками. В глубине более плотного агара колонии чечевицеобразной формы. При росте в мозговой среде образовывал газ.

C. novyi в жидкой питательной среде растет с ее помутнением, образованием однородного или хлопьевидного осадка, газообразование слабое. Некоторые виды *C. novyi* на глюкозо-кровяном агаре формировали плоские, шероховатые колонии с неправильными ба-хромчатыми краями и отростками, образующими на периферии параллельные петли. Колонии *C. novyi* типов А, В, С часто образовывали дочерние колонии. Колонии окружены зоной гемолиза. В агаре высоким столбиком с глюкозой колонии *C. novyi* росли в виде кусочки ваты с уплотненным коричневатым центром или имеют форму линзы.

Для выделения *C. perfringens* засеянные пробирки прогревали при 65° С в течение 10 минут и затем культивируют 18 часов при 38° С. Рост *C. perfringens* в среде Кита-Тароцци — быстрый (3-8 часов), характеризуется помутнением, бурным газообразованием, образованием гомогенного или слизистого осадка. Из выросших культур делают мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют.

C. chauvoei на среде Кита-Тароцци вызывал равномерное легкое помутнение, слабое газообразование, через 2-3 суток среда просветлялась и формировался рыхлый беловатый осадок. Старые культуры имеют запах прогорклого масла. Скорость спорообразования варьирует от 24 до 72 часов.

На кровяном агаре возбудитель формирует округлые колонии диаметром 0,5-3 мм в большинстве случаев с небольшой зоной (β-гемолиза в виде «перламутровой пуговицы» (S-форма) или плоские с изрезанными краями в виде виноградного листа (R-форма). При посеве в мозговую среду последняя закисляется, есть газообразование, почернения нет, позднее в толще среды отмечается легкое покраснение.

Морфология клеток возбудителей в культуре. В мазках из культуры клетки *C. novyi* крупные, грамположительные прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными или обрубленными концами, перитрихи, клетки располагаются единично или парами. Споры овальные, центральные или субтерминальные. В старых культурах клетки возбудителя окрашиваются грамтрицательно.

C. septicum имеют форму грамположительных палочек, в мазках-отпечатках с серозных покровов наблюдали нитевидные формы, что считается характерным признаком *C. septicum*. Споры - овальные субтерминальные или центральные. Клетки *C. perfringens* в мазках из культуры короткие, толстые, грамположительные палочки с обрубленными концами, жгутиков не имеют. В старых культурах также образуют центральные или субтерминальные споры.

При контаминации культуры посторонней микрофлорой производили дробный высеv на глюкозо-квояной агар Цейслера. *C. perfringens* на квояном агаре формировали колонии трех типов диаметром 2-5 мм: S — гладкие, M — слизистые, R — махровые. Гладкие колонии первоначально напоминают капельки росы, затем прозрачность исчезает, колонии приобретали белую или сероватую окраску. Форма круглая, выпуклые, блестящие, гладкие, края ровные. M-колонии формировали капсулообразующие клетки, они сходны с S-колониями, но имеют слизистую консистенцию. Шероховатые колонии — неправильной формы, края фестончатые. По мере пребывания на воздухе колонии всех типов приобретают зеленоватый оттенок, что является характерным признаком. Колонии окружены зоной гемолиза, полного или частичного.

C. chauvoei в окрашенных препаратах видны как грамположительные палочковидные бактерии, с закругленными концами, тенденцией к полиморфизму (грушевидные, ве-ретенoобразные, шаровидные формы), с центральными и субтерминальными спорами. Иногда возбудитель образует цепочки из 3-5 клеток, но, в отличие от *C. septicum*, в мазках с серозных оболочек не имеет форму нитей. 3.1.1 Изучение биохимических свойств выделенных штаммов клостридий

Идентификация *C. novyi* и *C. septicum* по ферментативным свойствам. При обнаружении в посевах бактерий с типичными для *C. novyi* и *C. septicum* культуральными, морфологическими характеристиками определяли наличие лецитиназы, липазы, желатиназы, казеиназы, индола, способность расщеплять глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу (таблица 10).

Таблица 10. Ферментативные свойства *C. septicum* и *C. novyi*

Вид клостридий	Признаки										
	Лецитиназа	Липаза	Желатиназа	Казеиназа	Индол	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Фруктоза	глицерин
<i>C. septicum</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	+		
<i>C. novyi</i> тип А	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
тип В	+	-	+	+	±	+	-	-	+	+	+
тип С	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
тип D (<i>C. haemolyticum</i>)	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+

Как видно из таблицы у отдельных типов. *Cl. novyi* типа А, В и С сахаролитические свойства выражены слабо и различны ферментирует глюкозу, фруктозу и мальтозу, а тип D только глюкозу; глицерин разлагают все типы. Способность разлагать углеводы изменяется в зависимости от штамма. Также как и у *C. septicum* слабо выражены протеолитические свойства. Желатина разжижается медленно, свернутая сыворотка крови, вареное мясо, казеин и свернутый яичный белок не разжижаются. Нитраты восстанавливаются в аммиак без прохождения стадии нитритов. Сульфаты не восстанавливаются в сероводород, индол не образуется (рисунок 6).



Рисунок 6 – определение лецитиназной активности *C. novyi* тип А

Идентификация выделенных культур *C. perfringens*. В результате выявления типовой принадлежности 9 выделенных культур *C. perfringens* в реакции нейтрализации токсинов установлено, что 6 из них отнесены к типу А, две - к типу С и одна - к типу Д. В дальнейшем проводили изучение биологических свойств 12 культур *C. perfringens* отнесенных к типу А.

Основные биохимические свойства изучаемых культур *C. perfringens* тип А оценивали по способности сбраживать углеводы, свертывать молоко, разжижать желатин, образовывать индол (таблица 11).

Таблица 11 - Биохимические свойства культур *C. perfringens* тип А

№	<i>C. perfringens</i> тип А биохимические свойства	
1	Глюкоза	+
2	Лактоза	+
3	Сахароза	+
4	Раффиноза	+
5	Маннит	-
6	Арабиноза	-
7	Рамноза	-
8	Индол	-
9	Молоко	+
10	Желатин	+

Как видно из таблицы 11, все изучаемые культуры *C. perfringens* тип А обладали выраженными сахаролитическими свойствами и сбраживали с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, сахарозу, раффинозу, не ферментировали маннит, арабинозу, рамнозу, а также свертывали и пептонизировали молоко, расплавляли желатину и не образовывали индол.

3.1.2 Патогенность культур *C. perfringens* тип А изучали на морских свинках массой 300-350 г. Для этого суточную культуру, выращенную на среде Китта-Тароцци, вводили подкожно в области брюшной стенки двум морским свинкам в дозе 1,0 мл (рисунок 7).



Рисунок 7 – Патологоанатомическая картина вскрытия погибшей морской свинки, после заражения культурой *C. perfringens* тип А.

На вскрытии в местах инъекции культуры *C. perfringens* тип А была характерной: кожа отслоилась от мускулатуры газами. Мышцы были серого цвета имели вид «вареного мяса». Кишечник был наполнен газами, кровеносные сосуды инъецированы. В брюшной полости имелось незначительное количество трансудата. Паренхиматозные органы без видимых изменений. В мазках из мышц пораженной области, окрашенных по Граму, было обнаружено большое количество грамположительных толстых коротких палочек. При посевах на среду Китта-Тароцци и глюкозо-кровоной агар наблюдали характерный для *C. perfringens* тип А рост.

Таким образом, за отчетный с целью выделения патогенных штаммов клостридий период исследовано 220 проб материала, выделены всего 70 культур, изучены их основные биологические свойства, из них патогенных штаммов: *C. septicum* -11, *C. novyi* – 4, *C. perfringens* -9, *C. chauvoei* – 3. Создана коллекция данных микроорганизмов, исследования в этом направлении будут продолжены.

3.2 Получение высокоочищенной ДНК штаммов *Clostridium*, отбор и отработка способов выделения ДНК

Для того чтобы получить высокоочищенные ДНК, не содержащие ингибирующие примеси, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения.

На первом этапе стояла задача выделения геномной ДНК из этих микроорганизмов. Стандартная процедура экстракции ДНК в отношении *S. perfringens*, *S. septicum* и *S. novyi* не подходит, так как клеточная стенка этих грамположительных бактерии резистента к лизоциму.

Поэтому возникла необходимость выбора оптимального метода выделения ДНК экспериментальным путем. В наших исследованиях по подбору оптимальной схемы выделения ДНК из культур клостридий были использованы следующие методы:

- с применением лизирующего раствора, содержащего гуанидинтиоцианат, ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100 с добавлением додецилсульфата натрия (SDS);

- с применением детергента Tween – 20 и последующей экстракцией фенолом;

- методом сорбции на силикагеле

Первый способ основан на использовании лаурилсаркозина добавочно к лизоциму для лизиса белковых структур с дальнейшей фенольной депротеинизацией. Второй способ экстракции ДНК из бактерий предусматривает использование в качестве детергента Tween - 20. Tween хорошо лизирует клеточную мембрану, но слабее действует на ядерную стенку, если учесть, что в бактериальных клетках ядро не имеет оболочки – это оптимальный вариант.

При выделении ДНК методом сорбции на силикагеле также использовали гуанидин гидрохлорид. Силиконовый матрикс связывает ДНК в присутствии высоких концентраций хаотропных солей, таких как гуанидингидрохлорид, которые разрушают гидрофобные взаимодействия. По определению исследователей, метод имеет два преимущества: дешевизна силикон диоксида и универсальность протокола для широкого приложения для очистки ДНК [14]. 1 мг силикон диоксида способен связать до 3-4,5 мкг ДНК и в таком состоянии стабильность ДНК сохраняется до 12 месяцев. Очевидно, что количество используемого силикагеля зависит от предполагаемого количества ДНК в исходном материале; ДНК отделяется от силикагеля при понижении концентрации соли, а также быстрым центрифугированием (10 сек.); либо ДНК может быть отмыта небольшим объемом (от 5 мкл) воды, облегчить элюцию можно нагреванием. Предлагаемый метод прост, быстр и экономичен, не требует специальных колонок и оборудования, поэтому мы использовали его при большом объеме образцов в экспериментах.

Главными критериями при отработке оптимальных методов были концентрация и чистота препарата.

После выделения ДНК клостридий вышеперечисленными методами проводили качественный и количественный анализ образца. Спектрофотометрически измеряли отношение между оптическими плотностями при 260 и 280 нм. Максимум поглощения для нуклеиновых кислот регистрируется при длине волны 260 нм. Препарат ДНК считается свободным от примесей при величине отношений $E_{260/280}$ равным 1,8 и выше. Если этот

показатель ниже указанного, то образец загрязнен белками или фенолом. Результат качественного анализа полученного препарата ДНК представлен на электрофореграмме (рисунок 8).



Примечание - 1 – геномная ДНК *C. septicum* и *C. novyi*; М – маркер ДНК "Direct Load™ Wide Range Marker, 10.000 п.о. - 50 п.о.", Sigma.

Рисунок 8 - Электрофореграмма препаратов ДНК *C. septicum* и *C. novyi* выделенных методом сорбции на силикагеле

Образцы ДНК клостридий, полученные с использованием детергента Tween - 80, оказались невысокого качества. Отношения между оптической плотностью при длинах волн 260 и 280 нм в среднем составляли 1,65-1,7, что говорило о загрязненности ДНК белком и другими примесями. Полученные результаты показали неэффективность этих методов.

Лучшие результаты, как и при выделении ДНК других микроорганизмов (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) были получены при обработке бактериосодержащей суспензии лизирующим буфером – 5 М гуанидинтиоцианат, 25 мМ ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100, додецилсульфата натрия (SDS) до конечной концентрации 1% и с последующей экстракцией фенол/хлороформом. Отношение оптической плотности (E_{260}/E_{280}) полученных препаратов ДНК *C. perfringens*, *C. septicum* и *C. novyi* имело средние значение $1,81 \pm 0,06$ ($n=12$).

Таким образом, как оптимальный метод для выделения ДНК клостридий отобран метод с применением лизирующего буфера, содержащего 5 М гуанидинтиоцианат, 25 мМ ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100, додецилсульфата натрия (SDS) и с последующей экстракцией фенол/хлороформом: (E_{260}/E_{280}) имело среднее значение $1,81 \pm 0,06$.

3.3 Компьютерное моделирование, конструирование и синтез праймеров и зондов

Начальным этапом при подготовке постановки полимеразной цепной реакции является подбор праймеров к определенному гену. Наряду с подбором праймеров к генам необходимо выбрать целевой ген, в качестве которого рекомендуется использовать ген или гены «домашнего хозяйства» (конститутивный ген). Конститутивные гены — структурные гены, обеспечивающие основные жизненные функции клетки, экспрессия которых, как правило, не регулируется дополнительными факторами (например, белком-репрессором), а определяется лишь взаимодействием РНК-полимеразы с промотором, имеющим определенные структурные особенности. Гены «домашнего хозяйства» работают (активны) постоянно во всех клетках организма и кодируют ферменты общего метаболизма, например, гликолиза. Экспрессия этих генов слабо зависит от условий окружающей среды и поддерживается на относительно постоянном уровне.

После анализа последовательностей ДНК в различных базах данных для подбора специфичных праймеров были выбраны гены альфа-токсин (alpha-toxin gene), triosephosphate isomerase gene (tpi), phospholipase C gene (plc), flagellin gene (fliC), DNA gyrase (type II topoisomerase) (gyrA), molecular chaperone GroEL (groEL), collagenase gene (colA), glycerol kinase gene (glpK).

Для каждого, из указанных выше генов, был произведен поиск последовательностей, который включал не только целевые организмы, но и группу близкородственных организмов к данному виду. Далее было произведено выравнивание с помощью компонента программы «Vector NTI» — AlignX. Специфические участки, подходящие для создания праймеров, были найдены при выравнивании генов альфа-токсина (alpha-toxin gene), phospholipase C gene (plc), flagellin gene (fliC).

Определяющая черта этих генов — наличие в их составе одного или более ДНК-связывающих доменов, которые взаимодействуют с характерными участками ДНК, расположенными в регуляторных областях генов. Другие белки, играющие ключевую роль в регуляции экспрессии генов, такие как коактиваторы, гистонацетилазы, киназы, метилазы, не имеют ДНК-связывающих доменов, и, следовательно, не могут быть причислены к транскрипционным факторам. При изучении результатов выравнивания по остальным отобранным генам, не удалось найти уникальные, специфические участки, которые подходили бы для создания олигонуклеотидов. В некоторых случаях, практически на всем протяжении нуклеотидных последовательностей не было найдено специфических участков, для целевых организмов (выделение желтым либо синим цветом), в других ситуациях, когда были найдены подходящие участки, были получены неудовлетворительные результаты «BLAST-анализа», либо температура плавления оказывалась не подходящей требованиям проведения ПЦР, так же нами были отсеяны олигонуклеотиды содержащие дефектные области (так называемые димеры, хвосты и петли). В

результате, удовлетворяющими во всех требованиях, оказались участки генов alpha-toxin gene, plc, fliC.

Следующим этапом, после поиска маркеров, был подбор специфических праймеров. Необходимо было установить, какие бактерии, являются наиболее близкими филогенетическими родственниками к искомому организмам. С этой целью нами было построено филогенетическое дерево для рода *Clostridium*. (рисунок 9).

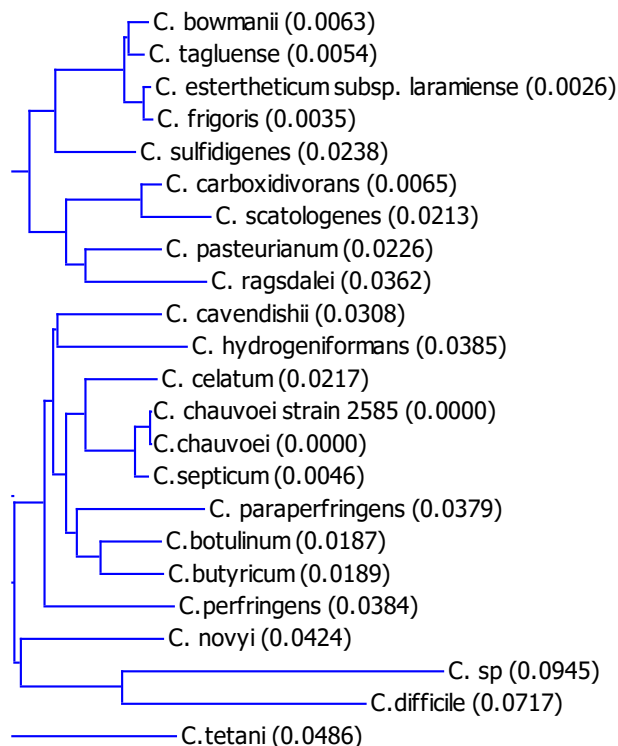


Рисунок 9 - Филогенетическое дерево рода *Clostridium*

Укоренённое консенсусное филогенетическое дерево, построенное на основе выравнивания последовательностей нуклеотидов, с использованием комплекса программ Vector NTI, на основе выравнивания последовательностей нуклеотидов видов бактерий родов *Clostridium* (0,1 – эволюционное расстояние). После построения дерева производилось выравнивание, с использованием нуклеотидных последовательностей наиболее близких видов. Выравнивание последовательностей — биоинформатический метод, основанный на размещении двух или более последовательностей мономеров ДНК, РНК или белков друг под другом таким образом, чтобы легко увидеть сходные участки в этих последовательностях.

Сходство первичных структур молекул может отражать их функциональные, структурные или эволюционные взаимосвязи. Для подбора праймеров, наиболее подходящими оказались гены alpha-toxin gene, plc и fliC выравнивания, которых приведены на рисунке 10.



Рисунок 10 - Выравнивание фрагментов генов alpha-toxin, plc и fliC микроорганизмов рода Clostridium (желтым цветом указаны участки полного совпадения нуклеотидов, синим – частичное совпадение, зеленым – 50% совпадений, бесцветные участки – уникальные последовательности)

Выравнивание проводилось в несколько этапов:

- поиск нужного гена среди определенных ранее родственных организмов;
- выравнивание среди всех найденных последовательностей, в случае обнаружения уникальных, специфических участков переходили к следующему этапу;
- после обнаружения подходящих участков, проводили выравнивание внутри рода Clostridium, с использованием последовательностей нескольких штаммов от искомого вида, данный этап показан на рисунке 2.

На участки генов alpha-toxin gene, plc и fliC были отобраны пары праймеров и зонд, при этом старались соблюдать ряд установленных

эмпирически требований, выполнение которых позволяет добиться лучшей эффективности и специфичности реакции:

- длина праймеров – 18-25 п. о.

- GC-состав праймеров, определяющий T_m (температуру плавления), должен находиться в пределах 40-60% (оптимально 45-55%). При этом значения T_m обоих праймеров должны быть близкими.

- концевые 3'-нуклеотиды не должны быть комплементарны самому праймеру, другому праймеру пары, зонду, или другим синтетическим нуклеотидам, добавляемым в реакцию.

- если от праймеров требуется специфичность, то по крайней мере 2 нуклеотида на 3'-концах должны быть гомологичны ДНК анализируемого организма, и не гомологичны ДНК близкородственных организмов.

- желательно, чтобы T_m 5'-концевой части праймера превышала T_m 3'-концевой части.

Существенно более специфичными являются методы ПЦР-РВ, основанные на использовании флуоресцентно-меченых зондов. В таких случаях помимо флуорофора используется и другое соединение – гаситель флуоресценции (quencher). Эффект гашения флуоресценции, как правило, достигается за счёт тесного сближения флуорофора и гасителя. Наиболее распространёнными системами флуоресцентно-меченых зондов являются TaqMan и «молекулярные маячки» (molecular beacons). Зонд типа TaqMan (линейный разрушаемый зонд, или гидролизующийся зонд, полностью комплементарен продукту ПЦР и имеет T_m порядка 75-80°C. Свободный зонд, находясь в растворе (гаситель и флуорофор сближены), создаёт некоторый базальный уровень флуоресценции, который преодолевается по мере накопления свободного флуорофора в реакционной смеси. Интенсивность сигнала возрастает пропорционально накоплению специфического продукта реакции. Среди всех систем детекции флуоресценции в формате ПЦР-РВ метод с использованием TaqMan нашёл наиболее широкое применение для детекции возбудителей фузариоза.

При подборе праймеров и зондов большое внимание уделяют температуре плавления (T_m) – это температура при которой половина молекул свободна, а другая половина гибридизованна с матрицей. Важно помнить, что существуют два праймера, которые добавляют в ПЦР реакцию, ориентированную на конкретный сайт, или целевую последовательность. Оба олигонуклеотидных праймера следует конструировать таким образом, чтобы они имели одинаковую температуру плавления. Если праймеры не совпадают в отношении T_m , амплификация будет менее эффективной, или может вовсе не сработать, так как праймер с более высокой T_m будет неправильно работать при более низкой температуре, а праймер с более низкой T_m может не работать при более высокой температуре. Температура плавления олигонуклеотидов наиболее точно рассчитывается с использованием наиболее подходящих термодинамических расчетов по формуле 1, представленной ниже:

$$T_m^{\text{primer}} = \Delta H [\Delta S + R \ln (c/4)] - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10} [K^+] \quad (1)$$

где H – это энтальпия, и S – энтропия для образования спирали, R – молярная газовая константа, а c – концентрация праймеров.

К счастью, достаточно хорошо работает приблизительный расчет этой величины (в целом, пригодный для олигонуклеотидов в пределах 18 – 24 оснований), с использованием формулы 2:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C) \quad (2)$$

A, T, G, C – пуриновые и пиримидиновые основания.

При расчете температуры плавления праймера, следует убедиться, что температура плавления продукта достаточна низка, чтобы при 92°C произошло его 100% расплавление. Этот параметр поможет гарантировать более эффективное действие ПЦР, но он не всегда необходим для успешного ПЦР. В общем, продукт в пределах между 100 – 600 нуклеотидных пар эффективно амплифицируется во многих разновидностях реакций ПЦР. Если существует сомнение, T_m продукта можно рассчитать, используя формулу 3:

$$T_m = 81.5 + 16.6 [K+] + 0.41 (\%G+C) \cdot \text{длина} \quad (3)$$

В нашем случае, помимо формул, использовалась программа Oligo 6.71, с помощью которой, строились диаграммы, показывающие изменения температуры плавления на разных участках последовательности. Для начала, нами была проанализирована температура плавления на всем протяжении последовательности целевого гена.

Одновременно с проведением «BLAST-анализа» (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), при получении положительных результатов проводился анализ температуры плавления олигонуклеотида, как показано на рисунке 3. Если его T_m находилась в допустимых пределах, приступали к поиску обратного праймера на этом же гене, с учетом того, что расстояние между ними должно быть не менее 300 п.н. и не более 1200 п.н. Так же, разница между температурами плавления обоих праймеров должна быть минимальной, к тому же на этом этапе исключались дефектные олигонуклеотиды. Далее на рисунках 11,12 показана температура плавления праймеров, и температура образования дефекта (если он присутствует).

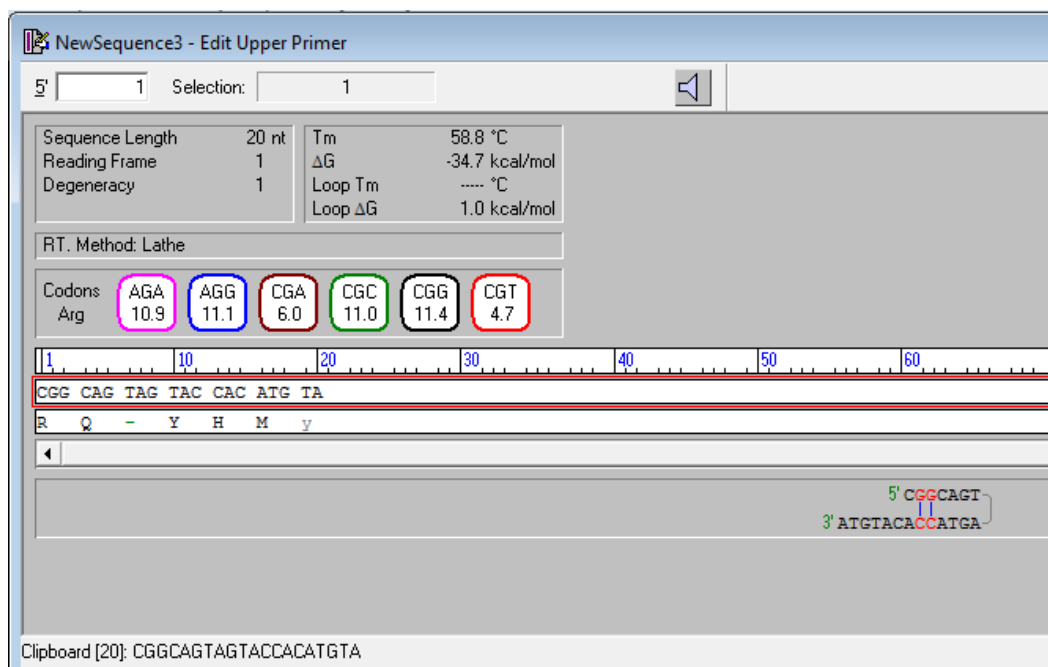


Рисунок 11 - Характеристики прямого праймера для *Clostridium septicum*

На рисунке 12 показаны основные параметры олигонуклеотида (длина, температура плавления, энергия Гиббса) и характеристики дефекта который потенциально может образоваться во время амплификации (температура и энергия образования дефекта). Как видно, температура образования дефекта находится вне пределов температуры амплификации, поэтому он не учитывается.

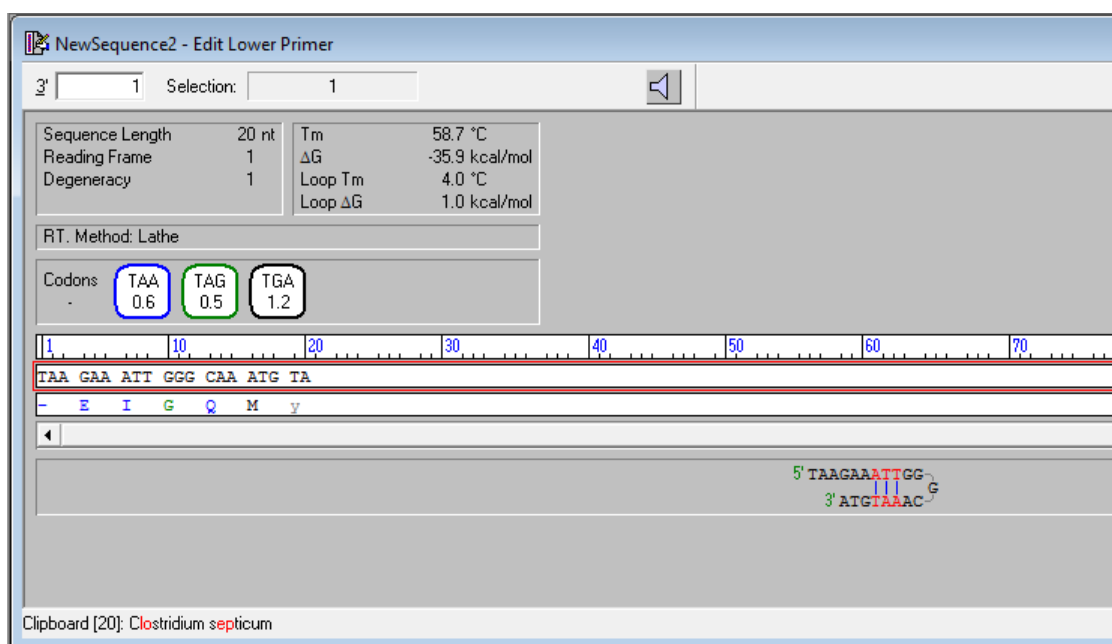


Рисунок 12 - Характеристики обратного праймера для *Clostridium septicum*

Температура образования дефекта находится вне пределов температуры амплификации. Аналогичным образом был проведен подбор праймеров для

детекции *Clostridium perfringens*, *Clostridium chauvoei* и *Clostridium novyi* (поиск специфических участков, температурный анализ последовательностей, исключение значимых дефектов). Ниже, в таблице 12, представлены последовательности подобранных праймеров.

Таблица 12 – Перечень подобранных праймеров

Вид возбудителя	Gene	Oligonucleotide	Длина, п.н.	T° плавления
<i>Clostridium septicum</i>	alpha-toxin	Upper primer 5'- CGGCAGTAGTACCACATGTA-3'	21	58,8°C
		Lower primer 5'- TACATTTGCCCAATTTCTTA-3' (taagaaattgggcaaatgta)	20	58,7°C
<i>Clostridium perfringens</i>	phospholipasae C (plc)	Upper primer 5'- GCTAATGTTACTGCCGTTGATA-3'	22	62,8°C
		Lower primer 5'- CTGTTCCSTTTTGGAGAGTTAGCT-3' (agctaactctcaaaaaggaacag)	23	62,4°C
<i>Clostridium chauvoei</i>	flagellin (fliC)	Upper primer 5'- AACGTAGCTGTAGATAGAAGCTGC-3'	23	60,9°C
		Lower primer 5'- CTTCCATCAGCTAAGTTACTATTT-3' (aaatagtaacttagctgatggaag)	24	60,1°C
<i>Clostridium novyi</i>	phospholipasae C (plc)	Upper primer 5'- GGAGCATCAAGTAAAGCGTA-3'	20	60,6°C
		Lower primer 5'- CATTCGGATCATAATCAGGA-3' (tcctgattatgatccgaatg)	20	60,2°C

Все праймеры, указанные в таблице 12, подбирались аналогично, указанной выше методике и полностью соответствовали предъявляемым к ним требованиям.

Следующим этапом создания детектирующей системы было конструирование флуоресцирующего зонда. Зонд выбирали из области, ограниченной праймерами. Брали фрагмент размером 25-35 пар оснований, который обладает температурой отжига на 15-20 градусов выше, чем у праймеров (обычно это около 80°C). Зонд не обязательно должен быть специфичен, т.к. специфичность тест-системы полностью определяется праймерами. Обязательным условием при выборе участка для создания зонда, являлось наличие тимины через 10-12 пар оснований от 3' конца, так как именно к нему крепится флуоресцирующая метка (в используемом нами типе зондов), гаситель же присоединяется к самому 3' концу. Помимо этого, зонды проверяются на образование дефектов, так же, как и праймеры.

Зонд расположен, как и полагается, в промежутке между прямым и обратным праймерами, однако его расположение близко к прямому праймеру, соответственно зонд берется такой же последовательности – прямой. Температура его плавления на 15°C выше соответствующей температуры праймеров, что отвечает поставленным требованиям. Ниже, на рисунке 13 представлены характеристики выбранного зонда.

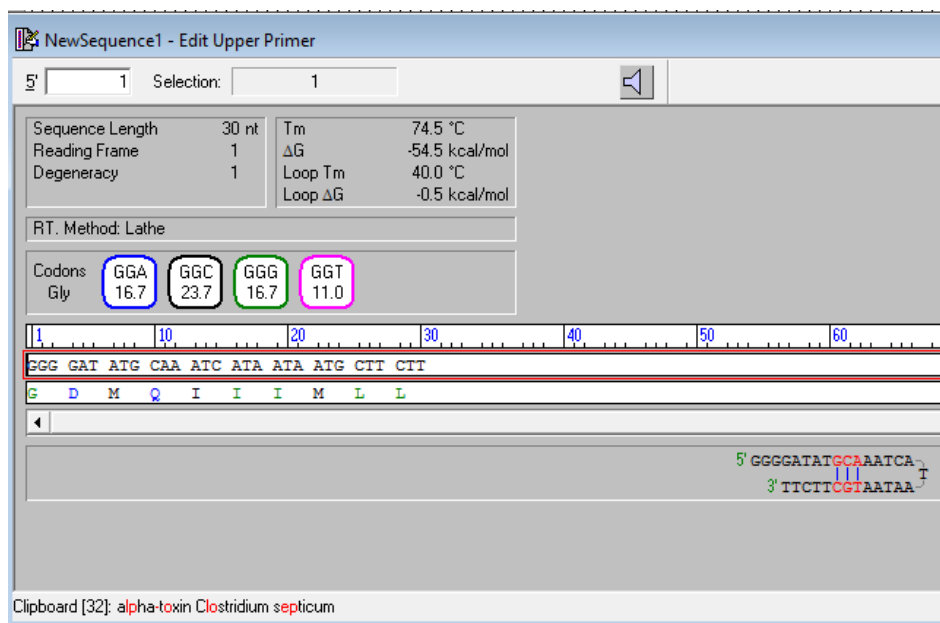


Рисунок 13 - Характеристики зонда для Clostridium septicum

На рисунке 13 предоставлены основные характеристики зонда, точная температура плавления 74,5°C, что на 15,8°C и 15,9°C градусов выше температуры плавления праймеров (прямого и обратного соответственно). Таким образом, нами были подобраны праймеры и зонд, позволяющие детектировать Clostridium septicum методом полимеразной цепной реакции.

Аналогичным образом был проведен подбор зондов для детекции Clostridium perfringens, Clostridium chauvoei и Clostridium novyi (температурный анализ последовательностей, исключение значимых дефектов). В таблице 13 приведены последовательности подобранных зондов TaqMan.

Таблица 13 - Перечень подобранных зондов

Вид возбудит.	Gene	Oligonucleotide	Длина, п.н.	T° плавл.
Cl. septicum	alpha-toxin	Probe 5'-(BHQ1)- GGGGATATGCAAA(FAMdT)CATAATAATGC TTCTT-3'	30	74,5°C
Cl. perfringens	phospholipase C (plc)	Probe 5'-(BHQ1)- AGTCCCAATCA(FAMdT)CCCAACTATGACT CATGC-3' (gcatgagtcgatgtgggatgattgggact)	30	79°C
Cl. chauvoei	flagellin (fliC)	Probe 5'-(BHQ1)- TTAGATGGTGGT(FAMdT)TCAAAGGAGAAT TCCAA-3'	30	77,1°C
Cl. novyi	phospholipase C (plc)	Probe 5'-(BHQ1)- GAACTCATTC(AAMdT)GATTGTAACACA AGCAG-3'	30	75,2°C

Ниже представлена локализация подобранных праймеров и зондов на нуклеотидной последовательности: зеленым цветом указана локализация праймеров, желтым – зонда (рисунки 14,15,16,17):

Primer_F **CGGCAGTAGTACCACATGTA**

Primer_R **TACATTTGCCCAATTTCTTA** (taagaaattgggcaaatgta)

Probe **(BHQ1)-GGGGATATGCAAA(FAMdT)CATAATAATGCTTCTT**

>gi|89257967|gb|DQ403251.1| Clostridium septicum alpha-toxin gene, complete cds
 ATGTCAAAAAAATCTTTTGCTAAAAAAGTAATTTGTACATCTATGATTGCAATTCAGTGTG**CGGCAGTAGTACCACATGTA**CAAGCTTATGCACTTACAAATCTTGAAGAGG**GGGGA**
TATGCAAATCATAATAATGCTTCTTCAATTAATAATTTGGATATGAAGACAATGAAGATTTAAAAGCTAAAATTATTCAAGATCCAGAGTTTA**TAAGAAATTGGGCAAAATGTA**GCT
 CATTCATTAGGATTTGGATGGTGCAGTGGAAACGGCTAATCCAAACGTTGGACAAGGTTTGAATTTAAAAGAGAAGTTGGGGCAGGTGGAAAAGTATCTTATTTATTATCTGCTAGATACAATCCAAATGATCCTTATGCAAGTGGGTATCGTGCAAAAGATAGACTCTCTATGAAATATCAAATGTTAGATTTGTTATTGATAATGATTCTATAAAATTAGGTACACSTAAAGTGA
 AAAAAATTAGCACSTTTAAATGGAATACGACATAGGATTAATGGGATTTTAAAGATATACAGGAAATGCTCGTGAAGATCATACTGAAGATAGACCAACAGTTAAACTTAAATTTGGTAAAAACGGTATGAGTGCTGAGGAACATCTTAAAGATTTATATAGTCATAAGAAATTAATGGATATTCAGAATGGGATTGGAAATGGGTAGATGAGAAATTTGGTTATTTATTA
 AAAAATTCATACGATGCTCTTACTAGTAGAAAATTAGGAGGAATAATAAAAGGCTCATTTACTAACATTAATGGAACAAAAATAGTAATTAGAGAAGGTAAAGAAATTCACSTTCTGATAAGAAGAGAAGAGGAAAAACGTTTCAGTAGATTCTTTAGATGCTAGATTACAAAATGAAGGTATTAGAATAGAAAATATTGAACCACAAGATGTTCCAGGATTTAGACSTAAATAGCATAACATACAATGATAAAAAAATTGATATTAATTA

Рисунок 14 – Локализация праймеров и зонда на нуклеотидной последовательности гена alpha-toxin для Clostridium septicum

Primer_F **FGCTAATGTTACTGCCGTTGATA**
Primer_R **CTGTTCTTTTTGAGAGTTAGCT** (agctaactctcaaaaaggaacag)
Probe **(BHQ1)-AGTCCCAATCA(FAMdT)CCCAACTATGACTCATGC** (gcatgagtcatagttgggatgattgggact)

>gi|77170463|gb|DQ184176.1| Clostridium perfringens strain NRRL B-41071 phospholipase C (plc) gene, complete cds
ATGAAAAGAAAGATTTGTAAGGCACCCCTTTGTGCTACGCTAGCAACTAGCCTATGGGCTGGGGCACCAA
CTAAAGTCTACGCTTGGGATGGAAAAATTGATGGAACAGGAAGCTCATGCTATGATTGTAAGTCAAGGGGT
TATACCTGACACAGGGGAATCACAAATAAGAAAATTTTCAGCATTAGCTAGATATGAATGGCAAAGAGG
AAACTATAAACAAGCTACATTCTATCTTTGGAGAGGCTATGCACTATTTTGGAGATATAGATACTCCATATC
ATCCT**GCTAATGTTACTGCCGTTGATA**AGCGCAGGACATGTTAAGTTTGGAGACTTTTGCAGAGGAAAAGAAA
AGAACAGTATAAAAATAAACACAGTAGGTTGCAAACTAATGAGGATTTTTATGCTGATATATTAACAAAC
AAGGATTTTAATGCATGGTCAAAAGAATATGCAAGAGGTTTTGCTAAAACAGGAAAATCAATATACTATA
GTCATGCTA**GATGAGTCATAGTTGGGATGATTGGGACT**ATGCAGCAAAGGTAACTT**AGCTAACTCTCA**
AAAAGGAACAGCAGGATATATTTATAGATTCTTACAGATGTATCAGAGGGTAATGATCCATCAGTTGGA
AAGAATGTAAGAAGAAGTACTAGTTACATATACTAAGTGGTGAAGAAAGATGCTGGAACAGATGACTAC
ATGTATTTTGGAAATCAAAACAAAGGATGGAAAACTCAAGAATGGGAAATGGACAACCCAGGAAATGAT
TTTATGACTGGAAGTAAAGATACTTATACTTTCAAATTAAGATGAAAATCTAAAAATTGATGATATAC
AAAATATGTGGATTAGAAAAAGAAAATATACAGCATTCCCAGATGCTTATAAGCCAGAAAACATAAAGG
TAATAGCAAATGGAAAAGTTGTAGTGGACAAGGATATAAATGAGTGGATTTCAAGGAAATCAACTTATAA
TATAAAATAAAGTAAAAAATAATTAATGGTTTTGGTGGTATTTACAAAATAAAGCTTAGGAAAGATA
AAGTCTTTCTTAAGCTTTTTATTTTACTTATTTTATGATTTAGGGATTATTACTTTAAGTAATAATCCTTTT
GTTTTAAGAATATAATCAATAAGAATATGGTTTCTATATTAGGGGGATTA

Рисунок 15 – Локализация праймеров и зонда на нуклеотидной последовательности гена phospholipase C (plc) для Clostridium perfringens.

Primer_F **AACGTAGCTGTAGATAGAAGTGC**
Primer_R **CTTCCATCAGCTAAGTACTATTT** (aaatagtaacttagctgatggaag)
Probe **(BHQ1)-TTAGATGGTGGT(FAMdT)TCAAAGGAGAATTCCAA**

>gi|295986930|gb|GU266539.1| Clostridium chauvoei strain BC138-06 flagellin (fliC) gene, partial cds
CTGGAGATGATGCTGCAGGACTAGCAATCTCAGAAAAAATGAGAGGTCAAATTAGAGGATTAGATCAAG
CATCAAGAAATGCTCAAGAYGGTATTTCAATTAATTCAAACAGCTGAAGGAGCTTTARSWGAAACTCACTC
AATTCCTCAAAGAATGAGAGAATTATCAGTACAATCAGCTAACGATACA**AACGTAGCTGTAGATAGAAGT**
GCTATCCAAGATGAAATAAACTCATTAACAGAAGAAATAAACAGAATATCAGGAGATACTGAATTCAAT
ACTCAAAAAGTTA**TTAGATGGTGGTTTCAAAGGAGAATTCCAA**ATTGGAGCTAACTCAAACCAAACAGTTA
AATTAGATATCGGAAACATGAGTGTGCAAGTTTAGGATTAACATACTAACTCACTTGAAGCAAAGC
ATTAGCATT**AAATAGTAACTTAGCTGATGGAAG**TTATAAAATATCAGGAACTAATTTAGTAGATACAAAT
GGGAATACTGTTGGTACATTTAATAGTGGAGCTAAAAAGATAGTAGTTAATGGACAAGATACAGTATTTA
CTAAAGCAGCATTAGCTGATGGTGTGTTT

Рисунок 16 – Локализация праймеров и зонда на нуклеотидной последовательности гена flagellin (fliC) Clostridium chauvoei

Primer_F **GGAGCATCAAGTAAAGCGTA**
Primer_R **CATTCGGATCATAATCAGGA** (tcctgattatgatccgaatg)
Probe **(BHQ1)-GAACTCATTCCA(FAMdT)GATTGTAACACAAGCAG**

>gi|1255550|dbj|D32125.1|CLOPLC3 Clostridium novyi (strain CL49) plc
gene for phospholipase C, complete cds
CCTTTTTCTTATTTAAAAGGACATACAAGGAATAATATGAATTTAAATATGAACAAAACGTTTTCAAATAG
AGATTTTTTTGTATACTATAAATGAGAGGGGGAGTAATATATGAAGAAAAATTTTTAAAAGGTTTATGT
TGTGCTTTTGTAAATTTCAATCACATGTTTA **GGAGCATCAAGTAAAGCGTA** TGGATGGGATGGTAAAAAAG
ATGGTACAG **GAACCTCATTCCATGATTGTAACACAAGCAG** TTTAAAGTGCTAGAAAATGATATGTCAAAGGA
TGAACCTGAAATTGTAAAGCAGAACTTTAAAATACTACAAGATAATATGCATAAATTTTCAGTTAGGATCT
ACTTA **TCCTGATTATGATCCGAATG** CGTACAAGCTATTCCAAGATCATTTTTGGGACCCCGATACAGATCA
TAATTTTTCAAAGGATAATTTGTGGTATCTTTCATATTTCAATAAAAGATACAGCTGAATCACAAGTAAGAA
AGTTTACAGCATTAGCTAGAAAATGAATGGGAAAAAGGAAATTTATGAAAAGGCAACATGGTATTTCCGGAC
AAGSTATGCATTACTTTGGAGATTTAAATACTCCATATCATGCAGCAAATGTAACAGCAGTAGATAGTAT
AGGACACACTAAATATGAAGGATTTGCAGAAAAAAGAAAAAGACCAATATAGAATTAATACAACAGGTAT
TAAAACAAATGAAGGCTTTTATGCTGATGCATTAATAAATAGTAATTTTGATTCCTGGTCAAAAAGAGTAT
TGTAAGGTTGGGCAAAACAAGCTAAAAAATTATTTACAGTCATTTCTACTATGAAACATACAATGAAG
AAAAATAAAAAAASSAAGTATTAAGTTTAGTGATATAAATCGTATGTGGATTAGAAAAGCAAACSTTTACT
CCAGTTTCAGATGATTGGAAGGTAAAGGGTATAAAAGTTATTGCCGATGGTTCTGTTCAATATGAAAAAC
AAATAAATAAATGGATTTCATGGAAATGAAAAATACTATATAAATAAATAATATGAATTTTAAAGTACGATC
TAAAAGCSTTATTCAATAATTTGCATTGAATAAGGCTTTTATTAAATATATCTTATTATATTATAGTGTA
TATAGTAAAATGTATTAAAGTAAAATATTCATAAGGGG

Рисунок 17 – Локализация праймеров и зонда на нуклеотидной последовательности гена phospholipase C (plc) для Clostridium novyi

Таким образом, с использованием современных компьютерных программ проведено компьютерное моделирование, конструирование праймеров и зондов для детекции Clostridium septicum, Clostridium chauvoei, Clostridium novyi, Clostridium perfringens.

Сконструированные праймеры и зонды были синтезированы на автоматическом синтезаторе амидофосфитным методом.

3.4 Обработка и оптимизация параметров ПЦР. Подбор и обработка температурно-временного режима

На взаимодействие между отдельными нитями, дуплексами, петлями шпилек и другими типами молекул, формируемых в течении ПЦР, влияет ряд параметров. Использование произвольных праймеров требует определенных условий реакции, от которых зависит воспроизводимость результатов. Для поддержания необходимого равновесия эти условия должны быть тщательно оптимизированы. Такие параметры, как продолжительность и температура отжига, элонгации, денатурации, число циклов, скорость нагрева и охлаждения, концентрация праймеров, матрицы, ионов, источник и качество ДНК-полимеразы, влияющие на результат амплификации, по нашему мнению, должны быть стандартизированы. На результатах сказывается и качество препаратов геномной ДНК. Кроме того, использование различных по размерам и нуклеотидному составу олигонуклеотидов требует и особых условий проведения реакции. Критическим является температура отжига, так как денатурация и элонгация, проводится всегда при фиксированной температуре (температура денатурации ДНК от 90 до 95, а элонгация от 68 до 74 градусов) и изменения не играют существенной роли в амплификации. Отжиг - эта та стадия от которой во многом зависит амплификация нужного фрагмента и его количественный выход. Воспроизводимый с максимальным выходом продукт

амплификации можно получить только при оптимальных условиях проведения реакции. По этой причине была предложена модель полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами. Результаты данной модели использовались при оптимизации условий проведения температурного режима отжига.

Идентификацию (секвенирование) микроорганизмов проводили по методу Сенгера, для подтверждения чистоты используемых культур, которые в дальнейшем будут использоваться на всех этапах оптимизации ПЦР-реакции. Поэтому очень важно иметь точное подтверждение наличия чистой культуры интересующего нас организма.

Для реакции секвенирования нами были использована следующая пара праймеров: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 806R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3'). После проведения ПЦР амплификации нами был проведен электрофорез для подтверждения наличия ампликонов.

Сравнительный анализ отсеквенированных нуклеотидных последовательностей с последовательностями, депонированными в GenBank, проводили с использованием программы BLAST на сайте NCBI. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма Clustal W и путём построения филогенетических деревьев в программе MEGA 6.0 при помощи метода связывания ближайших соседей.

В результате сравнения отсеквенированных последовательностей с депонированными в GenBank первоначальная видовая идентификация была подтверждена для всех анализируемых штаммов: *Clostridium septicum* – процент совпадения 99%, *Clostridium perfringens* – 99%, *Clostridium chauvoei* – 100%, *Clostridium novyi* – 99% (таблица 14):

Таблица 14 - Результаты идентификации методом анализа нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA

Наименование штамма	Последовательность фрагмента 16S rRNA гена	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) алгоритм BLAST		
		Инв. номер Gene Bank (Accession number)	Наименование штамма	% совпадения
<i>Clostridium perfringens</i>	TGATTTATTATTAATTTAGGTTTTTACAAGG ATTAACATACAAAACATCCATAAATGAA TAGTAATTGAATATAATATCTATAAACTTTT CCTAGTGTGTCAATATATGATATACAGAGA AAATAAAAGGATTTAAAAGATTAGTTTGA TGTTTTTCAAAAACSTAAAGTAAAATTTAAA TTAAATTAAGAAATGGTGTAAAGATAATA CCTGTCACTAAGGACGGGCAACAAAAAAA GACAATAAGTTGAAAGAAAACAACSTAAA AAGTTTT	M69264.1	<i>Clostridium perfringens</i>	97
		NZ_JH59453 7.1	<i>Clostridium perfringens</i>	91

Clostridium septicum	CGCTACAAGATGGGCCCCGCGGCATTAGC TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCG ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT GCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAAC GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCG TAAAGCTCTGTCTTCAGGGACGATAATGAC GGTACCTG	AB678788.1	Clostridium septicum	96
		AB678779.1	Clostridium septicum	95
		LC019776.1	Clostridium septicum	89
Clostridium chauvoei	CGCTACAAGATGGGCCCCGCGGCATTAGC TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCG ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT GCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAAC GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCG TAAAGCTCTGTCTTCAGGGACGATAATGAC GGTACCTGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAA AGGGAGCGTAGGCGGACTTT	NR_026013.1	Clostridium chauvoei	99
		AB040712.1	Clostridium chauvoei	94
Clostridium novyi	ACGGTACCTAATGAGGAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGT AAAGAGTATGTAGGTGGGCATTTAAGTCAG ATGTGAAATCCCGGGCTTAACCTGGGAGC TGCATTTGATACTGGGTGTCTAGAGTGACG GAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACA GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACTGTA ACTGA	AB045606.1	Clostridium novyi	93
		JENW01000159.1	Clostridium novyi	91
		JENW01000165.1	Clostridium novyi	90

Данные последовательности были получены путем наложения отсеквенированных последовательностей от прямого и обратного праймера с помощью программы SeqMan (Lasergene 6). Расшифрованная нуклеотидная последовательность фрагментов гена 16S r RNA совпадает с результатами сиквенса, представленными в GeneBank.

Следующим немаловажным этапом при разработке ПЦР является подбор и отработка параметров температуры и времени циклов амплификации. Температура денатурации подбиралась между 92-95⁰С, отжига – 58-66⁰С, элонгации – 70-75⁰С. Температура, при которой денатурируется двуспиральная ДНК-матрица, зависит от содержания в ней GC оснований. При высоком содержании GC оснований, для полного расхождения цепей в молекуле ДНК необходима более высокая температура. Так же более длинные матрицы ДНК требуют большей температуры для полной денатурации. Очень низкая температура денатурации, или короткая продолжительность времени денатурации приведут к тому, что участки ДНК с высоким содержанием GC оснований не расплетутся, а денатурируют только регионы богатые АТ-основаниями.

Одним из немаловажных факторов также является подбор оптимальной температуры отжига праймеров. Как упоминалось, температура отжига зависит от длины праймера и содержания в нем GC-пар. Праймеры, присутствующие в реакционной смеси, не вступают в реакцию и не образуют связей при

температуре 90-95⁰С. Они способны отжигаться с комплиментарными последовательностями на матричных нитях при температуре в пределах 50-65⁰С. В наших опытах оптимальную температуру отжига определяли на термоциклире с градиентом температур QuantStudio 5, используя градиент температур 58-66⁰С. Полученные результаты представлены на рисунке 18.

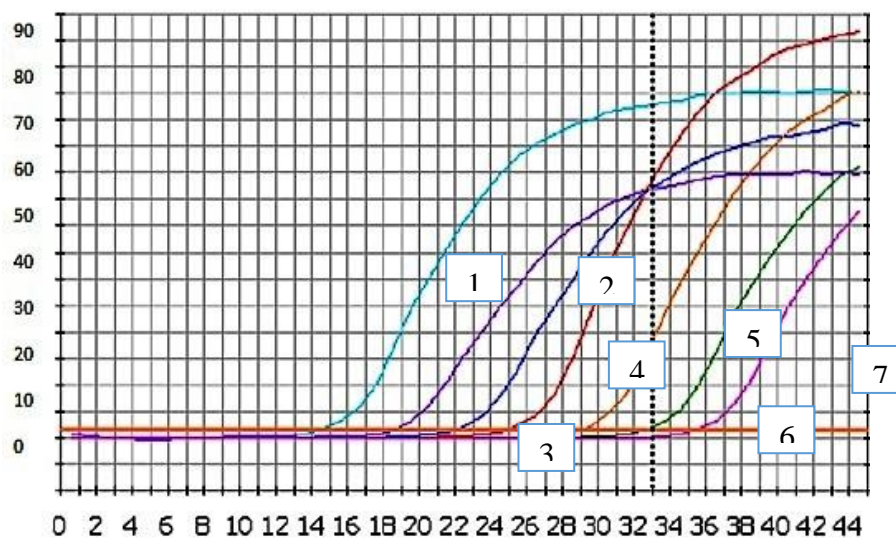
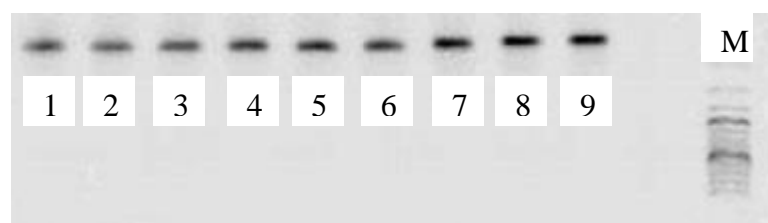


Рисунок 18 - Графики накопления флуоресцентного сигнала при амплификации с градиентом температур (1 – 58,0⁰С, 2 – 58,5⁰С, 3 – 60⁰С, 4 – 61,5⁰С, 5 – 63, ⁰С, 6 – 64,7⁰С, 7 – 66,0⁰С)

Из рисунка 18 видно, что отжиг праймеров происходит на всем промежутке температур выбранных нами, лишь с той разницей, чем выше температура, тем позже начинает накапливаться флуоресценция. В дальнейших наших экспериментах при проведении ПЦР для детекции ДНК *Clostridium* использовали 58⁰С.

Время синтеза определяется скоростью работы Таq-полимеразы и длиной амплифицируемого фрагмента. При расчётах учитывали, что для синтеза продукта размером 1000 п.о. необходима 1 минута, чтобы достроить вновь синтезированные комплементарные цепи ДНК. Введение же в конце дополнительного времени синтеза (5 мин) при 72⁰С обеспечивает завершение синтеза всего имеющегося неполного амплификата.

В процессе исследований было изучено влияние продолжительности синтеза на наработку ПЦР продукта. Сокращение времени синтеза, позволяет сократить время постановки диагноза. Поэтому, при отработке параметров метода ПЦР большое значение было уделено экспериментальной оптимизации времени синтеза для амплификации продукта. Первоначально синтез проводили в течение 1 мин, далее уменьшали время на каждые 10 с. Результаты исследований представлены на рисунке 19.



Примечание - М – маркер ДНК 50 bp DNA Ladder, 1 – отрицательный контроль, 2 – 10 с синтез, 3 – 15 с, 4 – 20 с, 5 – 25 с, 6 – 30 с, 7 – 40 с, 8 – 50 с, 9 – 60 с.

Рисунок 19 - Электрофореграмма амплифицированной ДНК при различной продолжительности синтеза

Из рисунка 19 видно, что при проведении синтеза в течение 10 секунд амплификаты отсутствуют. За 15 секунд нарабатывается ПЦР-продукт с очень низкой специфичностью. При проведении синтеза от 20 до 60 секунд в пробах нарабатывается достаточное количество ПЦР-продукта. Таким образом, полимеразы полностью достраивает вновь синтезированные комплементарные цепи ДНК за 20 секунд. В дальнейших экспериментах синтез ПЦР-продукта проводили в течение 20 секунд.

Таким образом, экспериментальным путем отработаны и оптимизированы основные параметры ПЦР.

На основании выбранных в процессе экспериментов оптимальных параметров времени и температур для всех стадий амплификации, был составлен следующий режим для проведения ПЦР:

пре-денатурация - 95 ⁰ С - 4 мин	
денатурация - 95 ⁰ С - 30 с	} 30 циклов
отжиг: 58 ⁰ С - 30 с	
синтез: 72 ⁰ С - 20 с	
пост-репликация 72 ⁰ С - 5 мин.	

3.5 Подбор оптимальных условий проведения ПЦР (концентрация компонентов реакционной смеси, буферного раствора)

После того как были определены временные и температурные условия амплификации, проводили оптимизацию содержания компонентов в реакционной смеси и отработку ПЦР экспериментальным методом. Обычно в состав реакционной смеси входят следующие компоненты: фермент Taq – полимеразы (Taq DNA Polymerase (recombinant)), 1,5 mM MgCl₂, смесь четырех dNTP, 10x Taq Buffer для ПЦР, прямые и обратные праймеры, зонд, образец ДНК, деионизированная вода.

Известно, что на результаты амплификации оказывает большое влияние концентрация магния хлорида в реакционной смеси.

Концентрация MgCl₂ в значительной степени определяют специфичность и чувствительность ПЦР, влияет на отжиг праймеров, денатурацию образца, кроме того, MgCl₂ необходим для поддержания активности Taq-полимеразы. Однако, избыток хлорида магния может вызывать получение неспецифического

амплификата. В случае изменения концентрации происходит качественное или количественное изменение получаемого амплификата.

В опыте по оптимизации концентрации $MgCl_2$ исследовался достаточно широкий градиент количества $MgCl_2$ в реакционной смеси. На рисунке 20 показаны графики амплификации при различном количестве внесенного в реакционную смесь раствора $MgCl_2$.

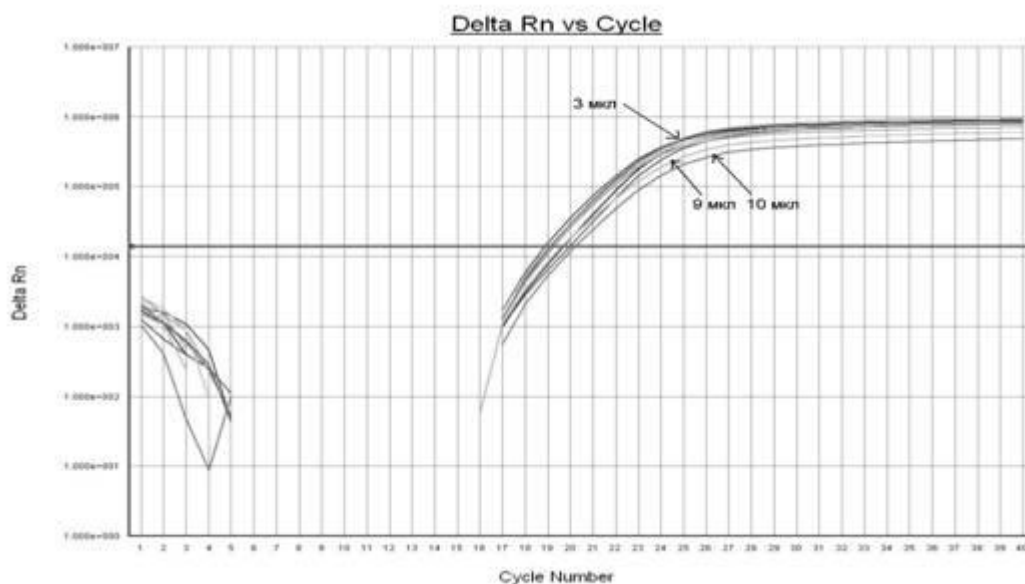


Рисунок 20 – Кривые амплификации, полученные в опыте по оптимизации количества $MgCl_2$ в реакции

В ходе анализа результатов было отмечено, что амплификация проходила одинаково эффективно при широком значении концентраций ионов Mg^{2+} .

Путем эмпирического сравнения графиков амплификации оптимальное значение концентрации $MgCl_2$ в реакционной смеси составило 3 мМ (3 мкл 25 мМ раствора $MgCl_2$ в 25 мкл реакционной смеси). Более высокие концентрации ионов магния, оказывая незначительное ингибирующее действие, слегка снижают эффективность реакции на 1-1,5 значения порогового цикла.

В итоге ПЦР-смесь имела следующий состав: праймер F (10 пмоль) - 1,5 мкл, праймер R (10 пмоль) - 1,5 мкл, dNTP 2 мМ - 3 мкл, Buffer KCl 10x - 3 мкл, $MgCl_2$ 25 мМ - 3 мкл, Taq Polymeraza - 0,2 мкл, DNA - 5 мкл. Для проведения ПЦР-РВ также добавлялся зонд (3.5 пмоль), воды до 25 мкл

Таким образом, экспериментальным путем подобраны оптимальные условия проведения ПЦР. Для ПЦР диагностики клостридий подобран оптимальный объем реагентов, входящий в реакционную смесь.

3.6 Определение чувствительности и специфичности, разработанной ПЦР. Проведение исследований с разными концентрациями ДНК.

Чувствительность и специфичность - основные достоинства, определяющие преимущество метода ПЦР по сравнению с традиционными методами. Специфичность метода ПЦР основана на уникальности ДНК, поэтому многократно превосходит другие методы диагностики, в том числе ИФА.

После определения основных параметров разрабатываемого метода ПЦР для диагностики клостридиозов, были проведены эксперименты по определению чувствительности и специфичности данного метода.

Так же была проведена амплификация с использованием различных концентраций ДНК-материала: однократное (10 нг), 2-кратное (8 нг), 3-кратное (6 нг), 4-кратное (4 нг), 5-кратное (2 нг) разведение ДНК (рисунок 21).

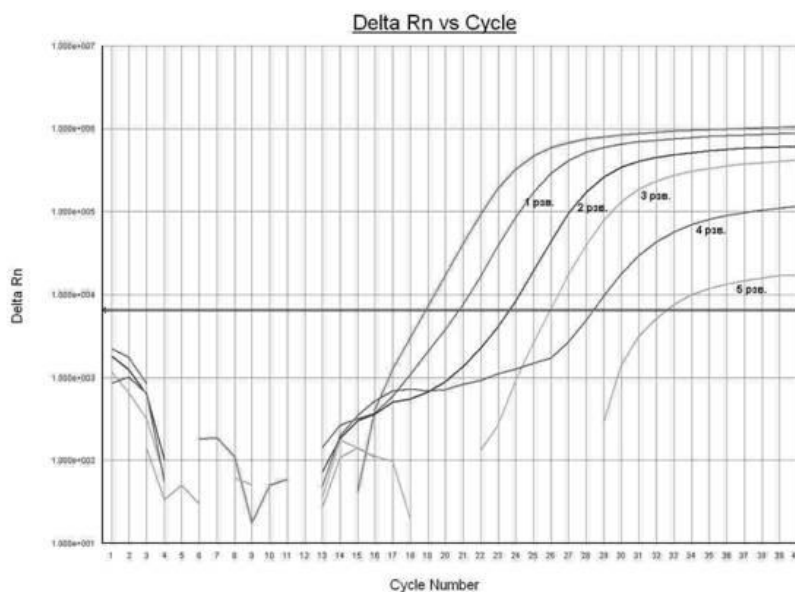


Рисунок 21 - Проведение амплификации с использованием ДНК-матрицы различной концентрации

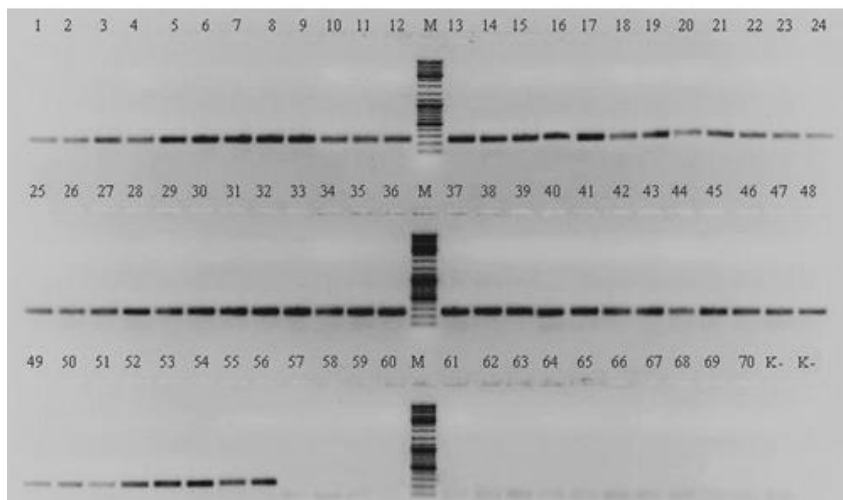
Из рисунка видно, что с уменьшением концентрации ДНК увеличивается пороговый цикл, похожий эффект наблюдается и при увеличении концентрации ДНК. Следовательно, оптимальной концентрацией ДНК является 10 нг/мкл.

Проведен сравнительный анализ с данными литературы. В работе Nagai S, чувствительность метода ERIC -ПЦР для диагностики *Clostridium difficile* с использованием праймеров на участок *toxA* гена достигала всего 25 пг. Порог чувствительности метода геномных «отпечатков пальцев» ПЦР в работах индийских ученых составил 1-10 нг. Метод ПЦР разработанный Saxena МК, et al. при диагностике пастереллеза позволяет выявлять ДНК пастерел в количестве 500 нг-50 фг в пробе.

Полученные последовательности пар праймеров были дополнительно протестированы на специфичность с помощью моделирования ПЦР в присутствии ДНК других штаммов близкородственных микроорганизмов (*Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium oedematiens*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium tyrobutyricum*), последовательности которых имеются в компьютерной базе Genbank. Дополнительно были исключены пары праймеров, работа которых не стабильна.

Экспериментально специфичность ПЦР-протокола была проверена на 70 образцах ДНК (рисунок 22). ПЦР была выполнена в общем объеме 25 мкл.

В состав реакционной смеси входили: праймер F (10 пмоль) - 1,5 мкл, праймер R (10 пмоль) - 1,5 мкл, dNTP 2 mM - 3 мкл, Buffer KCl 10x - 3 мкл, MgCl₂ 25 mM - 3 мкл, Taq Polymeraza - 0,2 мкл, DNA - 5 мкл. Для проведения ПЦР-РВ также добавлялся зонд (3.5 пмоль), воды до 25 мкл.



1-24 – ДНК *Clostridium septicum* ; 25-36 – ДНК *Clostridium perfringens*; 37-48 – ДНК *Clostridium chauvoei* ; 49- 56 ДНК *Clostridium novyi*; 57 *Clostridium difficile*, 58 - *Clostridium oedematiens*; 59- *Clostridium sordellii*, 60 - *B melittensis*; 61 - *Mycobacterium bovis*; 62 - 65 - *E. coli*; 66 - 70 – сапрофитные микроорганизмы: *Lactobacillus spp.*; *Enterococcus spp*
 М – маркер молекулярного веса (Fermentas) (100 – 10000 п.н.)

Рисунок 22 – Электрофорерограмма оценки специфичности разработанного протокола выявления клостридий

Из результатов, приведенных на рисунке 22, видно, что разработанный ПЦР-протокол позволяет амплифицировать фрагмент целевого гена *rphB1* только в образцах, содержащих ДНК клостридий. Отсутствие неспецифических ПЦР-продуктов в образцах ДНК посторонней микрофлоры доказывает специфичность отжига праймеров на целевые фрагменты ДНК.

Таким образом, полученные результаты указывают на высокую специфичность разработанного протокола. По литературным данным, порог чувствительности различных модификаций метода ПЦР для выявления ДНК клостридий варьирует в пределах 50 фг до 500нг. Результаты наших исследований по определению чувствительности не уступают аналогичным работам зарубежных ученых.

3.7 Определение специфичности, разработанной ПЦР, проведение ПЦР исследований с ДНК близкородственных микроорганизмов

В результате проверки комплементарности подобранных праймеров к имеющимся в базе GenBank генам *alpha-toxin*, *phospholipase C*, *flagellin* было

установлено, что сконструированные олигонуклеотиды в разной степени специфичны генам, кодирующим продуцирование α -токсина (alpha-toxin), фосфолипазы, гидролизующей фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой (plc) и флагеллин, являющимся белковой субъединицей, которая полимеризуется с образованием нитей бактериальных жгутиков (fliC).

Пара праймеров F-AACGCTAGCTGTAGATAGAАСТGC и R-СТТССАТCAGСТАAGТТАСТАТТТ подобранных для *Clostridium chauvoei* была комплементарна flagellin (fliC) генам бактерий рода *Clostridium*. Но среди найденных с их помощью нуклеотидных последовательностей, депонированных в GenBank, был соответствующий ген topA gene грамположительной бактерии *Streptococcus salivarius* (совпадение 73%). Длина ожидаемого ПЦР-продукта составляла 302 п.н.

Пара праймеров F-CGGCAGTAGTACCACATGTA и R-TACATTTGCCCAATTTCTTA для идентификации *Clostridium septicum* в большинстве случаев была комплементарна alpha-toxin гену бактерий рода *Clostridium*. Но также среди найденных с их помощью нуклеотидных последовательностей, депонированных в GenBank, были соответствующие гены вибриона *Vibrio mimicus* и простейшего *Plasmodium malariae*.

Праймеры F-GCTAATGTTACTGCCGTTGATA и R-СТGТТССТТТТТGAGAGТТАGCT подобранные для идентификации *Clostridium perfringens* абсолютно комплементарны phospholipase C (plc) гену грамположительной бактерии рода *Clostridium*.

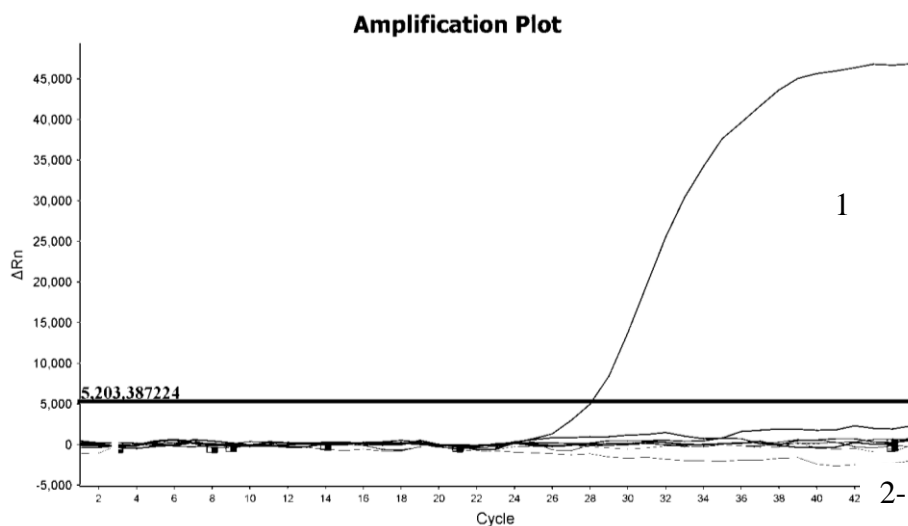
Пара праймеров F-GGAGCATCAAGTAAAGCGTA и R-SATTCGGATCATAATCAGGA подобранных для *Clostridium novyi* были комплементарны plc генам грамположительных бактерий рода *Clostridium*. Однако среди найденных в GenBank нуклеотидных последовательностей было несколько полных геномов грамположительных бактерий *Actinobacteria bacterium* и *Altererythrobacter epoxidivorans* (совпадение менее 85%). Вероятен также неспецифический отжиг на ДНК бактерий *Clostridium beijerinckii* (с длиной ожидаемого продукта реакции 436 п.н.), *Arthrobacter alpinus* (952 п.н.) при этом совпадение последовательностей ниже чем у исследуемого организма. Необходимо также учитывать, что при подборе праймеров учитывались только результаты 100% совпадений, так как, меньший процент совпадений не отжигается во время амплификации, либо отжигается незначительно и не сможет конкурировать с целевой ДНК.

После того, как нами была проведена работа и получены результаты BLAST-анализа, проводили ПЦР амплификацию в режиме реального времени с разработанными и синтезированными праймерами к бактериям *Clostridium novyi*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens*.

Виды и штаммы близкородственных бактерий, с которыми проводилась оценка специфичности разработанных нами праймеров к бактериям *Clostridium novyi*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens* были получены в РГКП «Костанайский областной центр санитарно-

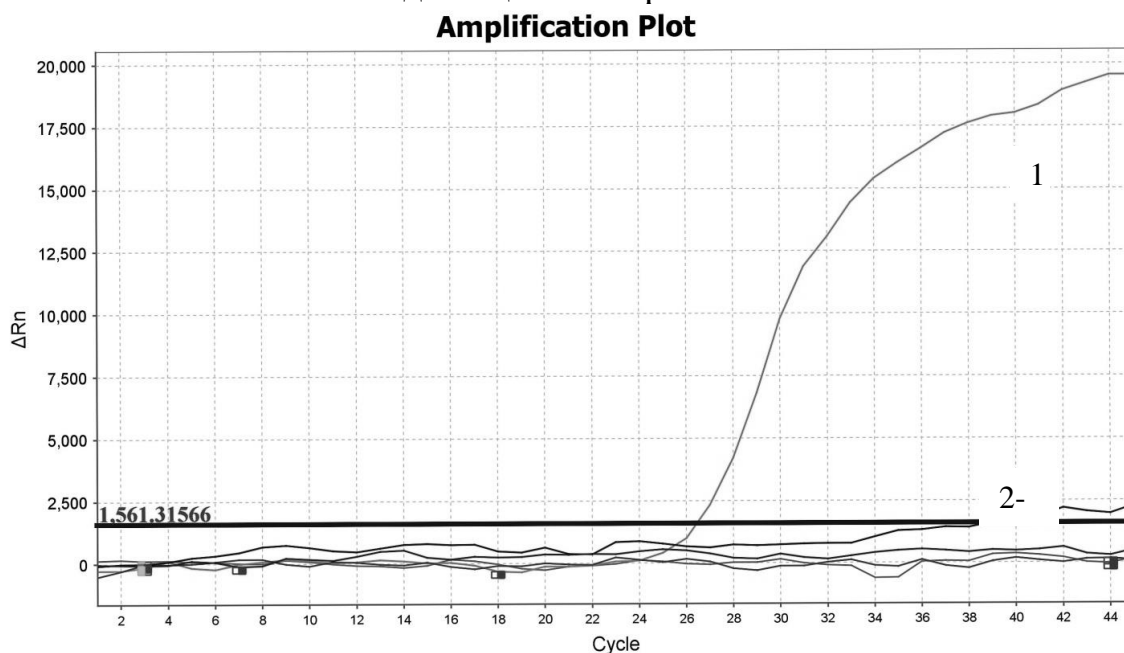
эпидемиологической экспертизы» Комитета государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения РК, а также из собственной коллекции микроорганизмов Научно-инновационного центра.

В результате проведения ПЦР анализа с подобранными нами праймерами к *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chauvoei*, *Cl. novyi* с внутривидовыми бактериями рода *Clostridium*, нами были получены следующие результаты, которые представлен на рисунках 23,24,25,26.



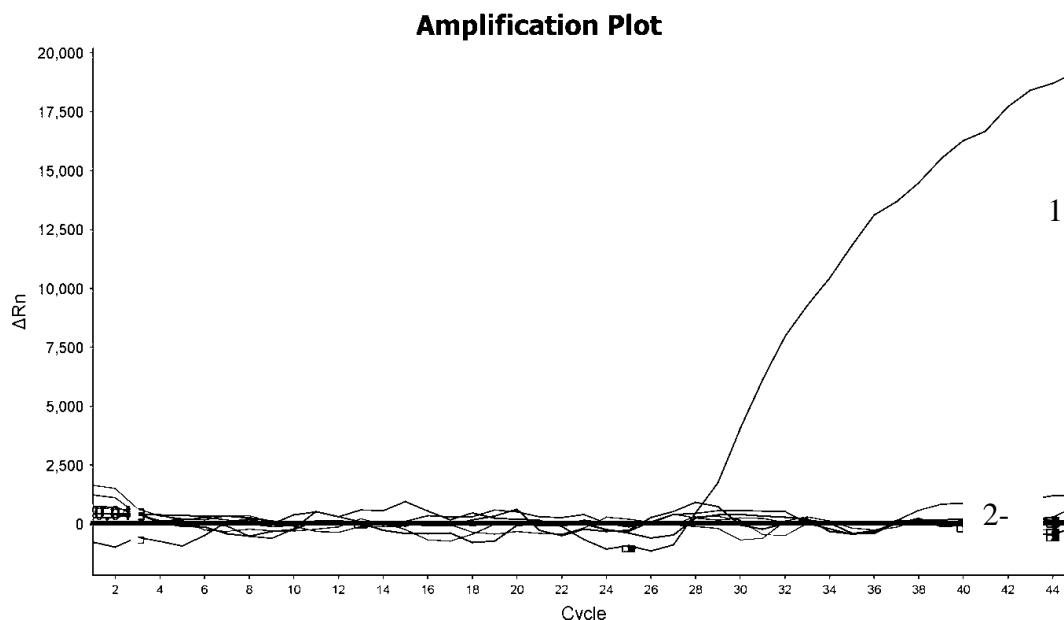
1 - *Cl. septicum*, 2 - *Cl. novyi*, 3 - *Cl. chauvoei*, 4 - *Cl. perfringens*, 5 - *Cl. difficile*,
6 - отрицательный контроль

Рисунок 23 - График амплификации с праймерами и зондом подобранными для детекции *Cl. septicum*



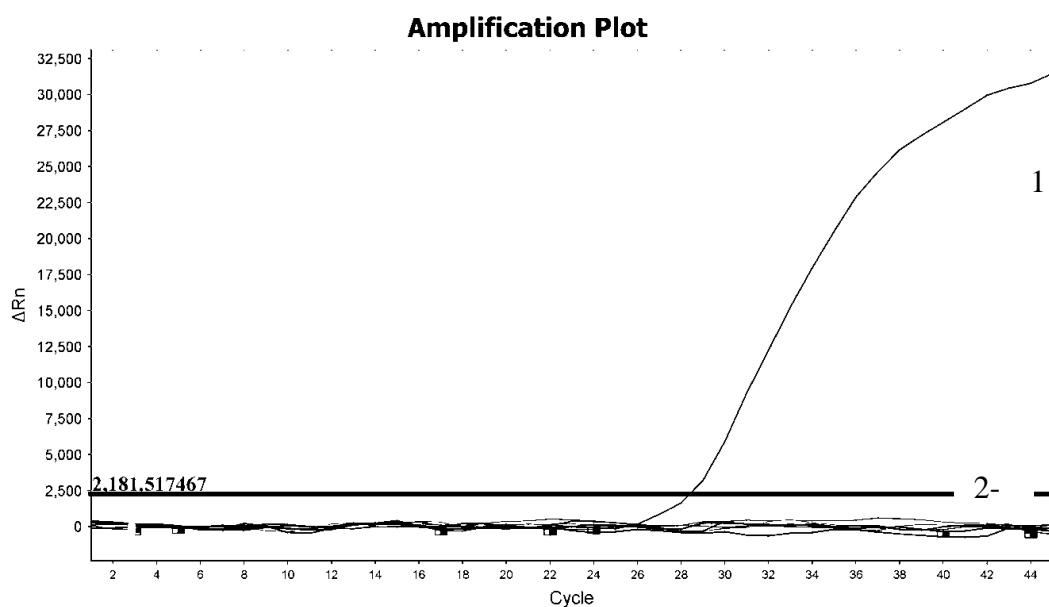
1 - *Cl. perfringens*, 2 - *Cl. novyi*, 3 - *Cl. chauvoei*, 4 - *Cl. septicum*, 5 - *Cl. difficile*, 6 - отрицательный контроль

Рисунок 24 - График амплификации с праймерами и зондом подобранными для детекции *Cl. perfringens*



1 - *Cl. chauvoei*, 2 - *Cl. novyi*, 3 - *Cl. perfringens*, 4 - *Cl. septicum*, 5 - *Cl. difficile*, 6 - отрицательный контроль

Рисунок 25 - График амплификации с праймерами и зондом подобранными для детекции *Cl. chauvoei*



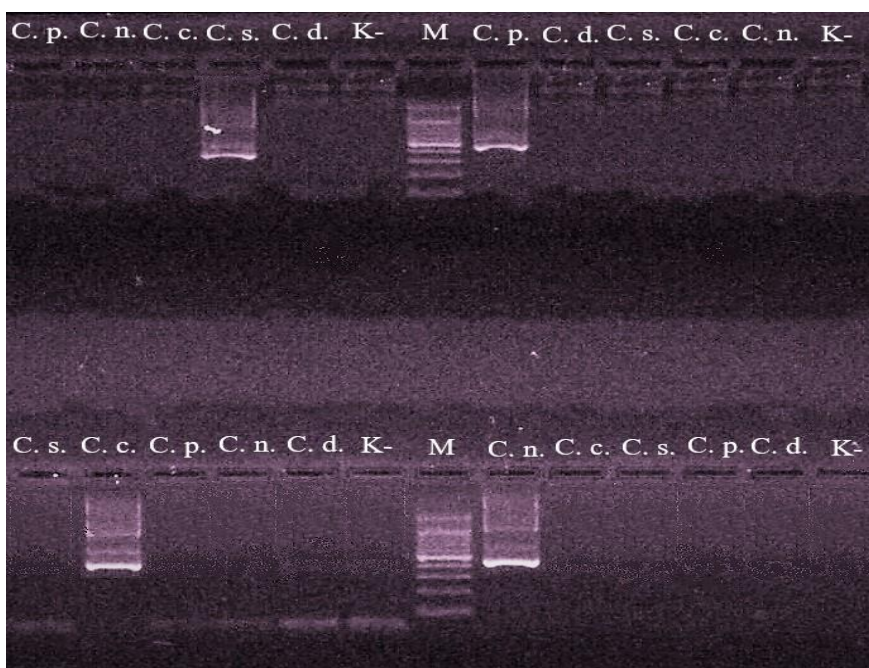
1 - *Cl. novyi*, 2 - *Cl. chauvoei*, 3 - *Cl. perfringens*, 4 - *Cl. septicum*, 5 - *Cl. difficile*, 6 - отрицательный контроль

Рисунок 26 - График амплификации с праймерами и зондом подобранными для детекции *Cl. novyi*

На рисунках, представленных выше, видно, что подобранные праймеры для *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. chauvoei*, *Cl. perfringens* не вызывают неспецифической реакции среди бактерий рода *Clostridium* и наблюдается накопление флуоресцентного сигнала только с ДНК исследуемого организма.

Также виден незначительный рост флуоресценции на поздних циклах амплификации, не выходящий за пределы порогового уровня, что не может учитываться при чтении результатов.

После проведения ПЦР в реальном времени нами для обнаружения возможных дефектов подобранных зондов для исследуемых бактерий, был проведен анализ продуктов амплификации в 2% агарозном геле при силе тока 110 V, в течении 1 часа. В случае, если зонд подобран с дефектом, может происходить накопление ПЦР продукта, но флуоресценция, и соответственно, детекция в режиме реального времени будет невозможна, то есть при проведении электрофореза, будут видны бенды в тех образцах, в которых не было накопления флуоресцентного сигнала. Результаты проведения анализа представлены на рисунке 27.



C. p. - *Cl. perfringens*, C. n. - *Cl. novyi*, C. s. - *Cl. septicum*, C. c. - *Cl. chauvoei*, C. d. - *Cl. difficile*, M – маркер молекулярных масс (50 bp), K- – отрицательный контроль

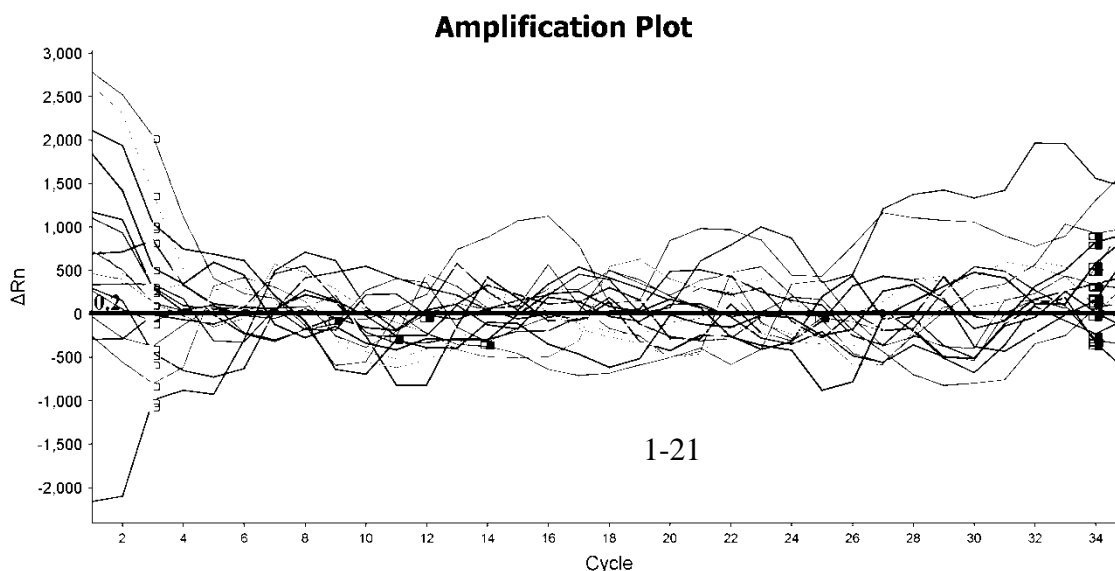
Рисунок 27 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов

Из рисунка, представленного выше, данные полученные в результате проведения электрофореза в агарозном геле, подтверждаются данными, полученным в ходе проведения ПЦР в режиме реального времени.



Рисунок 28 – Приготовление реакционной смеси

Далее нами проводился ПЦР анализ с ДНК-материалом, полученным от следующих близкородственных видов исследуемых нами бактерий рода *Clostridium*: *V. melittensis*, *Mycobacterium bovis*, *E. coli*, сапрофитные микроорганизмы: *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. При проведении ПЦР анализа в режиме реального времени состав и концентрация компонентов реакционной смеси (рисунок 28), а также режим амплификации не изменялся и был такой же, как и в предыдущих опытах. Результаты анализа представлены на рисунке 28.



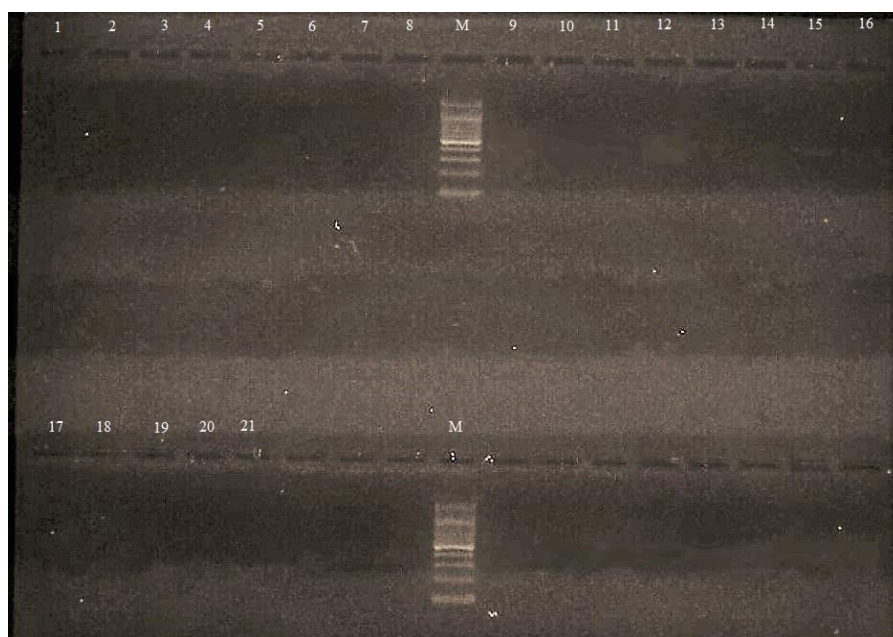
1-4 - *V. melittensis*, 5-8 - *Mycobacterium bovis*, 9-12 - *E. coli*, 13-16 - *Lactobacillus* spp., 17-20 - *Enterococcus* spp., 21 – отрицательный контроль

Примечание - 1, 5, 9, 13, 17: в амплификационную смесь добавлялись праймеры и зонд подобранные для детекции *Cl. septicum*, 2, 6, 10, 14, 18: в амплификационную смесь добавлялись праймеры и зонд подобранные для детекции *Cl. perfringens*, 3, 7, 11, 15, 19: в амплификационную смесь добавлялись праймеры и зонд подобранные для детекции *Cl. chauvoei*; 4, 8, 12,

16, 20: в амплификационную смесь добавлялись праймеры и зонд подобранные для детекции *Cl. noviy*.

Рисунок 29 - График амплификации с ДНК близкородственных микроорганизмов

Как видно из рисунка выше, подобранные пары праймеров для идентификации исследуемых нами бактериями не вызывают неспецифической реакции с близкородственными организмами. Для проверки зондов на наличие дефектов, проводили электрофорез в 2% агарозном геле при силе тока 110 V, в течении 1 часа. Детекцию результатов проводили с помощью геле-документирующей системы QUANTUM Model 1100 SUPER-BRIGHT. Результаты представлены на рисунке 30.



Примечание 1-4 - *B. melittensis*, 5-8 - *Mycobacterium bovis*, 9-12 - *E. coli*, 13-16 - *Lactobacillus* spp., 17-20 - *Enterococcus* spp., 21 – отрицательный контроль.
1, 5, 9, 13, 17: амплификация с праймерами и зондом для детекции *Cl. septicum*;
2, 6, 10, 14, 18: амплификация с праймерами и зондом для детекции *Cl. perfringens*;
3, 7, 11, 15, 19: амплификация с праймерами и зондом для детекции *Cl. chauvoei*;
4, 8, 12, 16, 20: амплификация с праймерами и зондом для детекции *Cl. noviy*.

Рисунок 30 - Результаты проведения электрофореза ПЦР-продуктов

Исходя из полученных результатов (рисунок 30) можно сказать, что результат проведения ПЦР в режиме реального времени подтверждается результатом проведения электрофореза в агарозном геле. В лунках не наблюдается положительных результатов, что говорит о специфичности подобранных праймеров и корректной работе зондов Taq Man.

3.8 Создание рекомбинантного положительного контрольного образца и внутреннего контрольного образца

Для получения «положительных» контролей для диагностики бактерий *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. perfringens*, *Cl. chauvoei* была проведена ПЦР - амплификация с ранее разработанными праймерами, указанными в таблице 1. Матрицей для синтеза специфических фрагментов были *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. perfringens*, *Cl. chauvoei*. Фрагмент гена alpha-toxin бактерии *Cl. septicum* размером 170 п.н., фрагмент гена phospholipase C (plc) бактерии *Cl. perfringens* размером 286 п.н., фрагмент гена flagellin (fliC) бактерии *Cl. chauvoei* размером 263 п.н. и фрагмент гена phospholipase C (plc) бактерии *Cl. novyi* размером 205 п.н. клонировали в плазмиду pGEM-T Easy.

Далее из проанализированных белых колоний для дальнейших исследований были отобраны образцы, имеющие соответствующую вставку. Наличие вставки определяли с помощью ПЦР со стандартными M13 праймерами, непосредственно используя в реакции, снятые стерильно белые колонии (рисунок 31).

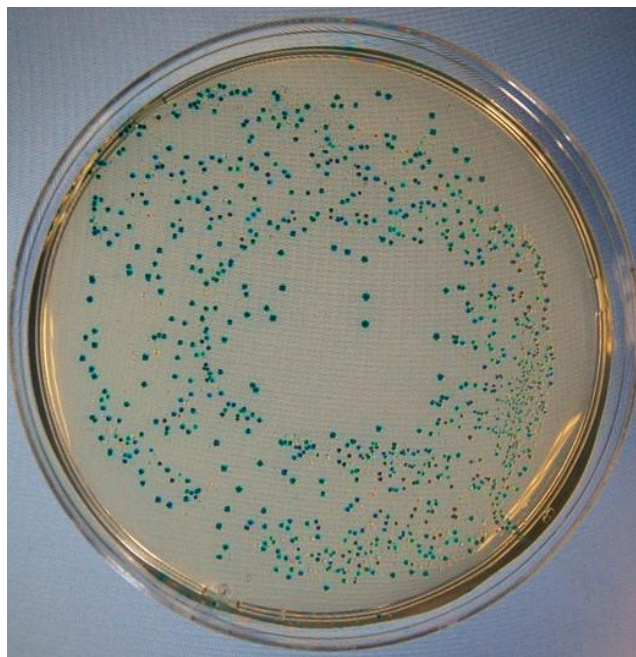


Рисунок 31 - Синие (не имеющие плазмиды) и белые (имеющие плазмиды) колонии *E. coli*

После проведения электрофореза фрагменты, несущие вставку, имели размер 170-290 п.н. плюс 220 п.н. из фланкирующих участков вектора (рисунок 32). В случае отсутствия вставки амплификаты имели размер 220 п.н.

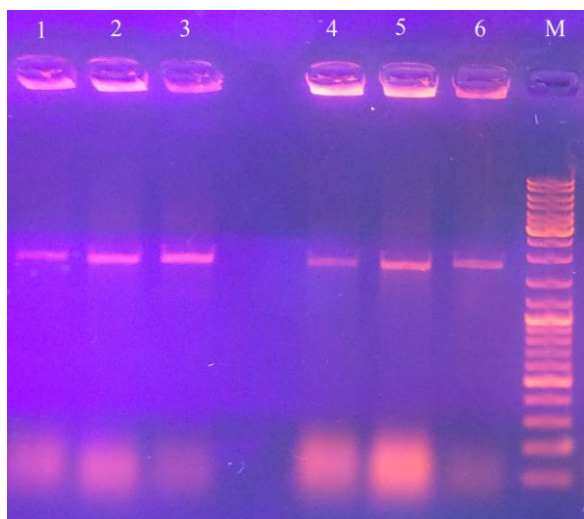


Рисунок 32 - Электрофореграмма скрининга клонов на наличие вставки

Затем проводили секвенирование полученных вставок на наличие ошибок в последовательностях. Последовательности, полученные в результате секвенирования, были сопоставлены с последовательностью исследуемых нами бактерий рода *Clostridium*. Для секвенирования использовали плазмидную ДНК. Всего было секвенировано 20 образцов плазмидной ДНК. Все последовательности ДНК были идентифицированы, ни в одной из них не была обнаружено нуклеотидных замен. Полученные последовательности были проверены по гомологии с последовательностями из Генбанка (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Массовую концентрацию плазмид определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda=260$ нм. Среднее значение концентраций рассчитывали по результатам 6-ти измерений, указанных в таблице 15. Плазмиды в десятикратных разведениях использовались в качестве матрицы при постановке ПЦР.

Таблица 15 - Массовые и молекулярные концентрации рекомбинантных плазмид

Исследуемый образец	Массовая концентрация, мкг/мкл	Средняя массовая концентрация, мкг/мкл	Молекулярная концентрация, молекул/мкл
плазида pGEM-Cl.sep	0,188	0,192±0,004	5,5 × 10 ⁷
	0,196		
	0,194		
	0,191		
	0,191		
	0,193		
плазида pGEM-Cl.per	0,207	0,215±0,008	6,1 × 10 ⁷
	0,22		
	0,217		
	0,218		
	0,218		

	0,208 0,22		
плазмида pGEM-Cl.cha	0,191 0,188 0,186 0,196 0,197 0,193	0,191±0,006	5,6 × 10 ⁷
плазмида pGEM-Cl.nov	0,21 0,22 0,207 0,216 0,202 0,214	0,211±0,009	6 × 10 ⁷

Концентрация выделенных рекомбинантных плазмид плазмида pGEM-Cl.ser, pGEM-Cl.per, pGEM-Cl.cha, и pGEM-Cl.nov оказалась равна 0,192 мкг/мкл, 0,215 мкг/мкл, 0,191 мкг/мкл и 0,211 мкг/мкл соответственно. Данная концентрация соответствует количеству ДНК для плазмиды pGEM-Cl.ser ($5,5 \times 10^7$ молекул/мкл), для плазмиды pGEM-Cl.per ($6,1 \times 10^7$ молекул/мкл), для плазмиды pGEM-Cl.cha ($5,6 \times 10^7$ молекул/мкл), для плазмиды pGEM-Cl.nov (6×10^7). В качестве матрицы при постановке ПЦР использовали серию разведений исходных плазмид. Положительный сигнал в реакциях был получен при использовании всех разведений плазмиды, кроме 10^{-10} , однако оптимальными для использования полученных рекомбинантных плазмид являются разведения $10^{-2} - 10^{-6}$.

Таким образом, были получены генно-инженерные положительные контроли, представляющие собой плазмиду со вставкой фрагмента генов phospholipase C (plc), flagellin (fliC) и alpha-toxin исследуемых бактерий *Cl. septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. perfringens*, *Cl. chauvoei*.

4. Лабораторные и производственные испытания тест-системы.

Разработанную тест-систему ПЦР в реальном времени можно использовать для быстрой и эффективной диагностики возбудителей клостридиозов, как в культурах, так и в образцах первичного биологического материала. В комплект стандартного набора каждой разработанной тест-системы входит:

- набор для экстракции ДНК (оптимизированный протокол, основанный на использовании лизирующего раствора, содержащего гуанидинтиоцианат, ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100 с добавлением додецилсульфата натрия (SDS);

- два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК;

- флуоресцентный зонд;

- термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому

используют фермент, выделенный из термофила — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза);

- дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора; содержит соли, бычий сывороточный альбумин;
- положительный контрольный образец.

После того как были определены временные и температурные условия амплификации, проводили оптимизацию содержания компонентов в реакционной смеси и отработку ПЦР экспериментальным методом.

В итоге ПЦР-смесь имела состав, указанный в таблице 2.

Также в состав наборов входят инструкции для применения разработанных тест-систем.

Результаты проделанной научно-исследовательской работы были опубликованы в зарубежных изданиях с ненулевым импакт-фактором и доложены на зарубежных и республиканских конференциях.

Для подтверждения работоспособности тест-систем, были проведены комиссионные лабораторные и производственные испытания на базе «Костанайской НИВС» филиала ТОО «КазНИВИ» и РГП на ПХВ "Республиканская Ветеринарная Лаборатория" КВКиН при МСХ РК. По результатам комиссионных испытаний составлены акты комиссионных лабораторных испытаний (ПРИЛОЖЕНИЕ А и ПРИЛОЖЕНИЕ В). Разработана инструкция по применению разработанных тест-систем (ПРИЛОЖЕНИЕ С).

По итогам проделанных научных исследований показана возможность определения четырех видов бактерий рода *Clostridium* в ходе ПЦР реакции в реальном времени, что позволит существенно сократить время проведения анализа. Все это делает метод ПЦР в реальном времени незаменимым для лабораторной диагностики и проведения мониторинга заболеваний, вызванных бактериями рода *Clostridium*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных научных исследований за 2015-2017 гг. были получены следующие результаты:

- с целью выделения патогенных штаммов клостридий исследовано 303 пробы материала, выделено всего 86 культур, из них патогенных штаммов всего 46: *C. septicum* -12, *C. novyi* – 13, *C. perfringens* -12, *C. chauvoei* – 4, создана коллекция данных микроорганизмов, которые будут использованы в дальнейшем для выделения ДНК;

- проведен анализ оптимальных методов выделения ДНК *C. perfringens*, *C. septicum* и *C. novyi*, *C. chauvoei*. Метод с применением лизирующего буфера, содержащего 5 М гуанидинтиоцианат, 25 мМ ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X-100, додецилсульфата натрия (SDS) и с последующей экстракцией фенол/хлороформом явился самым оптимальным: (E260/E280) имело среднее значение $1,81 \pm 0,06$.

- для подбора праймеров и зондов к *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chauvoei* и *Cl. novyi* в качестве мишеней были выбраны ген alpha-toxin, *plc* и *fliC*.

Подобраны видоспецифичные праймеры к *Cl. septicum*: Primer_F CGGCAGTAGTACCACATGTA и Primer_R TACATTTGCCCAATTTCTTA (alpha-toxin gene);

Cl. perfringens: Primer_F GCTAATGTTACTGCCGTTGATA, Primer_R CTGTTCCSTTTTGGAGAGTTAGCT (*plc* gene); *Cl. chauvoei*: Primer_F AACGTAGCTGTAGATAGAACTGC, Primer_R CTTCCATCAGCTAAGTTACTATTT (*fliC* gene); *Cl. novyi*: Primer_F GGAGCATCAAGTAAAGCGTA, Primer_R CATTCGGATCATAATCAGGA (*plc* gene).

Подобраны флуоресцентно – меченные зонды, обеспечивающие детекцию целевых патогенов методом ПЦР – РТ:

(BHQ1)-GGGGATATGCAAA(FAMdT)CATAATAATGCTTCTT - *Cl. septicum*;

(BHQ1)-AGTCCCAATCA(FAMdT)CCCAACTATGACTCATGC – *Cl. perfringens*;

(BHQ1) - CAACATACTGACA(FAMdT)CGTTTCACAGACCGGTCA – *Cl. chauvoei*;

(BHQ1)-GAACTCATTCSSA(FAMdT)GATTGTAACASCAAGCAG – *Cl. novyi*.

- на основании выбранных в процессе экспериментов оптимальных параметров времени и температур для всех стадий амплификации, был составлен следующий режим для проведения ПЦР:

пре-денатурация - 95 ⁰ С - 4 мин	} 30 циклов
денатурация - 95 ⁰ С - 30 с	
отжиг - 52 ⁰ С - 30 с	

синтез - 72⁰С - 20 с

пост-репликация - 72⁰С - 5 мин;

- для корректной работы тест-системы необходимо использовать реакционную смесь следующего состава: праймер F (10 пмоль) - 1,5 мкл, праймер R (10 пмоль) - 1,5 мкл, dNTP (2 mM) - 3 мкл, Буфер KCl 10x - 3 мкл, MgCl₂ (25 mM) - 3 мкл, Taq Polymeraza - 0,2 мкл, DNA - 5 мкл. Для проведения ПЦР-РВ также добавлялся зонд (3.5 пмоль), воды до 30 мкл;

- проведены исследования подтверждающие высокую специфичность и чувствительность разработанной тест-системы. Полученные результаты указывают на высокую специфичность разработанного протокола. По литературным данным, порог чувствительности различных модификаций метода ПЦР для выявления ДНК клостридий варьирует в пределах 50 фг до 500 нг.;

- оптимальными для использования полученных рекомбинантных плазмид являются разведения 10⁻² – 10⁻⁶;

- разработаны стандартные наборы для детекции исследуемых бактерий, в комплект стандартного набора входит:

- набор для экстракции ДНК;

- два праймера (прямой и обратный);

- флуоресцентный зонд;

- Taq-полимераза;

- дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);

- ионы Mg²⁺;

- буферный раствор;

- положительный контрольный образец;

- инструкция для использования тест-системы (ПРИЛОЖЕНИЕ К).

Проведены комиссионные лабораторные и производственные испытания. По результатам комиссионных испытаний составлены акты комиссионных и производственных лабораторных испытаний.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Albin S, et al. 2008. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Vet. Microbiol.* 127:179 – 185.
2. Andersson A, Rönner U, Granum PE. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* 28:145–155.
3. Anonymous. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. *EFSA J.* 199:1– 65.
4. Anonymous. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. *EFSA J.* 175:1– 48.
5. Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, Goethe R. 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 100:11–16.
6. Chalmers G, et al. 2008. Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J. Clin. Microbiol.* 46:3957–3964.
7. Chen Y, McClane BA, Fisher DJ, Rood JI, Gupta P. 2005. Construction of an alpha-toxin gene knockout mutant of *Clostridium perfringens* type A by use of a mobile group II intron. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7542– 7547.
8. Cilliers FJ, Warren RM, Hauman JH, Wiid IJF, van Helden PD. 1997. Oligonucleotide (GTG)₅ as an epidemiological tool in the study of nontuberculous mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 35:1545–1549.
9. Deguchi A, et al. 2009. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One* 4:e5598. doi:10.1371/journal.pone.0005598.
10. de Jong AEI, et al. 2003. Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods. *J. Microbiol. Methods* 54:359 –366.
11. de Jong AEI, Beumer RR, Rombouts FM. 2002. Optimizing sporulation of *Clostridium perfringens*. *J. Food Prot.* 65:1457–1462.
12. Duncan CL, Strong DH. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 16:82– 89.
13. Gevers D, Huys G, Swings J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 31–36.
14. Goldner SB, Solberg M, Jones S, Post LS. 1986. Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:407– 412.
15. Grant KA, et al. 2008. The identification and characterization of *Clostridium perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* 5:629–639.

16. Haagsma J, et al. 2009. Disease burden and costs of selected foodborne pathogens in the Netherlands, 2006. Report 330331001. RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
17. Harry KH, Zhou R, Kroos L, Melville SB. 2009. Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation-specific sigma factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 191:2728–2742.
18. Heikinheimo A, Lindstrom M, Granum PE, Korkeala H. 2006. Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1724–1729.
19. Hibberd MC, Neumann AP, Rehberger TG, Siragusa GR. 2011. Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning. *J. Clin. Microbiol.* 49:1556–1567.
20. Huang IH, Raju D, Paredes-Sabja D, Sarker MR. 2007. *Clostridium perfringens*: sporulation, spore resistance and germination. *Bangladesh J. Microbiol.* 24:1–8.
21. Huang IH, Waters M, Grau RR, Sarker MR. 2004. Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiol. Lett.* 233:233–240.
22. International Organization for Standardization. 2004. ISO 7937. Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*; colony count technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
23. Jolley K, Maiden M. 2010. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11:595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595.
24. Jost BH, Trinh HT, Songer JG. 2006. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Vet. Microbiol.* 116:158–165.
25. Lahti P, Heikinheimo A, Johansson T, Korkeala H. 2008. *Clostridium perfringens* type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-*cpe* or IS1470-like-*cpe*) as a common cause of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 46:371–373.
26. Le Marc Y, et al. 2008. Modelling the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of bulk meat. *Int. J. Food Microbiol.* 128:41–50.
27. Li J, McClane BA. 2006. Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7620–7625.
28. Li J, McClane BA. 2006. Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4561–4568.

29. Li J, Sayeed S, McClane BA. 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7218–7224.
30. Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. 2011. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol.* 28:192–198.
31. McClane B, Uzal F, Fernandez Miyakawa M, Lyerly D, Wilkins T. 2006. The enterotoxic Clostridia, p 698–752. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed), *The prokaryotes*. Springer, New York, NY.
32. McClane BA. 2007. *Clostridium perfringens*, p 423–444. In Doyle MP, Beuchat LR (ed), *Food microbiology*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.
33. McClane BA, Lyerly DM, Wilkins TD. 2006. Enterotoxic clostridia: *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium difficile*, p 703–714. In Fischetti VA (ed), *Gram-positive pathogens*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
34. Miyamoto K, Chakrabarti G, Morino Y, McClane BA. 2002. Organization of the plasmid *cpe* locus in *Clostridium perfringens* type A isolates. *Infect. Immun.* 70:4261–4272.
35. Miyamoto K, Wen Q, McClane BA. 2004. Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. *J. Clin. Microbiol.* 42:1552–1558.
36. Miyamoto K, et al. 2011. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS One* 6:e20376. doi:10.1371/journal.pone.0020376.
37. Myers GSA, et al. 2006. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res.* 16: 1031–1040.
38. Neumann AP, Rehberger TG. 2009. MLST analysis reveals a highly conserved core genome among poultry isolates of *Clostridium septicum*. *Anaerobe* 15:99–106.
39. Petit L, Gibert M, Popoff MR. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 7:104–110.
40. Pot B, et al. 2011. Interactive MLST database management using the Bionumerics plug-in, as illustrated on *Campylobacter*, abstr R2415. 21st Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis./27th Int. Congr. Chemother., Milan, Italy. European Society of Clinical Microbiology and Clinical Diseases, Basel, Switzerland.
41. Rhodehamel E, Harmon S. 2001. BAM: *Clostridium perfringens*. US FDA, Rockville, MD. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070878>.
42. Rood JI. 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:333–360.
43. Sarker MR, Shivers RP, Sparks SG, Juneja VK, McClane BA. 2000. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and

spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3234–3240.

44. Scallan E, et al. 2011. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17:7–15.

45. Smedley JG, III, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA. 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152:183–204.

46. Smedley JG, III, McClane BA. 2004. Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infect. Immun.* 72:6914–6923.

47. Songer JG. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:216–234.

48. Svec P, et al. 2005. Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 247:59–63.

49. Tanaka D, et al. 2007. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolates collected from food poisoning outbreaks and healthy individuals in Japan based on the *cpe* locus. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60:68–69.

50. Versalovic J, et al. 1995. DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119:23–29.

51. Wang R, Cao W, Franklin W, Campbell W, Cerniglia CE. 1994. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Mol. Cell. Probes* 8:131–138.

52. Wijnands LM, van der Mey-Florijn A, Delfgou-van Asch E. 2011. *Clostridium perfringens* associated food borne disease. Report 330371005. RIVM, Bilthoven, The Netherlands.

53. Xiao Y, Francke C, Abee T, Wells-Bennik MHJ. 2011. Clostridial spore germination versus bacilli: genome mining and current insights. *Food Microbiol.* 28:266–274.

54. Afshari A., Jamshidi A., Razmyar J., Rad M. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from broiler meat in northeastern of Iran / *Veterinary Research Forum* – 2015. – Vol. 6(4). – P.279-284

55. Baums C.G., Shotte U., Amtsberg G., Goethe R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates // *Vet. Microbiol.*, 2004; 100: 11–16.

56. Bueschel D.M., Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype // *Vet. Microbiol.*, 2003; 94: 121–129.

57. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens* // *Gene*, 1997; 203: 65–73.

58. Kapustin A.V., Laishevtcev A.I. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia Haemolytica*. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016. T. 52. № 4. C. 3-1.

59. Kovaleva E.N. Ecosystems monitoring with purpose for phage detection of pathogen microorganisms as part of agricultural foresight//Advances in Environmental Biology. 2016. T. 10. № 3. С. 1-3.
60. Lebrun M., Mainil J.G., Linden A. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis // Veterinary Record, 2010; 167: 13–22
61. Li J., Miyamoto K., Sayeed S., McClane B.A. Organization of the cpe Locus in CPEPositive *Clostridium perfringens* Type C and D Isolates / PLoS One – 2010. – Vol.5(6) – e10932. doi:10.1371/journal.pone.0010932
62. Manteca C., Daube G., Jauniaux T., Linden A., Pirson V., Detilleux J., Ginter A., Coppe P., Kaeckenbeeck A., Mainil J.G. A role for the *Clostridium perfringens* beta2-toxin in bovine enterotoxaemia? // Vet. Microbiol., 2002; 86:191–202. RJOAS, 3(63), March 2017
63. Møller K., Ahrens P. Comparison of Toxicity Neutralization-, ELISA- and PCR Tests for Typing of *Clostridium perfringens* and Detection of the Enterotoxin Gene by PCR / Anaerobe- 1996. – Vol. 2. – P.103-110
64. Morris W.E., Venzano A.J., Elizondo A., Vilte D.A., Mercado E.C., Fernandez-Miyakawa M.E. Necrotic enteritis in young calves // J. Vet. Diagn. Invest., 2011; 23: 254–259.
65. Songer J.G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals / Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 9(2) – P.216-234
66. Uzal F.A., Plumb J.J., Blackall, L.L., Kelly W.R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats / Letters in Applied Microbiology – 1997. – Vol. 25, - P.339–344
67. Капустин А.В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота//Конференция "Лекарственные препараты для животных" Москва ВГНКИ, 2011.Стр. 53-54.
68. Капустин А.В. Столбняк сельскохозяйственных животных/А.В. Капустин/Веткорм, № 6, 2009. С. 55 -56.
69. Капустин, А.В. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота /А.В. Капустин, А.В. Моторыгин, Н.К. Букова//Вестник ветеринарии. – 2013. - №64. –С. 71-73.
70. Москалева, Н.В. Диагностика и профилактика анаэробной энтеротоксемии телят, обусловленной энтеротоксином *C. perfringens* типа А; автореф. дис. кандидат ветеринар. наук /Н.В. Москалева. - Минск – 2001. 20с.
71. Пименов Н.В., Крупальник В.Л. Лечение молодняка сельскохозяйственных животных при респираторных болезнях инфекционной этиологии: Учебное пособие. -М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2010. -47 с.
72. Пименов Н.В., Крупальник В.Л., Тухфатова Р.Ф. Средства и методы лечения молодняка сельскохозяйственных животных при желудочно-кишечных и респираторных болезнях смешанной этиологии. Учебное пособие. -М.: ФГБОУ ВПО МГАВМиБ. -2014. -168 с.

73. Пименов, Н.В. Этиология анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота/ Н.В. Пименов, Ю.Н. Колесникова // Труды Всероссийского совета молодых ученых и специалистов аграрных образовательных и научных учреждений. – 2015. – С. 175-178.

74. Хангажинов А.А. Распространение патогенных анаэробов в различных типах почв Республики Бурятия и эпизоотологический мониторинг вызываемых ими клостридиозов автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук, - Благовещенск, 2012. С.27.

75. Кононов А.Н., Ожередова А.Н., Заерко В.И. Биологические свойства *Clostridium perfringens* тип А, выделенных из пораженных копытцев овец// Ветеринария. 2014. - №4. - С. 7-13.

76. Шевченко А.А., Шевченко Л.В. Совершенствование специфической профилактики крупного рогатого скота // Труды Кубанского государственного аграрного университета. Серия: Ветеринарные науки. - 2009. - №1. - С.127-129.

77. N.M. Useh, N.D. Ibrahim, A.J. Nok, K.A. Esievo Relationship between outbreaks of blackleg in cattle and annual rainfall in Zaria // Nigeria. Vet Rec. - 2006. – Vol.158 (3). – P. 100–101.

78. B.S. Abella, P. Kuchinic, T. Hiraoka, D.S. Howes Atraumatic Clostridial myonecrosis: case report and literature review // J Emerg Med. – 2003. – Vol. 24. – P. 401–405.

79. D. Ray, S.D. Cohle, P. Lamb //Spontaneous clostridial myonecrosis // J Forensic Sci. – 1992. – Vol. 37. – P. 1428–1432.

80. E.G. Valentine Nontraumatic gas gangrene //Ann Emerg Med. – 1997. – Vol. 30. – P. 109-111.

81. Ф. Марченков Клостридиоз // журнал «Главный зоотехник» №9 сентябрь 2008. - С 29.

82. Бессарабов, А. А., Е. С. Воронин Инфекционные болезни животных под ред. А. А. Сидорчука. - М.: КолосС, 2007. - 671 с.

83. G. Tellez, N.R. Pumford, M.J. Morgan, A.D. Wolfenden, B.M. Hargis Evidence for *Clostridium septicum* as a primary cause of cellulitis in commercial turkeys // J Vet Diagn Invest. – 2009. – Vol. 21. – P. 374–377

84. D. Wilder, J.M. Barbaree. Norton Differences in the pathogenicity of various bacterial isolates used in an induction model for gangrenous dermatitis in broiler chickens //Avian Dis. – 2001. – Vol. 45. – P. 659–662.

85. Sadarangani SP, Batdorf R, Buchhalter LC, Mrelashvili A, Banerjee R, Henry NK, Huskins WC, Boyce TG: *Clostridium septicum* brain abscesses in a premature neonate // Pediatr Infect Dis J. – 2014. – Vol. 33(5). – P. 538-540.

86. Wang R, Cao W, Franklin W, Campbell W, Cerniglia CE. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. Mol. Cell. Probes. – 2004. – Vol. 8. – P. 131–138.

87. Miyamoto K, Wen Q, McClane BA. Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS1470-like

sequence, or a plasmid *cpe* locus with an *IS1151* sequence. J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 42. – P. 1552–1558.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Акт комиссионных лабораторных испытаний

«Қазақ ғылыми-зерттеу
ветеринария институты»
ЖШС «Қостанай
ветеринария ғылыми-
зерттеу стансасы» филиалы



«Костанайская научно-
исследовательская ветеринарная
станция» филиал ТОО
«Казахский научно-
исследовательский
ветеринарный институт»

110000 Қостанай қ. Дулатов көшесі, 94
тел./факс 8(7142) — 54-24-72
e-mail: kostanainivs@yandex.kz

110000 г. Костанай ул. Дулатова, 94
тел./факс 8(7142) – 54-24-72
e-mail: kostanainivs@yandex.kz

АКТ

проведения комиссионных лабораторных испытаний ПЦР тест-систем (пары специфических праймеров и зонда для *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chavoei*, *Cl. novyi*), для диагностики *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chavoei*, *Cl. novyi* методом полимеразной цепной реакции (12.10.2017 г.)

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: Мустафина Б.М. (заведующий филиалом «Костанайская НИВС». ТОО «КазНИВИ»), Ячник Л.П. (научный сотрудник, Костанайской НИВС филиала ТОО «КазНИВИ»), Жармагамбетова А.Т. (научный сотрудник, Костанайской НИВС филиала ТОО «КазНИВИ»), Коканова С.К. (начальник НИЦ при КГУ им. А. Байтурсынова), Чужебаевой Г.Д. (заведующая испытательной лаборатории производства продуктов питания НИЦ КГУ им. А. Байтурсынова), Бейшовой И.С. (заведующая отдела молекулярно-генетических исследований НИЦ при КГУ им. А. Байтурсынова), Ковальчук А.М. (научный сотрудник, отдела молекулярно-генетических исследований при КГУ им. А. Байтурсынова), составили настоящий акт по проведению лабораторных испытаний ПЦР тест-системы (пары специфических праймеров и зонда для *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chavoei*, *Cl. novyi*), для диагностики возбудителей клостридиозов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты испытаний:

Для проверки диагностической эффективности, разработанной ПЦР тест-системы, был исследован патологический материал (8 проб биоматериала КРС и овец, из которых были выделены культуры), почва (3 проб), 3 смыва с овощей, 3 смыва со стен и пола животноводческих ферм, корма для с/х животных (6 проб) а также культуры *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chavoei*, *Cl. novyi* и близкородственных бактерий (*Clostridium difficile*, *Clostridium oedematiens*, *Clostridium sordellii*, *B. melittensis*, *Mycobacterium bovis*, *E. coli*, сапрофитные микроорганизмы: *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp).

Из полученных культур выделяли ДНК и использовали их в качестве образцов для анализа в других лабораториях.

Исходя из определенной в результате экспериментов чувствительности, для получения результатов в реакционную смесь добавляли ДНК-материал в концентрации 10 нг/мкл. Полученные данные приведены в таблице 1, 2.

Таблица 1. Результаты идентификации *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chavoiei*, *Cl. novyi*

№ п/п	Образец / тест	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. septicum</i> (Ct)	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. perfringens</i> (Ct)	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. novyi</i> (Ct)	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. chavoiei</i> (Ct)
1.	Патологический материал (пораженные участки слизистой оболочки КРС)	-	-	-	+(23,7)
2.	Патологический материал (пораженные поверхностные ткани КРС)	+(21,3)	-	-	-
3.	Патологический материал (кишечник КРС)	-	+(26,7)	-	-
4.	Патологический материал (кишечник овцы)	-	+(27,3)	-	-
5.	Патологический материал (пораженные кожные покровы овец)	+(27,4)	-	-	-
6.	Патологический материал (пораженные участки слизистой оболочки овец)	-	-	+(25,5)	-
7.	Смыв с пола фермы	-	-	-	-
8.	Смыв со стен фермы	-	-	-	-
9.	Вытяжка из почвы	-	+(20,3)	+(25,3)	-
10.	Смыв с перегородок хранилища	-	-	-	-
11.	Смыв с картофеля	-	-	-	-
12.	Вытяжка из почвы	+(17,9)	-	-	+(19,8)
13.	Смыв со свеклы	-	-	-	-

14.	Смыв с моркови	-	-	-	-
15.	Патологический материал (пораженные поверхностные ткани КРС)	-	-	-	-
16.	Вытяжка из почвы	-	+(14,2)	-	-
17.	Патологический материал (пораженные кожные покровы овец)	-	-	-	-
18.	Корма для с/х животных (зерно)	-	-	-	-
19.	Корма для с/х животных (сенаж)	-	-	-	-
20.	Корма для с/х животных (сенаж)	-	-	-	-
21.	Корма для с/х животных (силос)	-	-	-	-
22.	Корма для с/х животных (силос)	-	-	-	-
23.	Корма для с/х животных (зерно)	-	-	-	-
24.	Положительный контроль	+(28,3)	+(24,1)	+(26,9)	+(30,4)
25.	Отрицательный контроль	-	-	-	-

Таблица 2. Результаты определения специфичности с культурами близкородственных микроорганизмов

№ п/п	Образец / тест	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. septicum</i> (Ct)	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. perfringens</i> (Ct)	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. novyi</i> (Ct)	Разработанная тест-система для идентификации <i>Cl. chavoei</i> (Ct)
1.	<i>Cl. septicum</i>	+(27,2)	-	-	-
2.	<i>Cl. perfringens</i>	-	+(27,8)	-	-
3.	<i>Cl. chavoei</i>	-	-	-	+(29,1)
4.	<i>Cl. novyi</i>	-	-	+(25,5)	-
5.	<i>Cl. difficile</i>	-	-	-	-
6.	<i>Cl. oedematiens</i>	-	-	-	-
7.	<i>Cl. sordellii</i>	-	-	-	-
8.	<i>B. melittensis</i>	-	-	-	-
9.	<i>Mycobacterium bovis</i>	-	-	-	-
10.	<i>Lactobacillus spp.</i>	-	-	-	-
11.	<i>Enterococcus spp.</i>	-	-	-	-
12.	<i>E. coli</i>	-	-	-	-
13.	Положительный контроль	+(23,6)	+(24,8)	+(20,7)	+(26,2)

14.	Отрицательный контроль	-	-	-	-
-----	------------------------	---	---	---	---

Как видно из таблиц 1 и 2, в результате исследования было установлено, что все четыре тест-системы показывают одинаковый результат при концентрации исследуемого ДНК-материала 10 нг/мкл. В результате проверки разработанных протоколов на специфичность, положительных результатов с ДНК близкородственных видов микроорганизмов не было обнаружено, что подтверждает высокую специфичность разработанных тест-систем.

Председатель комиссии
Заведующий Костанайской НИВС



Мустафин Б.М.

Научный сотрудник Костанайской НИВС

Ячник Л.П.

Научный сотрудник Костанайской НИВС

Жармагамбетов А.Т.

В присутствии:
Начальника НИЦ при
КГУ им. А. Байтурсынова

Коканова С.К.

Заведующей ИЛППП НИЦ при
КГУ им. А. Байтурсынова

Чужебаевой Г.Д.

Заведующей отдела молекулярно-
генетических исследований НИЦ при
КГУ им. А. Байтурсынова

Бейшовой И.С.

Научного сотрудника отдела молекулярно-
генетических исследований НИЦ при
КГУ им. А. Байтурсынова

Ковальчук А.М.

Таблица 1. Результаты идентификации *Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chavoei*, *Cl. novyi*

№ п/п	Образец / тест	Разработанная тест-система для <i>Cl. septicum</i> (Ct)	Разработанная тест-система для <i>Cl. perfringens</i> (Ct)	Разработанная тест-система для <i>Cl. chavoei</i> (Ct)	Разработанная тест-система для <i>Cl. novyi</i> (Ct)
1.	Патологический материал (пораженные поверхностные ткани КРС)	+(23,3)	-	-	-
2.	Патологический материал (пораженные участки слизистой оболочки овец)	-	-	+(21,7)	-
3.	Патологический материал (кишечник овцы)	-	-	-	+(18,9)
4.	Вытяжка из почвы	-	+(26,2)	-	-
5.	Смыв с пола животноводческой фермы	-	-	-	-
6.	Вытяжка из почвы	-	-	+(17,9)	-
7.	Корм для с/х животных	-	-	-	-
8.	Положительный контроль <i>Cl. septicum</i>	+(23,8)	-	-	-
9.	Положительный контроль <i>Cl. perfringens</i>	-	+(26,3)	-	-
10.	Положительный контроль <i>Cl. chavoei</i>	-	-	+(22,8)	-
11.	Положительный контроль <i>Cl. novyi</i>	-	-	-	+(25,6)
12.	Отрицательный контроль	-	-	-	-

Как видно из таблиц 1 и 2, в результате исследования было установлено, что обе тест-системы позволяют детектировать целевые микроорганизмы, не наблюдается перекрестных реакций. В результате проверки разработанного протокола на специфичность, положительных реакций на ДНК близкородственных видов микроорганизмов не было обнаружено, что подтверждает высокую специфичность разработанных тест-систем. Была проведена амплификация с различными разбавлениями заведомо положительного ДНК-материала (таблица 2), чувствительность тест-систем достигает 2 нг/мкл, однако детекция сигнала при этой концентрации происходит на поздних циклах, что подтверждает экспериментальные данные.




Председатель комиссии
Председатель комиссии
Директор КОФ РГП «РВЛ»


Иманбаев Т.К.

Зав.лабораторией безопасности пищевой
продукции КОФ РГП «РВЛ»


Казкенов К.К.


В присутствии:
Начальника НИЦ
КГУ им. А. Байтурсынова


Коканова С.К.


Заведующей ИЛППП НИЦ
КГУ им. А. Байтурсынова


Чужебаевой Г.Д.

Заведующей отдела молекулярно-
генетических исследований НИЦ
КГУ им. А. Байтурсынова


Бейшовой И. С.

Научного сотрудника отдела молекулярно-
генетических исследований НИЦ
КГУ им. А. Байтурсынова


Ковальчук А.М.

ПРИЛОЖЕНИЕ С

Инструкция по применению разработанных тест-систем



Тест-система для выявления возбудителей нерсинноза (*Cl. septicum*, *Cl. perfringens*, *Cl. chavoei*, *Cl. novyi*) методом полимеразной цепной реакции в формате Real-time

Комплект реагентов для выделения ДНК

Лизирующий буфер (5 М гуанидинтиоцианат, 25 мМ ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100)
SDS
50 мМ ЭДТА
Промывочный раствор 1 (Хлороформ, фенол)
Промывочный раствор 2 (70 % этанол)
Преципитирующий буфер (изопропиловый спирт)
Элюирующий раствор (1xTE буфер)

Инструкция по применению:

1. Отобрать 1,5 мл клеточной суспензии (жидкого образца), твердый материал необходимо измельчить и гомогенизировать 200 мкг с 1 мл стерильного физ. раствора, в пробирку, центрифугировать на максимальных оборотах, удалить супернатант, добавить воды до 1 мл, тщательно перемешать.
2. Осадок растворить в 200 мкл ЭДТА, добавить лизоцим до конечной концентрации 10 мг/мл, инкубировать при 37°C, 10 мин.
3. Добавить 200 мкл лизис буфера. Перемешать в течении 10 сек.
4. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре. Добавить 100 мкл SDS и тщательно смешать.
5. Добавить 500 мкл Промывочный раствор 1, тщательно смешать в течении 3 мин и центрифугировать 10 мин при 12000 g.
6. Аккуратно отобрать вязкий водяной супернатант в чистые пробирки, не затрагивая преципитат.
7. Промойте ДНК с 500 мкл Промывочного раствора 2, перемешать и центрифугировать при 12 тыс об/мин 10 – 20 мин.
8. Удалить супернатант и высушить.
9. Растворить ДНК в 50-100 мкл Элюирующего раствора (в зависимости от необходимой концентрации). Инкубировать при комнатной температуре в течении 30 мин.

Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации ДНК (форматы «Форез», «Real-Time»)

Состав:

dNTP (2 mM)
10x реакционный буфер
MgCl ₂ (25 mM)
Ультрачистая вода для ПЦР
Taq Polymeraza
Раствор олигонуклеотидов для <i>Cl. septicum</i>
Раствор олигонуклеотидов для <i>Cl. perfringens</i>
Раствор олигонуклеотидов для <i>Cl. chavoei</i>
Раствор олигонуклеотидов для <i>Cl. novyi</i>

Положительный контроль

Инструкция по применению

1. Промаркируйте пробирки для амплификации (с учетом пробирок для положительного контрольного образца - «К+» и для отрицательного контрольного образца - «К-»).
2. Для постановки нескольких (N — все образцы) смешайте в отдельной пробирке 3x(N+1) мкл реакционный буфер, 3x(N+1) мкл раствора MgCl₂, 3x(N+1) мкл раствора dNTP, 11,3x(N+1) мкл воды для ПЦР, 0,2x(N+1) мкл раствора Taq-полимеразы, 4,5x(N+1) мкл раствора олигонуклеотидов (*Y. enterocolitica* или *Y. pseudotuberculosis*).
3. Тщательно перемешайте полученную смесь на вортексе.
4. Осадить раствор кратковременным центрифугированием.
5. Добавьте в каждую пробирку по 25 мкл перемешанного и осажденного раствора.
6. Перенесите пробирки в зону пробоподготовки.
7. Добавьте в каждую пробирку по 5,0 мкл препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). В пробирки, маркированные «К-», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку в пробирку, маркированную «К+», внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.
8. Осадите капли со стенок пробирок кратковременным центрифугированием на вортексе.
9. Установите все пробирки в амплификатор и проведите ПЦР в режиме, приведенном в таблице, (объем реакционной смеси 30 мкл).

Режим амплификации:

Температура	Время	Количество циклов
95°C	5 мин	1
95°C	30 сек	30
58°C*	30 сек	
72°C	20 сек	
72°C	5 мин	1
4°C	∞	

*- регистрация результатов

Проведение детекции и учет результатов ПЦР-амплификации ДНК

1. Формат «Форез»: результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза. Размер ампликона для *Cl. septicum* составляет 170 п.н., для *Cl. perfringens* – 286 п.н., для *Cl. chauvoei* – 263 п.н., для *Cl. novyi* – 205 п.н.
2. Формат «Real - Time»: автоматически с помощью амплификатора в соответствии с инструкциями к приборам.

Условия хранения

Комплект реагентов для выделения ДНК следует хранить в темном месте при +2 +8 °С в течение всего срока годности.

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК следует хранить в темном месте при -18 - 20 °С в течение всего срока годности.

МОНОГРАФИЯ

**Чужебаева Гульжаган Джамбуловна
Бейшова Индира Салтановна
Ковальчук Александр Михайлович
Елеусизова Анара Толегеновна
Батырбеков Асылбек Нурлыбекович
Кауменов Нурлан Сарсембаевич**

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА КЛОСТРИДИОЗОВ ЖИВОТНЫХ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ CLOSTRIDIUM МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Тираж 300 экземпляров

ТОО «Костанайский печатный двор»

Адрес: Казахстан, 110003 Костанай Темирбаева 39

Телефон: (7142) 53-54-60, (7142) 90-02-45

Факс: (7142) 53-54-92, (7142) 53-54-60

Е-mail: kpdvor@mail.kz