

# Лабораторная диагностика в выявлении и идентификации токсинотипов *Cl. Perfringens* и *Cl. Difficile*

**Н. А. Безбородова**, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и селекции животных ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), Екатеринбург

**Е. Н. Шилова**, доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела мониторинга и прогнозирования инфекционных болезней животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, Екатеринбург

**В. В. Кожуховская**, младший научный сотрудник лаборатории микробиологических и молекулярно-генетических исследований ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, Екатеринбург

**Н. А. Мартынов**, лаборант лаборатории геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, Екатеринбург

*Клостридии — грамположительные анаэробные спорообразующие бактерии семейства Clostridiaceae рода Clostridium, широко распространены в природе и могут быть причиной многих болезней крупного рогатого скота. В большинстве случаев являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта [1]. Род Clostridium разнообразен, известно более 204 видов клостридий, около 20 из них являются патогенными и часто встречаются в биологических образцах, имеющих отношение к болезни или инфекции у людей или животных [2].*

## Введение

Клостридии, обитая в желудочно-кишечном тракте в качестве комменсалов, приобретают патогенность под воздействием определенных факторов (после кормового стресса, травм, изменения условий содержания, нарушения обмена веществ, кетозов, ацидоза рубца, бесконтрольного применения антибиотиков), на фоне которых создаются благоприятные условия для быстрого размножения и выработки токсинов. Некоторые болезни, вызванные этими бактериями, могут вообще не проявляться клинически, при этом сохраняется бактерионосительство, другие носят спорадический характер [1, 2, 3, 4].

Несмотря на широкое применение вакцин, большой спектр и разнообразие антибактериальных препаратов, клостридиозы продолжают оставаться серьезной проблемой во многих странах, нанося значительный экономический ущерб сельскому хозяйству [5].

Наиболее широко распространенным видом клостридий является

*Cl. perfringens*. Как у людей, так и у животных, *Clostridium perfringens* является важной причиной гистотоксических инфекций и заболеваний, таких как энтерит и энтеротоксемия. Вирулентность этой грамположительной анаэробной бактерии в значительной степени зависит от ее высокой способности продуцировать токсины [2, 6]. *Cl. perfringens* подразделяют на шесть сероваров: А, В, С, D, Е, F, каждый из которых вызывает болезнь с характерными клиническими признаками. Серовар А вызывает злокачественный отек у коров при травмах, газовую гангрену. Серовары А, С, D, Е – вызывают анаэробную энтеротоксемию у молодняка [4, 5, 7, 8].

*Cl. difficile* – грамположительная токсинобразующая бактерия, которая является кишечным патогеном и у людей, и у животных. *Cl. difficile* выделяет энтеротоксин А, цитотоксин В и бинарный токсин СДТ. Токсины А и В кодируются отдельными генами (*tcdA*, *tcdB*), а бинарный токсин кодируется двумя генами (*cdtA* и *cdtB*) [6, 8]. Известно,

что СДТ токсин обнаруживается у 5–23 % изолятов [8]. Данные токсинотипы клостридий обладают повышенной адгезией к кишечному эпителию [2, 8]. Токсин-отрицательные изоляты *Cl. difficile* часто выделяют из фекалий животных и людей при дисбактериозах. А приобретение токсигенных свойств, у токсин-отрицательных изолятов *Cl. difficile*, может происходить с помощью обмена генетической информацией [6, 8].

В настоящее время лабораторная диагностика токсигенных клостридий проводится серологическими и молекулярно-генетическими методами. Серологический метод позволяет типировать штаммы *Cl. perfringens* с помощью диагностических сывороток на зараженных мышцах, но является трудоемким и продолжительным по времени [9]. ПЦР метод за короткий период времени обнаруживает в биообразцах гены клостридий, выявляя одновременно вид и токсинотип анаэроба.

Определение типа клостридий является важной задачей для из-

учения развития эпизоотологического процесса и необходимым критерием выбора эффективных вакцин для профилактики и контроля клостридиальной инфекции у крупного рогатого скота на сельскохозяйственных предприятиях [7, 10].

Целью наших исследований стало выявление и идентификация токсинотипов *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* выделенных у крупного рогатого скота на территории Уральского региона.

## Материалы и методы

Исследования выполнены в ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН в рамках Государственного задания Минобрнауки России.

В период с 2020 года по 2021 год была исследована 101 биологическая проба от коров и телят из 10 сельскохозяйственных организаций Уральского региона.

От животных при подозрении на клостридиальную инфекцию отбирали биоматериалы: кал, молоко, смывы с раневой поверхности копыт задних конечностей коров; патологические материалы от погибших телят – сердце, печень, почки, селезенка, легкие, рубец, сычуг, сетка.

В работе применяли набор для выделения ДНК из биоматериалов «Diatom DNA Prep 200» (компания ООО «ИзоГен», Москва). Для выявления клостридиальной инфекции в биоматериале использовали тест-наборы «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile/Cl. perfringens*», для типизации клостридий по токсинобразованию применяли комплект реагентов «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile* tcdA/tcdB/CDT» (АО «Вектор-Бест», Москва). Мультиплексные тест-системы использовали для определения генов резистентности Erm (A, B, C), blaCIT/blaDNA, blaCTX/blaOXA к антимикробным препаратам у бактерий (Россия). Амплификацию в режиме реального времени проводили с применением оборудования QuantStudio 5 (США). Одновременно с этим

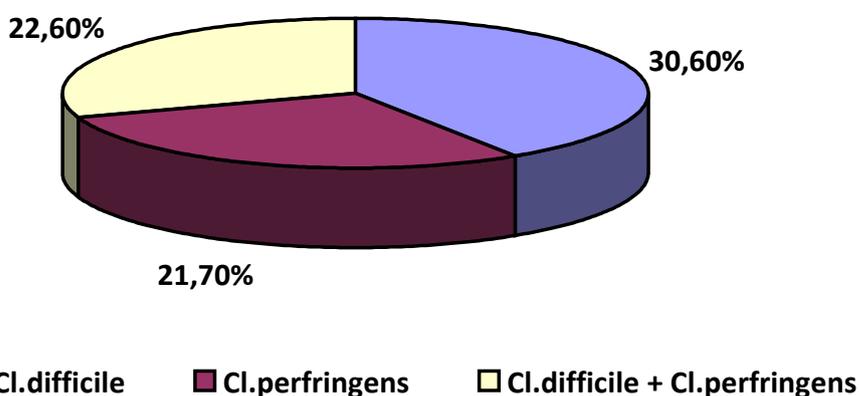


Рис. 1. Выявленные геномы клостридий из биологического материала от коров (n=101)

были проведены культуральные исследования биопроб с последующей идентификацией микроорганизмов методом MALDI-TOF (масс-спектрометрия) в анализаторе VITEK MS (bioMerieux SA, Франция) на базе лаборатории ООО «Кволити Мед» (Екатеринбург).

Токсинотипы *Cl. perfringens* определяли методом ПЦР с применением известных праймеров [10] и Российской реagensтики в электрофорезном варианте.

Микробиологические исследования некоторых биоматериалов на пастереллез, колибактериоз, сальмонеллез и клостридиоз были проведены совместно с ГБУСО Свердловская областная ветеринарная лаборатория (Екатеринбург).

## Результаты исследований

Результаты проведенных ПЦР исследований показали, что из 101 биологической пробы от животных в 35,6 % образцов были обнаружены клостридии. Специфические участки ДНК *Cl. difficile* были выделены из 31 пробы (30,6 %). ДНК *Cl.perfringens* обнаружена в 22 биоматериалах (21,7 %). Одновременное присутствие геномов бактерий *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* было подтверждено в 25,7 % проб. ДНК *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* обнаруживали и в биопробах кала (22,6 %), в патматериалах от павших телят и коров (5,0 %), а также в биообразцах молока (8,0 %) (рис. 1).

Методом ПЦР в 6 пробах фекалий от коров были обнаружены геномы, отвечающие за образование токсинов у *Cl. perfringens*. В 5 пробах выявлены *Cl.perfringens* тип А, а в одной биопробе *Cl.perfringens* тип С.

Также проводили типирование *Cl. difficile* на наличие генов, отвечающих за выделение опасных токсинов. Обнаруженные нами в биопробах от животных *Cl. difficile* обладали токсигенностью только в 38,6 % случаев. Чаще всего обнаруживали гены бинарного токсина (CDT) у 25,6 % клостридий. Гены токсинов А и В были выявлены в 17,0 % случаев. Чаще в биопробах были явлены *Cl. difficile* тип CDT (12,8 %), реже тип В (5,1 %). Также встречались сочетания типов *Cl. difficile* – А+В+CDT в 7,6 % проб, В+CDT в 5,1 % проб, единично А+CDT, А+В. Также были обнаружены нетоксигенные *Cl. difficile* (15,3%).

В остальных случаях, поступивший на исследование в 2020 году патологический материал от павших коров и телят (кусочки сердца, печени, почек, селезенки, легких, рубца, сычуга, сетки, лимфоузлов) был исследован методами ПЦР и масс-спектрометрии на анаэробные микроорганизмы, параллельно с культуральными методами на пастереллез, колибактериоз, сальмонеллез и клостридиоз.

В одном случае вспышки клостридиоза в хозяйстве, все виды лабораторных исследований выявили и подтвердили наличие в биоматериале от телят основно-



**Рис. 2. Гемолитические свойства *Cl. perfringens* на кровяном агаре (Фото Безбородовой Н. А.)**

го инфекционного возбудителя – *Cl. perfringens* (рис. 2).

Также ПЦР-диагностика обнаружила в патматериале ДНК *Cl. difficile* В (рис. 3). В одной из проб у обнаруженной *Cl. difficile* присутствовали гены-мутации *ErmA*, В отвечающие за устойчивость к макролидам 1 поколения, а также гены *blaCIT* и *blaCTX*, ответственные за невосприимчивость к цефалоспорином 1, 2 и 3 поколения. С помощью культурального метода с применением масс-спектрометрии, в образцах была выделена условно-патогенная микрофлора *Enterococcus cecorum* и непатогенная *E. coli*; *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus saprophyticus*. Данная микрофлора являлась вторичной инфекцией. По результатам лабораторных исследований у павших телят были выявлены патогенные бактерии – *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* В, что подтвердило диагноз – инфекционная анаэробная энтеротоксемия телят. Данное заболевание, в основном, поражает телят и характеризуется внезапной смертью, связанной с кровотечением из тонкой кишки, вызванным некрозом слизистой оболочки [1, 2].

В другом случае вспышки клостридиоза, в биоматериале от павших коров методом масс-спектрометрии выявлен обильный рост *E. coli* и *Salmonella enterica* spp. *enterica* sergr D (0:9, 2). При этом изоляты *Salmonella enterica* spp. *enterica* sergr D (0:9, 2) были устойчивы к антибактериальным препаратам (пенициллин/новобиоцин, тетрациклин). С помощью



**Рис. 3. Пробоподготовка патологического материала от погибших телят (кусочки сердца, печени, почек, селезенки, легких) для проведения ПЦР-диагностики (Фото Безбородовой Н. А.)**

ПЦР-диагностики в поступившем материале также были выявлены ДНК *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* CDT (рис. 4), что говорит об острой кишечной инфекции у павших коров, вызванной *Salmonella enterica* spp. *enterica* sergr D (0:9, 2), *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* CDT. При этом, обнаруженная *Cl. difficile* типа CDT имела гены резистентности (*ErmB*) к макролидам 1 поколения.

Из 16-ти биологических проб молока от коров с признаками воспалительного процесса молочной железы были выявлены геномы *Cl. difficile* в 31,2 % проб и *Cl. perfringen* в 12,5 % проб, также ДНК бактерий группы *Staphylococcus* spp. в 40,0 % проб, геномы *E. coli* и *S. agalactiae* в 30,0 % проб, ДНК *S. aureus* в 26,6 % проб. В одной пробе молока были выявлены геномы *Cl. difficile* типа А, В и CDT, остальные клостридии были токсин-отрицательными. Так же у *Cl. difficile* в 33,0 % случаев были обнаружены гены *blaCIT/blaDNA*, *blaCTX/blaOXA*, отвечающие за устойчивость к  $\beta$ -лактамам антибиотикам.

## Выводы и предложения

В результате проведенных ПЦР исследований было выяснено, что



из 101 биологической пробы от коров и телят в 35,6 % образцов были обнаружены клостридии. Геномы *Cl. difficile* были выделены из 30,6 % проб. ДНК *Cl. perfringens* обнаружена в 21,7 % проб. Геномы бактерий *Cl. difficile+Cl. perfringens* были подтверждены в 25,7 % проб. Чаще ДНК *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* обнаруживали и в биопробах кала (22,6 %), в патматериалах (5,0 %) от павших телят и коров, а также в биообразцах молока (8,0 %). В шести пробах фекалий от коров обнаружены геномы *Cl. perfringens* тип А, в одной биопробе *Cl. perfringens* тип С. *Cl. difficile* в биопробах от животных обладали токсигенностью только в 38,6 % случаев. В биопробах чаще были явлены *Cl. difficile* тип CDT (12,8 %), реже тип В (5,1 %). Также встречались сочетания типов *Cl. difficile* – А+В+CDT в 7,6 % проб, В+CDT в 5,1 % проб, единично А+CDT, А+В. Нетоксигенные *Cl. difficile* составили 15,3 % случаев.

В отдельном случае с помощью ПЦР-диагностики и масс-спектрометрии в патматериале от павших телят были обнаружены основные патогены – *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* тип В, что подтвердило диагноз инфекционная анаэробная энтеротоксемия телят. В одной



**Рис. 4. Подготовка биологического материала от павших коров (кусочки легких и селезенки, лимфатические узлы) для проведения ПЦР-исследований**

из проб у *Cl. difficile* были обнаружены гены резистентности к макролидам 1 поколения (ErmA, B) и к цефалоспорином 1, 2 и 3 поколения (blaCIT, blaCTX).

В патматериале от павших коров, методом масс-спектрометрии выявлены бактерии *E. coli* и *Salmonella enterica spp. enterica sergr C* (0:9, 2), а также устойчивость к антибиотикам (пенициллин/новобиоцин, тетрациклин). Методом ПЦР обнаружена ДНК *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* тип CDT, что подтвердило диагноз острая кишечная инфекция у павших коров. Выявленная *Cl. difficile* CDT имела гены устойчивости (ErmB) к макролидам 1 поколения.

В пробах молока от коров с признаками воспалительного процесса молочной железы были обнаружены геномы *Cl. difficile* (31,2 %) и *Cl. perfringens* (12,5 %), ДНК бактерий группы *Staphylococcus spp.* (40,0 %), *E. Coli / S.agalactiae* (30,0 %), ДНК *S. aureus* – (26,6 %). В одной из проб молока, обнаруженная *Cl. difficile* была отнесена к типам A/B/CDT. У *Cl. difficile* в 33,0 % случаев были обнаружены гены резистентности blaCIT/blaDNA, blaCTX/blaOXA, отвечающие за устойчивость к пенициллинам и цефалоспорином 1, 2 и 3 поколения.

Проведенные нами лабораторные исследования показали

высокую выявляемость различных токсинотипов клостридий *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* в биопробах, и их устойчивость к антибактериальным препаратам, за счет наличия генов резистентности. В некоторых образцах была выявлена микст-инфекция, которая включала аэробные и анаэробные бактерии. Метод ПЦР-диагностики обладал достаточной специфичностью в отношении клостридий, позволил идентифицировать виды возбудителя из разных образцов биоматериала и проводить типизацию продуцируемых ими токсинов, выявить гены резистентности, а дополнительный культуральный метод с применением масс-спектрометрии подтвердил полученные результаты. ■

### Библиографические ссылки

1. Шкуратова И. А., Шилова Е. Н., Соколова О. В., Ряпосова М. В. Программы контроля инфекционных факторов, влияющих на репродуктивную функцию высокопродуктивных молочных коров / Ветеринария и кормление. 2020. № 2. С. 54–57.
2. Видовой спектр бактерий рода Clostridium, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах / Терентьева Т. Е., Глотова Т. И., Котенева С. В., Готов А. Г. // Российский ветеринарный журнал. 2016. С. 5–8.
3. Гулюкин, М. И. Разработка эффективных методов диагностики и средств специфической профилактики против наиболее распространенных заболеваний сельскохозяйственных

животных // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко. 2015. Т. 78. С. 10–37.

4. Значение комплексной лабораторной диагностики ОРВИ крупного рогатого скота для ветеринарной практики / А. П. Порываева, О. Г. Петрова, Е. В. Печура [и др.] // Аграрный вестник Урала. 2020. № 5 (196). С. 59–67. DOI 10.32417/1997-4868-2020-196-5-59-67
5. Использование молекулярно-генетических методов для типирования Clostridium perfringens / А. Д. Козлова, Н. С. Горбачева, О. В. Клименкова, А. И. Лаишевцев, А. В. Капустин, Яцентюк С. П. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences, 63 (3), 2017. С.188–194.
6. Clostridium difficile infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology / B. Elliott, G. O. Androga, D.R. Knight, T.V. Riley. Infect Genet Evol. 2017 Apr; 49 P. 1–11. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.12.018.
7. Осипранди М. К., Зербини Л., Болдырева Е. М. Молекулярное ПЦР-типирование токсинов изолятов Clostridium perfringens и Clostridium difficile, полученных от крупного рогатого скота // Российский ветеринарный журнал, №3, 2013. С.20–23.
8. Inside environmental Clostridium perfringens genomes: antibiotic resistance genes, virulence factors and genomic features / J. C. J. Fourie, C. C. Bezuidenhout, T. J. Sanko, C. Mienie, R. Adeleke // J Water Health. 2020 Aug;18(4):477–493. DOI: 10.2166/wh.2020.029. PMID: 32833675.
9. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов Clostridium perfringens / Ю. В. Лобзин, А. С. Кветная, Н. В. Скрипченко, Л. И. Железова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Том 98. № 6. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-37>.
10. Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme / J. I. Rood, V. Adams, J. Lacey, D. Lyras, B. A. McClane, S. B. Melville, R. J. Moore, M. R. Popoff, M. R. Sarker, J. G. Songer, F. A. Uzal, F. Van Immerseel // Anaerobe. 2018 Oct; 53 P. 5–10. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.01

## Клостридиозы



**Евгения Николаевна Шилова**, доктор ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных болезней животных, ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, Екатеринбург



**Наталья Александровна Безбородова**, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, Екатеринбург



**Полина Геннадьевна Аминова**, врач-бактериолог, «Кволити Мед», Екатеринбург

**1. Чем характеризуются клостридиозы крупного рогатого скота? Какие животные находятся в группе риска? Что способствует появлению заболевания в стаде?**

**Евгения Шилова.** Клостридиозы – группа заболеваний, вызываемых патогенными анаэробами (клостридиями), которые протекают, как правило, остро, сопровождаются интоксикацией и, чаще всего, приводят к гибели животных. Выделяют кормовые (алиментарные) и раневые (травматические) клостридиозы. Уровень заболеваемости клостридиозами в стаде зависит не от количества и видового разнообразия животных, а от предрасполагающих факторов в хозяйстве – стресса, неправильного менеджмента, кормов (загрязнение земель, большое количество углеводистых кормов, смена

корма, большое количество белка, поступающего в тонкий кишечник, наличие микотоксинов в корме и пр.). Для травматических клостридиозов это, в первую очередь, нарушение ветеринарно-санитарных норм. Также наиболее подвержены заболеванию животные с развитой мышечной тканью – споры некоторых видов клостридий в спящем состоянии были обнаружены и у здоровых животных. При беспривязном содержании в зоне риска оказываются животные всех возрастов, при привязном, как правило, молодняк до 2-х лет.

**Наталья Безбородова.** Клостридии – грамположительные анаэробные спорообразующие бактерии семейства *Clostridiaceae* рода *Clostridium*, широко распространены в почве, в воде, в кишечнике животных.

В настоящее время известно более 204 видов бактерий данного рода, среди которых патогенностью и токсигенностью обладают лишь некоторые. Основная опасность клостридиозов крупного рогатого скота заключается в образовании возбудителями патогенных токсинов, приводящих к стремительному летальному исходу.

По способу проникновения в организм животного и дальнейшему патологическому действию анаэробы подразделяются на кормовые (ботулизм, 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. От

кlostридиозов преимущественно страдает новорожденный младенец и отелившиеся коровы в хозяйствах, не отслеживающих их физиологическое состояние в период беременности. После отела организм животного не успевает перестроиться, происходит быстрое его истощение, нарушения физиологического гомеостаза, что приводит к развитию кетозов. По разным данным кетоз, как в клинической, так и в субклинической форме поражает от 12 до 80 % всего поголовья высокопродуктивных коров старших возрастных групп. Несбалансированное кормление и низкое качество кормов приводят к нарушению обмена веществ, ацидозу, увеличению и накоплению биомассы бактерий рода *Clostridium* и приобретению ими вирулентности. Активизации бактерий могут способствовать стресс-факторы (резкие изменения в кормлении, связанные со снижением уровня углеводов, повышением уровня протеинов; перегруппировки, транспортировка животных и др.). Иногда возникновению кlostридиозов способствует бесконтрольное применение антимикробных препаратов. Так же заболевания чаще всего отмечают в хозяйствах, где не соблюдаются зоогигиенические, технологические и ветеринарно-санитарные требования, имеют место нарушения режимов кормления и содержания животных.

**Полина Аминова.** Инфекции, вызванные *Clostridium*, приводят к серьезным экономическим потерям в животноводстве. Кlostридии (*Clostridium*) относятся к числу наиболее распространенных бактерий, которые повсеместно распространены в почве, сточных водах, пищевых продуктах, фекалиях и нормальной кишечной микрофлоре людей и животных. Однако, эти грамположительные анаэробные спорообразующие бактерии также являются одними из наиболее распространенных патогенов, вызывающих ряд важных заболеваний

человека и животных, от мионекротических поражений до кишечных инфекций.

Что же способствует появлению заболеваний? Например, наибольшей опасности для развития кlostридиозной энтеротоксемии подвергаются молодые животные, у которых еще не полностью сформировался желудочно-кишечный тракт и кишечная микрофлора. Заражение телят анаэробной энтеротоксемией происходит алиментарным путем через желудочно-кишечный тракт, в основном, при потреблении загрязненных спорами возбудителя молока, воды, кормов. К распространению заболевания predisполагают загрязненные выделения больных животных корма, вода, подстилка, предметы ухода, низкий уровень санитарной культуры на ферме и особенно несистематическое проведение дезинфекции, недостаточная экспозиция дезинфектантов.

Поскольку у кlostридий отсутствуют многие гены, необходимые для биосинтеза аминокислот, они не могут расти в среде, где запас специфических аминокислот ограничен. Высокие уровни перевариваемых углеводов в пище, которые превышают способность слизистой оболочки кишечника к перевариванию и абсорбции, могут быть использованы кlostридиями для размножения. Действительно, исследования показали, что диета, богатая белком, predisполагает к этому заболеванию. Проблемы с питанием, такие как изменение состава и количества корма, вывоз животных на пастбище или переход на другое пастбище, часто регистрируют за 24–36 часов до смерти телят из-за кlostридиального энтерита. Приверженность как к яровой траве, так и к кормовым концентратам может быть связана с высокой концентрацией белка и низким содержанием клетчатки, что может изменить состав микрофлоры и способствовать чрезмерному росту кlostридий. Напротив, считается, что диеты с высоким содержанием клетчатки защищают

от желудочно-кишечных заболеваний. Также немаловажным диетическим фактором является высокая доля коровьего молока или заменителя молока в рационе. Сыворожка, присутствующая в коровьем молоке или заменителе молока, содержит высококачественные, легкодоступные аминокислоты, потенциально predisполагающие к чрезмерному росту кlostридий.

Стрессовые условия окружающей среды, такие как перегруппировка, транспортировка, лечение, также могут быть факторами риска развития кlostридиозов, в частности энтерита. Постстрессовая модификация кишечной микрофлоры путем индукции паралитической кишечной непроходимости является хорошо известным явлением. Это может привести к неадаптированным процессам пищеварения и, следовательно, к более высокой доступности этих питательных веществ для роста кlostридий.

У некоторых животных в тонком кишечнике обитает *C. perfringens* типа D, но количество бактерий обычно невелико, а низкий уровень продукции экзотоксина относительно безвреден. Однако, когда микробный баланс в кишечнике нарушается, часто из-за внезапной перегрузки поступившими углеводами, эти сахаролитические бактерии быстро размножаются и вырабатывают большое количество экзотоксина. Чрезмерное всасывание экзотоксина в кровотоки вызывает серьезные неврологические и респираторные расстройства.

Триггер-фактором для развития кlostридиоза может стать инвазия печеночными паразитами. Фермы, зараженные любым из этих паразитов, могут считаться подверженными риску развития кlostридиоза с поражением печени: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fascioloides magna*, *Cysticercus tenuicollis*, *Dicrocoelium dendriticum* и *Thysanosoma actinoides*.

Основным резервуаром патогенных штаммов кlostридий являются больные животные, выделяющие в большом количестве

возбудителя со своими фекальными массами во внешнюю среду: корма, воду, почву и т.д. Во внешней среде клостридия преобразуется в спорую форму, а при попадании в восприимчивый организм способна вызвать заболевание. Некоторые исследователи определенную роль в распространении возбудителя отводят также клинически здоровым взрослым животным, которые являются бациллоносителями. Заражение происходит через пищу и воду или через ранки, порезы и воспаления на коже и слизистых.

## 2. Возбудители клостридиозов и их особенности. Какие экзотоксины обуславливают действие возбудителей на организм животных?

**Евгения Шилова.** Возбудители клостридиоза – прокариотические бактерии, представляющие собой крупные, анаэробные, спорообразующие, палочковидные, грамположительные микроорганизмы. Это могут быть живые клетки (вегетативные формы) или спящие споры. Их естественной средой обитания являются почва и кишечный тракт животных и человека, патогенез заболеваний связан с продуцированием экзотоксинов.

Видовое разнообразие клостридий довольно велико: возбудителями кормовых и раневых токсикоинфекций являются *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. sordelli*, *C. chauvoei*, *C. tetani*. Каждый вид производит большое количество экзотоксинов, обуславливающих развитие клинических признаков у животных: энтеротоксины, нейротоксины, гистотоксины.

Так, *C. Perfringens* продуцирует не менее 16 токсинов и внеклеточных ферментов. При этом, ни один штамм не производит весь арсенал токсинов, что позволяет классифицировать изоляты *C. Perfringens* по пяти токсинотипам (А, В, С, D и Е) на основе наличия генов, ко-

дирующих четыре основных ток-сина: альфа, бета, эpsilon и йота токсин.

**Наталья Безбородова.** К опасным клостридиозам крупного рогатого скота стоит относить эмфизематозный карбункул (*C. chauvoei*), злокачественный отек (*C. novyi* тип А, *C. septicum*, *C. sordellii*), бациллярную гемоглобинурию крупного рогатого скота (*C. novyi* тип D), столбняк (*C. tetani*), ботулизм (*C. botulinum*), хронический остеомиелит буйволов (*C. novyi* тип С), анаэробную энтеротоксемию телят (*C. perfringens* тип Е, *C. perfringens* тип D, *C. perfringens* тип В), геморрагическую энтеротоксемию телят (*C. perfringens* тип А, С, D, Е), бродзотоподобные инфекции крупного рогатого скота (*C. septicum*, *C. oedematiens*) и некротизирующие энтериты, метриты, мастит крупного рогатого скота (*C. perfringens* тип А).

Современные знания о патогенности *C. chauvoei* показывают, что термостабильный экзотоксин, высокоактивная ДНКаза, гиалуронидаза, гемолизин и жгутики представляют основные факторы вирулентности. Известно, что жгутиковые антигены традиционно считаются важными атрибутами вирулентности и защитными факторами к вакцинации. *C. chauvoei* многими исследователями считается одним из наиболее патогенных видов *Clostridium*.

*C. tetani* подразделяют на 10 сероваров, все они продуцируют тетаноспазмин и тетанолизин, протеазы, фибринолизин, рибонуклеаз. Столбняк является смертельным заболеванием, токсины *C. tetani* вызывают мышечный спазм у животных и приводят к их гибели.

*C. botulinum* вызывает ботулизм. Этот вид клостридиоза относят к остро протекающему кормовому токсикозу. Фактор патогенности: ботулинический экзотоксин (BoNT). На основе антигенной специфичности токсина BoNT штаммы *C. botulinum* делят на во-

сем серотипов (от А до G). Серотипы А, В, Е встречаются редко, F ответственны за случаи ботулизма у человека. Серотипы С и D, наблюдаются в основном у животных. О случаях ботулизма, связанных с серотипом G, в источниках литературы не сообщалось.

*C. sordellii* может вызывать тяжелые инфекции у животных, что напрямую связано с травмами, токсическим шоком и, часто, с гинекологическими инфекциями. Штаммы *C. sordellii* могут продуцировать два больших клострициальных цитотоксина (LCCs) – TcsL и TcsH.

*C. septicum* продуцирует не менее четырех растворимых экзотоксинов: альфа-токсин – летальный, некротический, гемолитический; бета-токсин – гемолизин; гамма-токсин – гиалуронидаза; дельта-токсин – гемолизин, лизирующий эритроциты животных.

*C. novyi* (*C. oedematiens*) разделяют на четыре типа: типы А, В приводят к злокачественному отеку и газовой гангрене; тип С вызывает остеомиелит буйволов; тип D – бациллярную гемоглобинурию. Все типы клостридий выделяют опасные токсины: альфа-токсин обладает некротическим эффектом; бета и гамма – гемолитическими и некротическими свойствами; дельта – под действием кислорода расщепляет гемоглобин; эpsilon – расщепляет жиры; зета – обладает гемолитическими свойствами; эта – расщепляет фибриллярный белок; тета – вызывает опалесценцию.

*C. difficile* способна вызывать желудочно-кишечные заболевания у животных, благодаря выработке растворимых высокомолекулярных токсинов А (TcdA) и В (TcdB), а также бинарного токсина CDT, которые являются основными факторами вирулентности болезнетворных клостридий.

*Cl. perfringens* разделяют на пять типов возбудителя: А, В, С, D, Е, каждый из которых вызывает болезнь с характерными клиническими признаками. Штаммы

*Cl. perfringens* тип А продуцируют энтеротоксин, вызывающий тяжелые токсикоинфекции у животных. *Cl. perfringens* типа В опасен для новорожденных телят. Характерным признаком болезни является геморрагическое воспаление кишечника с изъязвлениями. *Cl. perfringens* тип С является возбудителем анаэробной энтеротоксемии у молодых животных. Заболевание опасно в основном для телят, однако, может наблюдаться и у взрослых животных. *Cl. perfringens* тип D также вызывает энтеротоксемию у жвачных животных с характерными патолого-анатомическими признаками, из-за чего болезнь получила название «мягкая почка». Энтеротоксемию, вызываемую *Cl. perfringens* тип Е, отмечают у телят.

**Полина Аминова.** Клостридии — это грамположительные анаэробные спорообразующие бактерии, продуцирующие экзотоксины. Хотя экзотоксины играют важную роль в большинстве клостридиальных заболеваний, эффективность вырабатываемого токсина и инвазивная способность клостридий различны. Это позволяет обобщенно, но удобно разделить патогенные виды *Clostridium* на следующие группы:

– Нейротропные клостридии (*C. tetani* и *C. botulinum*), которые продуцируют мощные нейротоксины, но являются неинвазивными и колонизируют хозяина в очень ограниченной степени. Это ботулизм (*Clostridium botulinum*) и столбняк (*Clostridium tetani*).

– Гистотоксичные клостридии (*C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* типов А и В, *C. haemolyticum*, *C. sordellii* и *C. perfringens* типа А), которые продуцируют менее мощные токсины, чем первая группа, но являются инвазивными. Эта группа включает в себя клостридии, вызывающие газовую гангрену.

– Клостридии, которые являются энтеропатогенными или вызывают энтеротоксемию (*C. perfringens* типов А–Е, *C. difficile*, *C. colinum* и

*C. spiroforme*). Энтеротоксины образуются в кишечнике и всасываются в кровоток, вызывая генерализованный токсикоз.

– Атипичные клостридии *C. piliforme*, которые вызывают болезнь Тиззера у жеребят и лабораторных животных.

Остановимся на одном из самых значимых возбудителей клостридиоза – *Clostridium perfringens*. Вирулентность *C. perfringens* опосредована устрашающим арсеналом токсинов и ферментов деградации. Как вид *C. perfringens* продуцирует не менее 16 токсинов и внеклеточных ферментов. Однако, ни один штамм не производит весь этот арсенал токсинов, что приводит к значительным различиям в спектре токсинов и ферментов деградации, продуцируемых различными штаммами этой бактерии. Вид *C. perfringens* подразделяется на шесть изотипов, включая А, В, С, D, Е и F, в зависимости от их основных токсинов: йота, альфа, бета и эпсилон. Было установлено, что только типы А, С и F вызывают заболевание у людей, тогда как все типы вызывают заболевания у животных. *C. perfringens* также продуцирует другие токсины, такие как энтеротоксин (цитотоксин), бета-подобный токсин некротического энтерита, дельта (гемолизин), тета или перфринголизин (гемолизин, цитолизин), каппа (коллагеназа, желатиназа), лямбда (протеаза), мю (гиалуронидаза), ню (дезоксирибонуклеаза), гамма, эта и нейраминидаза (сиалидаза). Альфа-токсин обладает летальной, гемолитической и некротизирующей активностью. Бета-токсин (дезоксирибонуклеаза) обладает ферментативной активностью. Гамма-токсин также является ферментом. Дельта-токсин обладает некротизирующей активностью.

Так называемые большие клостридиальные токсины (LCT) представляют собой семейство бактериальных экзотоксинов, которые проникают в клетки-мишени и разрушают их. Члены семейства LCT включают токсины *Clostridioides*

*difficile* TcdA и TcdB, токсины *Paenoclostridium sordellii* TcsL и TcsH, токсин *Clostridium novyi* TcnA и токсин *Clostridium perfringens* TpeL.

### 3. Как проявляются основные нозологии, связанные с клостридиями?

**Евгения Шилова.** *Clostridium perfringens* ассоциирована с рядом заболеваний крупного рогатого скота, связанных с энтеротоксемией и внезапной гибелью. *C. perfringens* типа А является причиной некрогеморрагического энтерита у взрослого скота и абомазита телят. Тип В связан с развитием острого геморрагического энтероколита у новорожденных телят, анаэробной дезинтерии у овец, тип С – с некротическим энтеритом телят, ягнят, поросят. Заболевание, вызванное *C. perfringens* типа D – классическая энтеротоксемия, болезнь переедания.

Злокачественный отек представляет собой острую, как правило, фатальную токсемию, поражающую все виды животных, основным возбудителем считается *Clostridium septicum*. Ассоциация возбудителей при данном заболевании может также включать *C. chauvoei*, *C. Perfringens* типа А, *C. novyi* типа А и *C. sordellii*. Заболевание протекает как раневая инфекция, однако, крупный рогатый скот может иметь «спящие споры» в тканях. Как правило, болезнь проявляется системными (гипертермия, анорексия) и местными признаками (сильный отек, явления мионекроза, гангрена тканей), что обусловлено действием экзотоксинов.

Эмфизематозный карбункул – эндогенная инфекция, основным возбудителем является *C. chauvoei*. Характеризуется эмфизематозным отеком и некротизирующим миозитом, который обычно поражает крупные мышцы. Заболевание начинается внезапно депрессией и развитием хромоты на тазовые конечности. Потом развиваются крепитирующие припухлости, сна-

чала горячие и болезненные, затем холодные.

Инфекционный некротический гепатит представляет собой острую токсемию овец с высокой летальностью, иногда также поражающую крупный рогатый скот. Этиологический агент инфекционного некротического гепатита, *Clostridium novyi* типа В, передается через почву и является частью кишечной микрофлоры. Возбудитель также присутствует в печени травоядных, может присутствовать на поверхности кожи и в латентном состоянии в мышцах (потенциальный источник раневых инфекций). Предполагается, но еще не подтверждено, что *C. Novyi* является причиной внезапной смерти крупного рогатого скота, получавшего высококонцентрированные зерновые корма, у которого ранее поражения печени не обнаруживались. Летальные и некротизирующие токсины повреждают паренхиму печени, тем самым позволяя бактериям размножаться и производить летальное количество токсина.

Столбняк вызывается нейротоксином, продуцируемым *Clostridium tetani*, который обнаруживается в почве и кишечном тракте и проникает в ткани через глубокие колотые раны. Токсин вызывает генерализованный мышечный спастический паралич. Клинических признаков и анамнеза обычно достаточно для постановки диагноза.

Ботулизм – это двигательный паралич с быстрым летальным исходом, вызванный приемом внутрь или выработкой *in vivo* токсина, продуцируемого *Clostridium botulinum* типов А–G. Спорообразующий анаэробный организм размножается в разлагающихся тканях животных, а иногда и в растительном материале. В большинстве случаев ботулизм является интоксикацией, а не инфекцией, и связан с попаданием токсинов в пищу.

Все клостридиозы характеризуются острым или сверхострым течением, внезапной гибелью,

развиваются вследствие действия предрасполагающих факторов. Эффективность лечения при данных заболеваниях низкая. Клинические признаки развиваются под действием экзотоксинов.

**Наталья Безбородова.** Симптоматика болезни зависит от вида возбудителя и характера проникновения его в организм. Для клостридиозов крупного рогатого скота свойственно алиментарное и травматическое заражение.

Клиническая картина злокачественного отека и эмфизематозного карбункула схожа и характеризуется отеком с образованием холодных припухлостей с пенистым экссудатом. При пальпации таких образований отмечают крепитацию из-за выпота фибрина. Отличия заключаются в поражении мышечного слоя при ЭМКАР и характерном запахе прогорклого масла при данном заболевании. Признаки столбняка – внешние изменения в нарушении иннервации мышц (судороги и параличи), дрожь подкожных мышц. Для крупного рогатого скота свойственна атония и тимпания из-за подавления моторики рубца и преджелудков. Всем трем заболеваниям предшествует раневая процесс, включая и родовые травмы и неправильную обрезку копыт.

К алиментарным клостридиозам можно отнести несколько заболеваний. Это ботулизм – болезнь, возникающая в результате отравления токсинами бактерий ботулизма и характеризующаяся тяжелым поражением нервной системы. При ботулизме происходит нарушение акта глотания – длительное пережевывание корма, при этом пищевой ком не продвигается по пищеводу, а вода выделяется через ноздри, в результате чего происходит стремительное истощение животного, слюнотечение и диарея. Также анаэробная энтеротоксемия – острая токсикоинфекционная болезнь сельскохозяйственных животных, развивающаяся в результате всасывания из желудоч-

но-кишечного тракта токсинов бактерий *Clostridium perfringens* типа А, В, С, D; характеризуется диареей и высокой летальностью среди молодняка крупного рогатого скота.

**Полина Аминева.** Заболевание, вызываемые клостридиями, обычно классифицируют как кишечные, нейротоксические или гистотоксические. В каждой из этих трех категорий есть болезни, поражающие как людей, так и животных, а также болезни, поражающие одну группу, но не поражающую другую.

У КРС кишечный клостридиоз проявляется множеством клинических признаков. Основной и наиболее часто распространенный – это сильная диарея с болями в животе. Тяжелая форма клостридиоза может проявиться энтеротоксемией. Причем энтеротоксемию у маленьких телят вызывают клостридии типа А, а у животных старшего возраста клостридии типа С и D. Болезнь в основном поражает телят в условиях интенсивного выращивания и характеризуется внезапной гибелью, связанной с тонкокишечным кровотечением, некрозом и нейтрофильной инфильтрацией слизистой оболочки. Распространенное предположение о том, что *C. perfringens* вызывает кишечные заболевания и зависит от специфических токсинов, кодируемых плазмидами, недавно было опровергнуто открытием, что помимо альфа-токсина, другие токсины и/или ферменты *C. perfringens* могут способствовать патогенезу некрогеморрагического энтерита. Еще заболевание может проявляться такими признаками как вздутие рубца, смещение сычуга, снижение перистальтики кишечника, отсутствие аппетита и общее недомогание. У стельных коров клостридиоз может вызвать замирание плода.

*C. perfringens* типа А вызывает травматический клостридиальный мионекроз как у людей, так и у животных, и энтерит или энтероток-

## Вакцинация – основной способ профилактики и контроля клостридиальной инфекции у коров на сельскохозяйственных предприятиях.

семию у крупного рогатого скота. Есть предположение, что *Clostridium perfringens* типа А могут вызвать геморрагический кишечный синдром. Это острое, быстротекущее заболевание КРС, в основном дойных коров, с летальностью 80–100%. *Clostridium perfringens* тип А, так же является возбудителем некротизирующего мастита коров.

Штаммы *C. perfringens* типа D характеризуются продукцией двух токсинов, а именно альфа (CPA) и эпсилон (ETX). *Clostridium perfringens* эпсилон-токсин типа D (EXT) вызывает серьезное неврологическое расстройство у овец и коз реже у крупного рогатого скота.

Клостридии могут вызывать поражение печени у животных. *Clostridium novyi* тип В вызывает инфекционно-некротический гепатит (INH) у овец и реже у других видов животных. Альфа-токсин *C. novyi* типа В вызывает некротизирующий гепатит и обширный отек, гиперемия и кровоизлияние во многих органах. *Clostridium haemolyticum* вызывает бациллярную гемоглинурию (БГ) у крупного рогатого скота, овец и редко у лошадей. Бета-токсин является основным фактором вирулентности *C. haemolyticum*, вызывающим некроз печени и гемолиз.

Интоксикации экзотоксинами *Clostridium perfringens* типы С и D, *C. botulinum* и *C. tetani* приводят к поражению нервной системы. Клинические признаки этих интоксикаций варьируются от вялых параличей (ботулизм) до мышечной ригидности (столбняк).

### 4. Каковы современные представления о диагностике заболеваний группы клостридиозов?

**Евгения Шилова.** Классическая микробиология аспириатов из оча-

гов поражения, образцов фекалий с приготовлением и микроспорией мазков, окрашенных по Граму и культивацией на специализированных питательных средах. Данный метод довольно трудоемкий и длительный, токсины при этом устанавливаются нейтрализацией серологических сывороток. Быстрый и точный диагноз можно поставить, подтвердив присутствие микроорганизма в образцах ткани с помощью ПЦР, флуоресцентных антител или иммуногистохимических тестов. Типизация клостридий также возможна с использованием ПЦР-тестов.

**Наталья Безбородова.** В настоящее время существует несколько методов лабораторной диагностики клостридий – классическая микробиология, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический анализ (ИХА) и, более современный, молекулярно-генетический анализ анаэробных патогенов (ПЦР). Выделение клостридий микробиологическими методами весьма затруднительно, поскольку их необходимо культивировать в строгих анаэробных условиях, а образцы часто загрязнены смешанной бактериальной флорой, что усложняет диагностику. Например, при классическом методе диагностики токсинотипы *Cl. perfringens* определяют с помощью диагностических сывороток, содержащих токсиннейтрализующие антитела соответствующих штаммов (серогруппы), которые вводят зараженным мышам. Это трудоемко и занимает много времени.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволила расширить возможности изучения клостридиозов у животных, обладая исключительной чувствительностью и

специфичностью. Важным преимуществом метода ПЦР является возможность проведения молекулярного анализа микроорганизмов напрямую из биоматериалов, минуя этап культивирования. ПЦР-исследования в «реальном времени» открыли широкие возможности в области количественного анализа геномов бактерий. В настоящее время молекулярно-генетические методы предлагают огромные возможности в изучении патогенов с применением различных методов секвенирования, маркерных генов 16SrRNA, полногеномного анализа гена бактерии для дальнейшего изучения специфических участков ДНК, наличия мутаций, связанных с антибиотикоустойчивостью или для определения таксономического (филогенетического) положения микроорганизмов. Также ПЦР позволяет определить наличие гена, ответственного за экспрессию того или иного токсина у конкретного изолята и установить токсинотип.

В настоящее время, в базе данных Pubmed размещено более 42 000 статей, посвященных проблеме клостридиозов, около 1700 последовательностей генома хранятся в базе данных Генбанка, что говорит об актуальности проблемы клостридиозов, вызывающих инфекционные заболевания у человека и животных. Использование метода ПЦР актуально при изучении распространенности клостридий среди сельскохозяйственных животных. Определение типа клостридий является важной задачей для изучения развития эпизоотологического процесса и необходимым критерием отбора штаммов для разработки эффективных вакцин, так как вакцинация – основной способ профилактики и контроля клостридиальной инфекции у коров на сельскохозяйственных предприятиях. В РФ существует лишь одна коммерческая ПЦР тест-система, выявляющая ДНК *Cl. perfringens* без определения генов, отвечающих за выработку токсинов. В настоящее время наша лаборатория разработала дан-

ную тест-систему для типизации *Cl. perfringens* и уже получены новые данные о распространении токсинотипов данного анаэроба на территории Свердловской области. ПЦР-исследования занимают 2-е суток с выдачей результатов анализа.

**Полина Аминова.** Поскольку несколько видов клостридий могут быть обнаружены в окружающей среде, в кишечнике человека и животных в качестве нормальной флоры, клостридиальные инфекции представляют постоянную угрозу для здоровья людей и животных, и их сложно диагностировать.

В целом, современная лабораторная диагностика клостридиозов включает: микробиологический метод (посев на питательные среды), микроскопический (прямая микроскопия), метод иммуноферментного анализа (ИФА), метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирование 16S рРНК (например, NGS).

Образцы для микробиологического исследования должны быть взяты у недавно умерших животных (не позднее 4-х часов после смерти животного), поскольку такие бактерии, как *C. perfringens*, *C. septicum* и кишечные факультативные анаэробы быстро проникают в организм после смерти. От павших животных в лабораторию отправляют содержимое тонкого отдела кишечника, абдоминальную жидкость, висцеральные лимфатические узлы (в первую очередь – брыжеечные), кусочки мышц, селезенки, мозга, печени, почек. Для изоляции бактерий, по возможности, следует собирать участки пораженной ткани (4 см<sup>3</sup>) или жидкости в безвоздушных контейнерах, а не образцы, взятые способом мазка, который подвергает клостридии смертельному действию атмосферного кислорода. Коммерческие системы являются хорошим вариантом, когда после использования тампон помещается в жидкую транспортную среду (Кэри-Блэра, Эймса или другую транс-

портную систему). В лаборатории осуществляют посев биоматериала из транспортной среды на питательные среды для клостридий, затем засеянные чашки Петри помещают в анаэростат при температуре 37 ± 1 °С. Посевы инкубируют до 72 часов, с оценкой роста через 24, 48, 72 часа. Идентификацию выросших колоний производят методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (время пролетная матрично-ассоциированная лазерная десорбционная ионизационная масс-спектрометрия). Методом масс-спектрометрии можно идентифицировать *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. chauvoei* и другие виды.

Получив культуру *Clostridium perfringens*, возможно протестировать микроорганизм на чувствительность к антибиотикам (бензилпенициллину, пиперациллин-тазобактаму, меропенему, ванкомицину, клиндамицину, метронидазолу), согласно рекомендациям EUCAST (Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, 2022-01-01).

Диагностические критерии большинства клостридиальных заболеваний требуют помимо посева, оценки клинических, макроскопических и микроскопических данных, а также обнаружения факторов вирулентности в кишечном содержимом и/или фекалиях, пораженных органах.

Окрашенные по Граму мазки из образцов используются для наблюдения за присутствующими морфологическими типами микроорганизмов и могут выявить крупные грамположительные палочки, которые, как правило, легко обесцвечиваются при образовании спор. Исключение составляет *Clostridium spiroforme*, который имеет изогнутую или спиральную форму. Характерные формы *C. tetani* в виде "голени" из-за того, что сферические споры являются концевыми и выпячивают клетку, можно увидеть в некротическом материале из ран, связанных со столбняком. Это наводит на размышления, но ни в коем случае не является окон-

чательным диагнозом, поскольку другие клостридии, такие как *C. tetanomorphum*, имеют аналогичную морфологию. В случаях подозрения на энтеротоксемию наличие большого количества толстых грамположительных палочек в мазке слизистой оболочки тонкой кишки от недавно умершего животного является предполагаемым свидетельством заболевания.

При некоторых клостридиальных заболеваниях, таких как энтеротоксемия, для диагностики требуется обнаружение токсина. Содержимое тонкой кишки собирают у недавно умершего животного и как можно скорее отправляют в лабораторию, так как токсины лабильны. Для обнаружения альфа, бета, эpsilon-токсинов клостридий в биоматериале используют метод ИФА. Биоматериалом для исследования на токсины является содержимое кишечника и биологические жидкости животных. Также метод ИФА используют для обнаружения антител к различным токсинам клостридий в плазме и сыворотке крови животных.

С помощью ПЦР также можно выявить наличие в материале ДНК *C. perfringens* и наличие гена *Clostridium perfringens*, кодирующего энтеротоксин. Есть разработки по мультиплексной ПЦР для быстрой идентификации нескольких клостридий путем нахождения гена флагеллина (*fli C*) *C. novyi* типа А, *C. novyi* типа В, *C. haemolyticum*, *C. septicum* и *C. chauvoei*.

При нынешней доступности ИФА, молекулярных и других методов во многих случаях больше нет необходимости использовать лабораторных животных для диагностики клостридиальных заболеваний. Однако в некоторых случаях эти тесты недостаточно чувствительны и специфичны, и требуются тесты с участием лабораторных животных. Лабораторных животных, обычно молодых морских свинок или мышей, можно использовать одним из двух способов:

– В качестве "биологических фильтров" для загрязненных об-

разцов или для материалов, которые, как считается, содержат большое количество патогенных видов *Clostridium*.

– В тестах на нейтрализацию, чтобы конкретно идентифицировать присутствующий токсин (токсины) и, следовательно, клостридиальный патоген, участвующий в заболевании. Эти процедуры чаще всего используются при столбняке, ботулизме и энтеротоксемии, вызванной *C. perfringens*.

Несмотря на успехи в понимании кишечных заболеваний, связанных с *Clostridium*, клостридиоз крупного рогатого скота остается серьезной диагностической проблемой. Например, подтверждение клинического подозрения на энтеротоксемию часто остается затруднительным, а при атипичных клинических проявлениях диагноз ставится под сомнение.

### 5. Можно ли лечить клостридиозы животных? Какое лечение может быть эффективным?

**Евгения Шилова.** Лечение малоэффективно, особенно при выделении значительного количества экзотоксинов. При столбняке и ботулизме разработаны специфические анатоксины и антитоксические сыворотки. При злокачественном отеке и эмфизематозном карбункуле, на ранних стадиях заболевания, можно проводить лечение с введением как системно (внутривенно), так и местно высоких доз парентерального пенициллина, тетрациклинов или противомикробных препаратов широкого спектра действия. Рекомендуется назначение нестероидных противовоспалительных препаратов (флуниксин меглюмин для крупного рогатого скота). Местное лечение также включает в себя хирургический разрез кожи и фасции для дренирования. Животные с признаками экстремальной токсемии нуждаются во внутривенных перфузиях электролитов.

При энтеротоксемиях ведущую роль играет коррекция электролит-

ного баланса и детоксикационная терапия. Антибиотики (пенициллины) могут быть использованы, но они малоэффективны.

**Наталья Безбородова.** В самом начале, заболевшее животное необходимо изолировать от остального поголовья. Его нужно разместить в отдельном стойле и создать максимально комфортные условия содержания. Если это алиментарный вид клостридиозов, то в первое время назначается голодание, а потом диета. Нужно промывать животному желудок, давать вяжущие препараты и пробиотики. Обязательна дезинфекция помещения при помощи средств, которые активны в отношении клостридий. При лечении клостридиозов применяют антибактериальные препараты. Наиболее эффективной считается пенициллиновая группа, метронидазол и его производные. В целом, антимикробная терапия может включать такие препараты как ампициллин, амоксициллин, хлортетрациклин, биомицин, бициллин 5, сульфадиметоксин. При раневых клостридиозах проводят обработку ран на теле животных, применяют антибиотики и специфические сыворотки.

Например, при эмфизематозном карбункуле больное животное изолируют и комплексно лечат при помощи антибиотиков и антисептиков. Сукровицу с отеками протирают перекисью водорода и марганцовкой. Сами карбункулы обрабатывают путем инъекций растворами: карбоновой кислоты (4 %); лизола (5 %); марганца (0,1 %); перекиси водорода (2 %). Для терапии применяют внутримышечно антибиотики: амоксициллин, биомицин, дибиомицин, пенициллин. Важным этапом в терапии является карантин, который проводят согласно инструкции.

При злокачественным отеке делают широкие продольные разрезы кожи и подкожной клетчатки в области отека, удаляют инфильтрат и омертвевшие участки тканей. Это открывает доступ кислорода в

рану, что создает неблагоприятные условия для анаэробов. Рану обрабатывают перекисью водорода или раствором марганцовокислого калия. Показаны также внутримышечные инъекции антибиотиков тетрациклинового и цефалоспоринового ряда.

При подозрении на ботулизм животным назначают слабительные и рвотные средства. Далее применяют сердечные препараты, глюкозу. Специфическим средством является сыворотка против ботулизма.

При столбняке антибиотики (тетрациклины и метронидазол) могут только подавлять размножение, но не лечат заболевание. Терапия носит исключительно патогенетический характер, то есть используют антитоксическую терапию и тщательную обработку ран. Из раны, которая могла оказаться воротами для возбудителя инфекции, удаляют омертвевшие ткани, скопившийся раневой секрет и обрабатывают дезинфицирующими растворами: 5 % настойкой йода, 3 % раствором карболовой кислоты, марганцовокислого калия, перекиси водорода и другими. В качестве специфического лечебного средства применяют противостолбнячную сыворотку.

При анаэробной энтеротоксемии телят больных и подозрительных по заболеванию животных изолируют и лечат. Положительный эффект на ранней стадии болезни дает антитоксическая сыворотка в сочетании с медикаментозными средствами – антибиотиками (макролидами, тетрациклинами, пенициллинами) или сульфаниламидными препаратами. Для лечения больных анаэробной энтеротоксемией рекомендуется также применять средства, регулирующие функцию желудочно-кишечного тракта.

**Полина Аминева.** При клостридиозах течение заболевания наиболее часто протекает остро, летальность при этом высокая. Терапевтические мероприятия долж-

ны быть проведены в максимально ранние сроки. С этой целью на начальных стадиях болезни необходимо введение антитоксической сыворотки в сочетании с медикаментозными средствами.

Если заболевание обусловлено *Clostridium perfringens* типов В, С и D (анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота), то применяют бивалентную антитоксическую сыворотку против анаэробной энтеротоксемии овец или поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят в сочетании с медикаментозными средствами – антибиотиками (пенициллины: амоксициллин, амоксициллин/клавуланат, метронидазол, клиндамицин и линкомицин). Сниженной активностью против анаэробных микроорганизмов обладают цефалоспорины, тетрациклины, фторхинолоны, их не следует применять для лечения клостридиозов.

При анаэробной энтеротоксемии телят, вызванной *C. perfringens* типа А, применяют противогангренозную медицинскую сыворотку.

При ботулизме, вызванном *C. botulinum*, специфической терапией является противоботулиническая сыворотка, которую вводят внутривенно как можно раньше.

При эмфизематозном карбункуле (вызван *C. chauvoei*) и злокачественном отеке (может быть вызван *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum* и др.) используют антибиотики, делают глубокие продольные разрезы кожи, подкожной клетчатки и пораженных мышц в области отека, вскрывают карманы раны и удаляют некротизированные участки тканей, орошают раны растворами антисептиков.

## 6. Как профилактируют клостридиозы крупного рогатого скота в стаде?

**Евгения Шилова.** Профилактика клостридиозов направлена на

адекватный менеджмент кормления – применение правильно сброженных кормов с соответствующей длиной волокна, поддержание здоровой микрофлоры, применение пробиотиков, профилактику ацидоза. Большое внимание необходимо уделять ветеринарно-санитарным мероприятиям – утилизации трупов животных, павших от клостридиозов, а также гигиене содержания животных, обработке ран.

Доступен широкий спектр вакцин, состоящих из бактеринов, анатоксинов или смесей бактеринов и анатоксинов. Однократная вакцинация большинством клостридиальных вакцин не обеспечивает адекватного уровня защиты и должна сопровождаться бустерной дозой в течение 3–6 недель. Вакцинация молодых животных не дает адекватного защитного иммунитета пока им не исполнится 1–2 месяца. Таким образом, большинство стратегий вакцинации нацелены на стельную корову, чтобы максимальный иммунитет передавался новорожденному через молозиво. Стратегия вакцинации должна учитывать спектр возбудителей, циркулирующих в стаде, несмотря на всю сложность установления этиологии проблем в полном объеме. Тем не менее, даже после вакцинации, в некоторых стадах периодически возникают проблемы, связанные с типами или другими видами клостридий (например, *C. difficile*), не включенных в поливалентные вакцины. В эндемичных по раневым инфекциям районах вакцинацию следует проводить до выполнения хирургических вмешательств (кастрации) и отелов коров.

**Наталья Безбородова.** Подходом к контролю болезней, вызванных бактериями рода *Clostridium*, является профилактика, состоящая из мер по своевременной вакцинации, соблюдении правил содержания и кормления животных, индивидуально разработанной в каждом хозяйстве программы

биозащиты, с выполнением и соблюдением зоосанитарного состояния на сельскохозяйственных предприятиях.

Например, профилактическая вакцинация против ЭМКАР проводится после достижения телятами трехмесячного возраста и до 4 лет. Существует 2 вида вакцин – живая вакцина (ревакцинация 1 раз в год), инактивированная (ревакцинация 2 раза в год). При локальной эпидемии в поголовье внепланово вакцинируют весь крупный рогатый скот. Переболевшие животные имеют иммунитет (телята до 3 месяцев, коровы и быки до 4 лет).

При злокачественном отеке необходимо строго соблюдать асептику при различных манипуляциях, связанных с операциями или возможностью повреждения кожи (кастрация, обрезание хвостов, ушей, т.п.), и предохранять раны от загрязнения, своевременно проводить обработку ран с иссечением пораженных тканей. Для предупреждения газового отека родовых путей необходимо производить антисептическую обработку рук и инструментов. При тяжелых родах и задержании последа больным животным рекомендуется внутримышечно вводить антибиотики. Помещения, в которых находились больные животные и предметы ухода, бывшие в соприкосновении с больными или павшими животными, дезинфицируют. Уборку трупов и дезинфекцию мест их нахождения, проводят в соответствии с требованиями и правилами о ветеринарно-санитарном надзоре за уборкой, утилизацией и уничтожением трупов. Профилактику злокачественного отека проводят поливалентным анатоксином.

Для профилактики ботулизма необходимо организовать правильную заготовку и хранение кормов и кормового сырья, не давать животным заплесневевших и загнивших кормов, а также уделять серьезное внимание чистоте кормушек. При вспышках ботулизма

рекомендуется применение с профилактической целью антиботулиновой сыворотки.

Основой профилактики столбняка является предупреждение травматизации животных. Ранним животным должна быть оказана своевременная помощь с соблюдением требований асептики и антисептики. При обширных ранениях, особенно в области конечностей, а также при тяжелых родах, ожогах, с целью профилактики столбняка животным вводят антитоксическую противостолбнячную сыворотку, желательнее не позже 12 часов после ранения. В хозяйствах, где наблюдается несколько случаев заболевания животных столбняком, рекомендуется активно иммунизировать животных анатоксином.

При анаэробной энтеротоксемии телят основой профилактики остается своевременное выпаивание качественного молозива, полноценное и безопасное кормление, в первую очередь стельных коров, и обязательная их вакцинация против клостридиозов при одновременном соблюдении всех ветеринарно-санитарных и зоогигиенических правил по содержанию и уходу за животными. Необходимо также иммунизировать всегда весь взрослый скот и телят, начиная с 2–4 недельного возраста. Практикующие ветеринарные врачи также рекомендуют применять антитоксическую сыворотку сразу после рождения телят для создания пассивного искусственного иммунитета.

**Полина Аминова.** Для профилактики раневых (травматических) токсикоинфекций необходимо строго соблюдать правила асептики и антисептики при операциях, санитарно-гигиенические условия при отелах и своевременно лечить раны.

Для предупреждения кормовых (алиментарных) токсикоинфекций запрещается скармливать влажные, заплесневелые и испорченные корма.

Всех вновь поступивших в хозяйство животных выдерживают в профилактическом карантине. Больных животных изолируют и лечат.

Одним из наиболее важных мероприятий является специфическая профилактика. Наиболее доступные клостридиальные вакцины представляют собой комбинированные вакцины против нескольких клостридиальных видов, часто включающие анатоксины, полученные из нескольких токсинотипов *C. perfringens*. Среди токсинотипов *C. perfringens* анатоксины типа С и типа D почти всегда включаются в клостридиальные вакцины, тогда как другие токсинотипы *C. perfringens* включаются не всегда. Кроме того, в вакцинах обычно присутствуют анатоксины нескольких других видов клостридий: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani*. Другой важный вопрос заключается в том, достаточно ли системного иммунитета для защиты от *C. perfringens* тип А-ассоциированных кишечных заболеваний. Поскольку *C. perfringens* является кишечным патогеном и учитывая местную активность его токсинов, можно предположить, что IgA слизистых оболочек играет более важную роль, чем IgG сыворотки, в защите от некрогеморрагического энтерита крупного рогатого скота.

Для борьбы с клостридиозами сельскохозяйственных животных разработана вакцина «АНТОКС-9» в ФКП «Ставропольская биофабрика». Согласно инструкции препарат состоит из культур клеток *C. chauvoei*, *C. septicum*, анатоксинов *C. novyi* типа А и В, *C. perfringens* типов А, С, В и D, *C. sordellii*, *C. tetani*, инактивированных формальдегидом (0,5 %).

Также разработана и изготовлена вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «Клостбовак-8». Препарат содержит в своем составе следующие компоненты: культуры клеток *C. chauvoei*, *C. septicum*, анатокси-

нов *C. novyi* 34 (oedematiens) тип В, *C. perfringens* типов А, С и D, *C. tetani*, инактивированных формальдегидом (0,5 %).

Вакцины предназначены для специфической профилактики животных с 1,5-месячного возраста, а также стельных коров.

В Испании компанией Hipra приготовлена вакцина ТОКСИПРА ПЛЮС. Антигенный состав вакцины представлен: β- и ε-токсоидами *C. perfringens* типов В, С и D, α-токсоидом *C. novyi* типа В, α-токсоидом *C. septicum*, анакультурами *C. chauvoei*, токсинотипом *C. tetani*.

Вакцина Миллениум выпускается «Венкофарма лаборатории Бразилии ЛТД». Вакцина против эмкара, газовой гангрены, энтеротоксемии, бактериальной гемоглобинурии и столбняка. Препарат предназначен для крупного рогатого скота, овец и свиней. Как указывает производитель в ее состав входят антигены: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* типов А и В, *C. perfringens* типов А, С, В и D, *C. sordellii*, *C. tetani*, *C. haemolyticum*.

Вакцина «ВанШотУльтра 8» производится в США компанией Pfizer. Данная вакцина предназначена для профилактики клостридиозов и пастереллеза крупного рогатого скота. В ее состав входят инактивированные формалином компоненты: – бактерин-токсоид *Manchemia (Pasteurella) haemolytica* и токсинотип *Clostridium chauvoei*, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens* типов D и С.

Компанией Pfizer предложена ассоциированную вакцину «Скоугард 4КС». Как указывает производитель, вакцина обеспечивает колостральный иммунитет у новорожденных телят (после выпойки молозива от вакцинированных коров). Вакцина содержит инактивированные рота – (серотипы G6 и G10) и коронавирусы (Hansen isolate) крупного рогатого скота, инактивированные бактерии *E. coli* энтеротоксигенного штамма NL-1005, имеющие адгезивный фактор K99, бета-токсоид *C. perfringens* типа С. ■