

Научная статья/Research Article

УДК 619:616.98:579.852.13:636.2

DOI: 10.36718/1819-4036-2024-8-116-121

Алексей Васильевич Нефедченко¹, Татьяна Евгеньевна Судоргина²,

Татьяна Ивановна Глотова³, Светлана Владимировна Котенева⁴,

Александр Гаврилович Глотов⁵✉

^{1,2,3,4,5}Сибирский НЦ агробιοтехнологий РАН, Краснообск, Новосибирская область, Россия

¹homeovet@narod.ru

²tatjana177@mail.ru

³t-glotova@mail.ru

⁴koteneva-sv@mail.ru

⁵glotov_vet@mail.ru

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА CLOSTRIDIUM В МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Цель исследования – разработка метода видовой идентификации 7 видов клостридий при помощи мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Представлены результаты разработки мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для видовой идентификации семи видов клостридий крупного рогатого скота. Результаты показали, что клостридиозы широко распространены в животноводческих хозяйствах Сибирского региона, проявляются в различных клинических формах и зависят от вида возбудителей и их ассоциаций. При помощи классических бактериологических методов исследовали 510 проб биоматериала от животных из семи регионов Сибири. В результате выделили и идентифицировали биохимическими методами 50 изолятов клостридий различных видов. Для подтверждения видовой принадлежности разработали мультиплексную ПЦР в режиме реального времени, позволяющую выявлять и титровать семь видов клостридий: *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. chauvoei* и *C. novyi* в смешанных и чистых бактериальных культурах с высокой степенью специфичности. Чувствительность разработанной ПЦР при исследовании искусственно синтезированных положительных контрольных образцов составила $7,2 \cdot 10^{-3}$ – $3,2 \cdot 10^2$ ГЭ, а при исследовании чистых культур – 10^2 – 10^3 КОЕ/мл. Специфическая реакция была только с клостридиями своего вида, но не с клостридиями других видов или другими видами бактерий. Показана высокая специфичность использования ПЦР в реальном времени, позволяющая одновременно выявлять клостридии в смешанных и чистых бактериальных культурах, что делает ее перспективным методом в лабораторной диагностике различных форм клостридиозов крупного рогатого скота.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, клостридиозы, анаэробные бактерии, токсины, бактериологические методы, ПЦР в реальном времени

Для цитирования: Разработка метода видовой идентификации бактерий рода *Clostridium* в мультиплексной ПЦР в режиме реального времени / А.В. Нефедченко [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 8. С. 116–121. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-8-116-121.

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

Alexey Vasilyevich Nefedchenko¹, Tatyana Evgenievna Sudorgina², Tatyana Ivanovna Glotova³, Svetlana Vladimirovna Koteneva⁴, Alexander Gavrilovich Glotov⁵✉

1,2,3,4,5Siberian FSC of Agrobiotechnology of the RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia

¹homeovet@narod.ru

²tatjana177@mail.ru

³t-glotova@mail.ru

⁴koteneva-sv@mail.ru

⁵glotov_vet@mail.ru

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR SPECIES IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE GENUS *CLOSTRIDIUM* BY MULTIPLEX REAL-TIME PCR

The aim of the study is to develop a method for species identification of 7 species of clostridia using multiplex real-time PCR. The paper presents the results of the development of a multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for species identification of seven species of cattle clostridia. The results showed that clostridiosis is widespread in livestock farms of the Siberian Region, manifests itself in various clinical forms and depends on the type of pathogens and their associations. Using classical bacteriological methods, 510 samples of biomaterial from animals from seven regions of Siberia were examined. As a result, 50 isolates of clostridia of various species were isolated and identified using biochemical methods. To confirm species identity, a multiplex real-time PCR was developed that allows detection and typing of seven species of clostridia: *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. chauvoei* and *C. novyi* in mixed and pure bacterial cultures with a high degree of specificity. The sensitivity of the developed PCR in the study of artificially synthesized positive control samples was $7.2 \cdot 10^{-3}$ – $3.2 \cdot 10^2$ GE, and in the study of pure cultures – 10^2 – 10^3 CFU/ml. The specific reaction was only with clostridia of its own species, but not with clostridia of other species or other types of bacteria. High specificity of the use of real-time PCR was demonstrated, allowing for the simultaneous detection of clostridia in mixed and pure bacterial cultures, which makes it a promising method in the laboratory diagnostics of various forms of cattle clostridiosis.

Keywords: cattle, clostridiosis, anaerobic bacteria, toxins, bacteriological methods, real-time PCR

For citation: Development of a method for species identification of bacteria of the genus *Clostridium* by multiplex real-time PCR / A.V. Nefedchenko [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(8): 116–121 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-8-116-121.

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

Введение. Клостридии относятся к роду *Clostridium*, семейству *Clostridiaceae*, порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, отряду *Fermicutes*. Болезни, вызываемые клостридиями, условно подразделяют на три основных типа: нейротоксические, гистотоксические и кишечные [1, 2].

Патогенными клостридиями, оказывающими наибольший ущерб животноводству, являются *C. chauvoei* (эмфизематозный карбункул), *C. novyi* (*C. oedematiens*) тип А, *C. septicum*, *C. sordellii* (злокачественный отек), *C. haemolyticum* (*C. novyi* тип D) (бациллярная гемоглобинурия), *C. perfringens* тип А и D (злокачественный отек, газовая

гангрена, некротизирующие энтериты, метриты, мастит), *C. septicum*, *C. oedematiens* (*C. novyi*), *C. histolyticum* (злокачественный отек, браздотоподобные инфекции) и *C. difficile* (некротические энтериты, диареи) [3].

Помимо описанных выше видов клостридий, от крупного рогатого скота выделяют и другие, многие из которых при благоприятных условиях могут синтезировать экзотоксины и вызывать соответствующую патологию. Поэтому для диагностики клостридиозов крупного рогатого скота необходимо проводить видовую идентификацию выделенных бактериальных культур.

В настоящее время в России основным методом видовой идентификации выделенных культур клостридий является определение их фенотипических и биохимических свойств [4, 5]. Для окончательной идентификации клостридий необходимо проводить дополнительные тесты, усложняющие и увеличивающие сроки ее проведения [6, 7].

Методы дифференциации возбудителей, основанные на выявлении генов, специфических для каждого вида микроорганизмов в образце, лишены этого недостатка. В настоящее время разработаны различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления отдельных видов клостридий и типирования выделенных изолятов по факторам токсигенности [1, 8].

Цель исследования – разработка метода видовой идентификации 7 видов клостридий: *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. chauvoei* и *C. novyi* – при помощи мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

Объекты и методы. Работа выполнена в 2021–2024 гг. в лаборатории биотехнологии диагностического центра Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН.

Бактериологические исследования проводили согласно ГОСТ 26503-85 «Методы лабораторной диагностики клостридиозов».

Видовую идентификацию бактериальных культур по ферментативным свойствам проводили с использованием «Набора для идентификации анаэробных бактерий АНАЭРОтест 23» производства Erba Mannheim (Чехия).

Для исследования в ПЦР в реальном времени отбирали отдельные колонии выросших бактерий. Суммарную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «Ампли Прайм РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию проводили в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad, США). Температурный режим проведения ПЦР: 95 °С – 5 мин – 1 цикл;

95 °С – 15 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с – 45 циклов.

В качестве положительного контроля ПЦР использовали изоляты *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. novyi*, *C. sporogenes*, охарактеризованные по культуральным и биохимическим свойствам. Для определения аналитической чувствительности реакции – искусственно синтезированные положительные контрольные образцы (ПКО). Специфичность амплификации проверяли с культурами других микроорганизмов.

Результаты и их обсуждение. В период с 2021 по 2024 г. исследовали 510 проб биологического материала от животных разных половозрастных групп из 32 хозяйств Иркутской, Кемеровской, Новосибирской, Омской, Тюменской областей, Алтайского края с клиническими проявлениями клостридиозов, описанных нами ранее [7].

Из органов больных животных чаще изолировали *C. perfringens*, *C. histolyticum* и реже – *C. septicum*, *C. sporogenes*, *C. sordellii* и *C. novyi*.

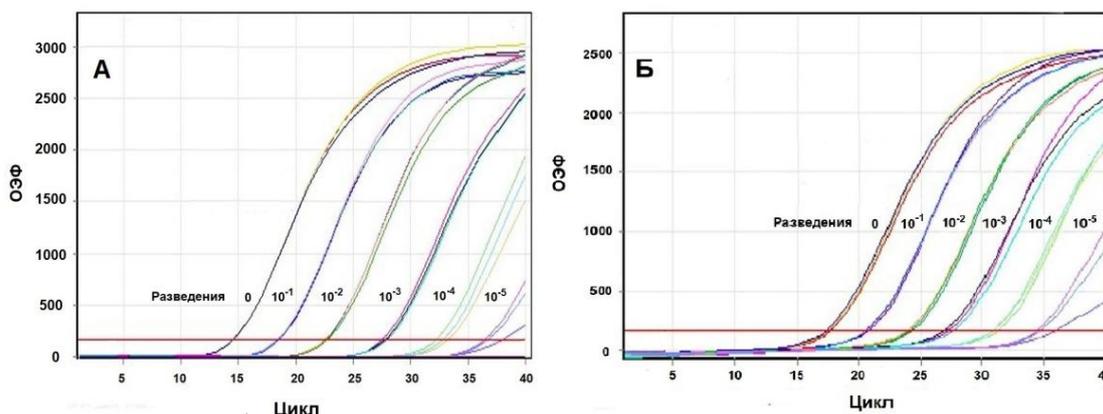
По фенотипическим и биохимическим свойствам идентифицировали 50 изолятов клостридий, которые были использованы в дальнейшей работе при разработке мультиплексной ПЦР.

Нами был проведен анализ нуклеотидных последовательностей геномов бактерий *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. chauvoei* и *C. novyi* из базы данных NCBI (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и определены наиболее консервативные участки геномов. Поиск олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с использованием программы Vector NTI 9.0.0 (InforMax). Для идентификации генетического материала каждого из семи видов клостридий подобрали по три различных варианта праймеров и зондов, из которых выбрали наиболее специфичные [9].

Диагностическую чувствительность определили с помощью титрования суточных культур каждого изолята методом серийных разведений, а аналитическую – ПКО (табл., рис.).

Аналитическая и диагностическая чувствительность при исследовании 10-кратных разведений культур бактерий и ПКО

Вид бактерии	Аналитическая чувствительность		Диагностическая чувствительность	
	Минимально определяемая концентрация ПКО (ГЭ в реакции)	Значение Ct в последнем разведении, детектируемом положительно (среднее Ct ± S.D.)	Минимально определяемая концентрация бактерий, КОЕ/мл	Значение Ct в последнем разведении, детектируемом положительно (среднее Ct ± S.D.)
<i>C. sporogenes</i>	$1,6 \cdot 10^2$	$37,83 \pm 0,12$	10^3	$38,83 \pm 0,12$
<i>C. perfringens</i>	$7,2 \cdot 10$	$38,29 \pm 0,75$	10^2	$35,58 \pm 0,64$
<i>C. sordellii</i>	$9,0 \cdot 10$	$35,38 \pm 0,32$	10^2	$34,58 \pm 0,84$
<i>C. histolyticum</i>	$1,5 \cdot 10^2$	$35,55 \pm 0,46$	10^3	$36,25 \pm 0,44$
<i>C. septicum</i>	$1,8 \cdot 10^2$	$38,83 \pm 0,26$	10^3	$37,83 \pm 0,12$
<i>C. chauvoei</i>	$9,2 \cdot 10$	$35,39 \pm 0,55$	—	—
<i>C. novyi</i>	$3,2 \cdot 10^2$	$33,38 \pm 0,22$	10^2	$34,38 \pm 0,32$



Результаты ПЦР с 10-кратными разведениями ПКО и культуры бактерий. Показано только для *C. perfringens* (А) и *C. novyi* (Б)

Результаты показали, что среднее количество ПКО, выявляемое в реакции, составило $1,5 \cdot 10^2$ ГЭ и различалось для разных образцов. Минимально выявляемое количество ПКО составило $7,2 \cdot 10$ ГЭ на реакцию для *C. perfringens*, до $3,2 \cdot 10^2$ ГЭ на реакцию для *C. novyi*. Расчетная эффективность амплификации для различных ПКО была равна $\approx 92\%$ при достоверности аппроксимации (R^2), равной от 0,9 865 до 0,9 931. Стандартные отклонения значений пороговых циклов находились в диапазоне от 0,12 до 0,75. Средние коэффициенты вариаций значений пороговых циклов при повторных исследованиях не превышали 1,91 %, что свидетельствует о высокой повторяемости результа-

тов определения аналитической чувствительности ПЦР. Диагностическая чувствительность реакции составила от 10^2 до 10^3 КОЕ/мл с исследованными изолятами клостридий. Диагностическую чувствительность реакции для *C. chauvoei* не определяли из-за отсутствия выделенного изолята.

Для повышения чувствительности и специфичности разработанной реакции подобрали оптимальные концентрации $MgCl_2$, dNTP, а также температурно-временной режим реакции, при которых наблюдалась наивысшая интенсивность сигнала флуоресценции при высокой специфичности.

Для определения специфичности реакции исследовали ранее выделенные изоляты клостридий, контрольные штаммы бактерий *M. haemolytica*, *E. coli*, *P. multocida*, *S. typhimurium*. Дополнительно для определения специфичности реакции провели исследование вакцины «Ультра-чойс 8» (Zoetis Inc., США), содержащую инактивированные формалином цельноклеточные *C. chauvoii*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens*, *C. haemolyticum*. Специфическая реакция была только с клостридиями своего вида, но не с клостридиями других видов или другими видами бактерий.

Заключение. В результате проведенных исследований разработана мультиплексная ПЦР в режиме реального времени, позволяющая осуществлять видовую идентификацию клостридий в смешанных и чистых бактериальных культурах с высокой степенью чувствительности и специфичности.

Список источников

1. Moore R.J., Lacey J.A. Genomics of the Pathogenic Clostridia // Microbiol Spectr. 2019. 7(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.
2. Clostridial Diseases of Animals. John Wiley & Sons, Ltd. / R.O.S. Silva [et al.] // Gangrene Gas (Malignant Edema). 2016. P. 243–254.
3. Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота / А.В. Капустин [и др.] // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. № 63. С. 170–175
4. Данилюк А.В., Капустин А.В. Распространенность и видовое разнообразие клостридий – возбудителей анаэробных инфекций крупного рогатого скота // Тр. Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 2019. № 81. С. 19–26. DOI: 10.30917/ATT-PRINT-2019-10.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes . 2nd Ed. New York: Springer-Verlag; 2009. P. 1309–1329. DOI: 10.1007/978-0-387-68489-5_2.
6. Устойчивость возбудителей мастита у коров к антибактериальным препаратам / Т.И. Глотова [и др.] // Вестник КрасГАУ.

2023. № 3. С. 95–100. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-3-95-100.

7. Частота выделения бактерий *Clostridium spp.* и их ассоциаций при различных формах клостридиоза крупного рогатого скота / Т.Е. Сударгина [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2024. № 54 (3). С. 55–62. DOI: 10.26898/0370-8799-2024-3-6.
8. Comparing the identification of *Clostridium spp.* by two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: a detailed analysis of age of culture and sample preparation / R. Chean [et al.] // Anaerobe. 2014. № 30. P. 85–89. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.007.
9. Использование молекулярно-генетических методов для типирования клостридий видов *C. sporogenes*, *C. perfringens* и *C. sordellii* / А.В. Нефедченко [и др.] // Молекулярная диагностика: сб. тр. XI Междунар. науч.-практ. конф. М., 2023. С. 354–355.

References

1. Moore R.J., Lacey J.A. Genomics of the Pathogenic Clostridia // Microbiol Spectr. 2019. 7(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.
2. Clostridial Diseases of Animals. John Wiley & Sons, Ltd. / R.O.S. Silva [et al.] // Gangrene Gas (Malignant Edema). 2016. P. 243–254.
3. Razrabotka metoda kontrolya immunogennoj aktivnosti associirovannoj vakciny protiv klostriديوзов крупного рогатого скота / А.В. Капустин [и др.] // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. № 63. S. 170–175
4. Danilyuk A.V., Kapustin A.V. Rasprostranennost' i vidovoe raznoobrazie klostrij – vozbu-ditelej ana`erobnyh infekcij крупного рогатого скота // Tr. Vserossijskogo NII `eksperimental'noj veterinarii im. Ya.R. Kovalenko. 2019. № 81. S. 19–26. DOI: 10.30917/ATT-PRINT-2019-10.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes . 2nd Ed. New York: Springer-Verlag; 2009. R. 1309-1329. DOI: 10.1007/978-0-387-68489-5_2.

6. Ustojchivost' vozbuditelej mastita u korov k anti-bakterial'nym preparatam / *T.I. Glotova* [i dr.] // Vestnik KrasGAU. 2023. № 3. S. 95–100. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-3-95-100.
7. Chastota vydeleniya bakterij *Clostridium spp.* i ih asociacij pri razlichnyh formah klostridioza krupnogo rogatogo skota / *T.E. Sudorgina* [i dr.] // Sibirskij vestnik sel'skohozyajstvennoj nauki. 2024. № 54 (3). S. 55-62. DOI: 10.26898/0370-8799-2024-3-6.
8. Comparing the identification of *Clostridium spp.* by two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: a detailed analysis of age of culture and sample preparation / *R. Chean* [et al.] // Anaerobe. 2014. № 30. P. 85–89. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.007.
9. Ispol'zovanie molekulyarno-geneticheskikh metodov dlya tipirovaniya klostridij vidov *C. sporogenes*, *C. perfringens* i *C. sordellii* / *A.V. Nefedchenko* [i dr.] // Molekulyarnaya diagnostika: sb. tr. XI Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. M., 2023. S. 354–355.

Статья принята к публикации 01.04.2024 / The article accepted for publication 01.04.2024.

Информация об авторах:

Алексей Васильевич Нefeldchenko¹, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностического центра, доктор ветеринарных наук
Татьяна Евгеньевна Судоргина², старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностического центра, кандидат ветеринарных наук
Татьяна Ивановна Глотова³, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностического центра, доктор биологических наук, профессор
Светлана Владимировна Котенева⁴, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностического центра, кандидат ветеринарных наук
Александр Гаврилович Готов⁵, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностического центра, доктор биологических наук, профессор

Information about the authors:

Alexey Vasilyevich Nefedchenko¹, Leading Researcher at the Laboratory of Biotechnology – Diagnostic Center, Doctor of Veterinary Sciences
Tatyana Evgenievna Sudorgina², Senior Researcher, Biotechnology Laboratory – Diagnostic Center, Candidate of Veterinary Sciences
Tatyana Ivanovna Glotova³, Chief Researcher, Biotechnology Laboratory – Diagnostic Center, Doctor of Biological Sciences, Professor
Svetlana Vladimirovna Koteneva⁴, Leading Researcher, Biotechnology Laboratory – Diagnostic Center, Candidate of Veterinary Sciences
Alexander Gavrilovich Glotov⁵, Chief Researcher, Biotechnology Laboratory – Diagnostic Center, Doctor of Biological Sciences, Professor

