

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛОСТРИДИЙ ОТ САЙГАКОВ

С.К. Копеев , Ж.К. Кыдырбаев , Р.А. Рыстаева , К.А. Шораева 
М.Д. Алмежанова* , А.А. Керимбаев , М.Б. Орынбаев 

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
Национальный холдинг «QazBioPharm»,
пгт Гвардейский, Казахстан
*m.almezhanova@biosafety.kz

Аннотация. По результатам эпизоотологического обследования местности и микробиологических исследований патологического материала от сайгаков, доставленных из Западно-Казахстанской области во время эпизоотий 2010 и 2011 годов установлена причина массового падежа сайгаков. В мазках-отпечатках из внутренних органов павшего сайгака обнаружены грамположительные бактерий со спорами, расположенные преимущественно субтерминально. На бактериологических питательных средах показан рост колоний бактерий в виде интенсивной мути (МПБ), равномерного помутнения (Китта-Тароцци) с обильным газообразованием, колоний мелких, круглых, гладких, бесцветных (кровяной агар). При микроскопировании колоний на среде Китта-Тароцци обнаружены грамположительные толстые короткие бактерии. Зараженные культурой бактерий белые мыши погибли через 16-18 часов с признаками полнокровия и отека. В мазках-отпечатках от внутренних органов павших мышей обнаружены грамположительные бактерий с закругленными концами.

На основании проведенных исследований утверждается, что сайгак пал от анаэробных клостридиозов. Определена видовая принадлежность выделенных бактерий (*Clostridium histolyticum* и *Clostridium perfringens*) по результатам изучения биохимических, молекулярно-генетических свойств культур.

Ключевые слова: сайгак; эпизоотология; клостридия; микроскопия; идентификация; биохимические свойства; вспышка; инфекционная болезнь; бактерия.

Введение

Сайгак - уникальный представитель древнего рода животных, относящийся к семейству полорогих, отряду парнокопытных, который обитает в степях и полупустынях Казахстана, в Узбекистане, России и западной Монголии [1]. В настоящее время около 90 % популяции сайгаков обитает в Казахстане, по ареалу обитания они разделены на три популяции: устюртская, обитающие в Актюбинской и Кызылординской областях, бетпакдалинская – в регионах центрального Казахстана (Костанайская, Карагандинская и Акмолинская области) и уральская, сосредоточенная в Западно-Казахстанской области. По оценке специалистов, за последние 20 лет, популяция степных антилоп в Казахстане сократилась в 24,7 раза и в 2009 году численность сайгаков составила 81000 голов (в 2000 году насчитывалось около миллиона сайгаков) [2].

Начиная с 2010 года состояние популяции сайгаков ежегодно весной невольно у всех, кто как-то в силу своих функциональных обязанностей связан с ними, а также у простых граждан вызывает тревогу. Это во многом связано с их здоровьем и сохранностью, как свидетельствуют многолетние наблюдения, именно весной в период окота отмечается внезапная массовая гибель животных. В период 2010-2015 гг. в различных регионах Казахстана ежегодно отмечена массовая гибель сайгаков, что угрожает сохранению популяции этих древних животных в мировом масштабе. Свидетельством сказанному является падеж сайгаков в Жаныбекском районе ЗКО в 2010 и 2011 гг., соответственно 11920 гол. и 441 гол.; в 2012 г. в Костанайской области – 1000 гол.; 2013 г. – в Акмолинской области – 800 гол.; 2015 г. – в Костанайской и Актюбинской областях более 150000 гол. [3].

Инфекционные болезни на протяжении последних двадцати лет не рассматривались в качестве потенциальной угрозы для вида, поскольку в течение ряда лет не отмечались эпизоотические вспышки среди сайгаков. Но, массовая гибель сайгаков, произошедшая в мае месяце 2010 и 2011 годов в Западно-Казахстанской области, показала, что инфекционные заболевания являются основным лимитирующим фактором численности сайгаков.

Клостридии широко распространены в окружающей среде и представляют собой довольно разнородную группу. Представители рода *Clostridium* относятся к числу широко распространенных микроорганизмов. Они встречаются повсеместно в окружающей среде: воздухе, почве, воде, разлагающейся растительности, продуктах питания, а также в кишечном тракте людей и животных [4].

Клостридии вызывают три смертельно опасных заболевания – газовую гангрену (*C. perfringens* и другие «гистотоксические» клостридии), столбняк (*C. tetani*) и ботулизм (*C. botulinum*). Кроме того, они причастны к патологии пищеварительного тракта, включая относительно легко протекающие гастроэнтериты и деструктивные процессы, требующие активного лечения (*C. perfringens*, *Clostridioides difficile*). К патогенным видам также относятся *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* типов А и В, *C. haemolyticum*, *C. sordellii*, *C. colinum*, *C. spiroforme* и др. Патогенность клостридий связана со способностью продуцировать мощные токсины, которые образуются в инфицированном организме или во внешней среде.

К санитарно-показательным микроорганизмам относят клостридии, редуцирующие сульфит-ионы на железосульфитном агаре при температуре $44\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16-18 ч. Эта группа на 90 % представлена *C. perfringens*, обитающей в кишечнике большинства людей и животных. Количественный учет клостридий предусмотрен при исследовании потенциальных источников пищевых отравлений – пищевых продуктов (мясных, молочных, рыбных, мяса птицы), почвы, воды открытых водоемов и лечебных грязей [5].

Целью нашего исследования являлось определение возбудителя болезни сайгаков, вызвавшей массовую гибель в 2010-2011 годах в Западно-Казахстанской области.

Исходя из этого, нами были проведены исследования по выделению и идентификации клостридий от сайгаков.

Материалы и методы

Изучение причин массовой гибели сайгаков в Западно-Казахстанской области проводилось на территории Борсинского и Жаксыбайского сельских округов Жанибекского района путем эпизоотологического обследования территории и сбором проб патологического материала. Для лабораторного исследования отбирались пробы патологического материала у павших сайгаков (кровь, кусочки сердца, печени, почки и селезенки) и готовили мазки-отпечатки внутренних органов. Транспортировка осуществлялась в термоконтейнере со льдом. Пробы биологического материала, доставленные в НИИПББ подвергались комплексному бактериологическому исследованию на наличие возбудителей инфекционной болезни.

Исследования биоматериала на выявление и идентификацию возбудителей бактериальных инфекций состояли из микроскопии мазков крови и отпечатков из органов сайгака, окрашенных по Граму, выделения бактериальной культуры из проб высевом на питательные среды и идентификации культуры.

В качестве редуцирующих веществ используют кусочки животных тканей (печень, мозг, почки, селезенка), которые связывают растворенный в среде кислород и адсорбируют бактерии. Согласно литературным данным, некоторыми нормативными документами в Российской Федерации для культивирования мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов рекомендована среда Китта–Тароцци – жидкая или полужидкая среда, содержащая в своем составе кусочки печени, мяса или рыбы [6, 7]. В МУК 4.2.2316-08 она названа среда Тароцци [8].

Тем самым, научные эксперименты были проведены на бактериологических питательных средах Китта-Тароцци, МПБ – мясопептонный бульон, МПА – мясопептонный

агар, кровяном агаре и кровяно-солевом агаре с последующим идентифицированием молекулярно-генетическим методом ПЦР.

Результаты исследований и их обсуждение

При сборе эпизоотологических данных во время эпизоотии 2010-2011 годах среди сайгаков были замечены следующие клинические признаки: понос, шаткая походка, нарушение координации движения, животные падали, попытки подняться были безуспешны и наблюдались судороги задних конечностей. При этом животные находились в сознании и реагировали на окружающее. У погибших животных наблюдалось вздутие живота, пена изо рта и носа.

В мазках-отпечатках из внутренних органов павшего сайгака, приготовленных в полевых условиях, видны крупные палочки, окрашенные по Граму, которые имеют округлые концы, на некоторых заметно образование капсулы и просматриваются споры, расположенные преимущественно субтерминально (ближе к концу бактерии). Микрофотоснимок препарата представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Мазок-отпечаток из печени сайгака, толстые грамположительные палочки. Окраска по Граму. Ув. 1000.

Микроскопия препаратов крови и внутренних органов мертвого сайгака, доставленных через сутки после отбора пробы показали наличие спорообразующих бактерий. Споры большие овальной формы, превышают в диаметре размер палочки, расположены субтерминально и по центру бактериальной палочки. Как видно из рисунка 2, в мазках крови (Рисунок 2 (а, в)) просматриваются бактерии – палочки с закругленными концами и бактерии со спорами. В отпечатке печени сайгака (Рисунок 2 (б)) обнаружены веретенообразные бактерии со спорами, что характерно для возбудителя клостридиозов. Заметно, что споры большие овальной формы, превышают в диаметре размер палочки.

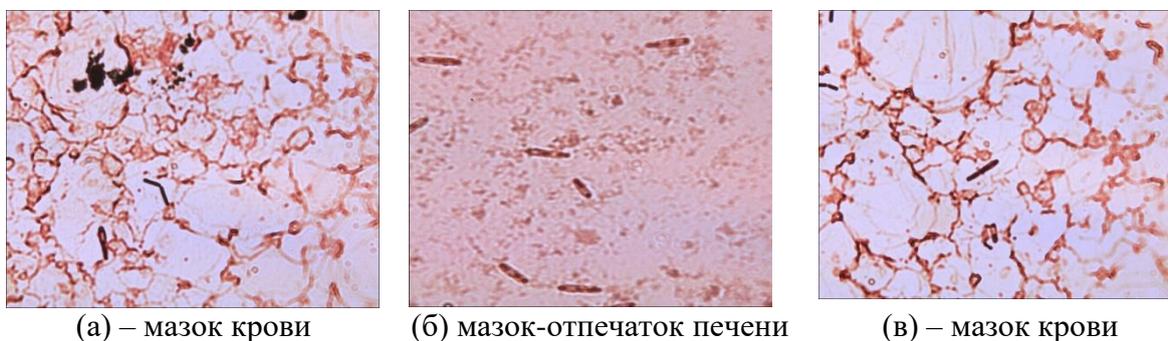


Рисунок 2 – Спорообразующие бактерии в мазках крови и печени павшего сайгака. Окраска по Граму. Ув. 1000

Выделение бактериальных культур проводили на средах Китта-Тароцци, МПБ, МПА, кровяном агаре и кровяно-солевом агаре [9]. Посевной материал инкубировали в термостате

при 37 °С, а для выделения анаэробов в эксикаторе с углекислым газом. На бактериологических питательных средах рост культур наблюдается на вторые сутки. Через 18-24 часа культивирования в среде Китта-Тароцци наблюдался рост бактерий в виде равномерного помутнения с обильным газообразованием. Культуральная характеристика роста бактерий в среде Китта-Тароцци представлена на рисунке 3, где заметно образование газовой пены на поверхности масляного слоя.



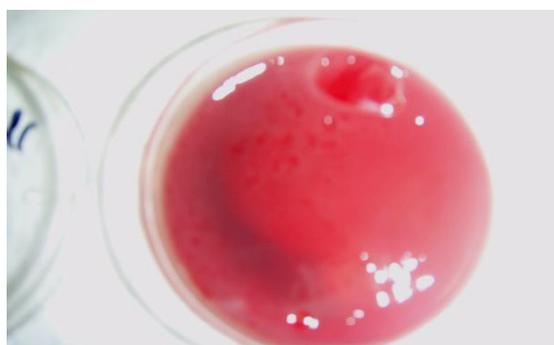
Рисунок 3 – Рост бактериальной культуры в среде Китта-Тароцци

На 3-4 сутки заметно просветление бульона и осадок на дне пробирки. На МПБ наблюдается интенсивная муть, равномерно распределенная по всей пробирке.

На кровяном агаре на 2-3 сутки в анаэроостате выросли колонии мелкие, круглые, гладкие, бесцветные, гемолиз слабый (Рисунок 4 (а)). Кроме этого, имеет рост вуалеобразных, слизистых колоний, бежевого цвета (Рисунок 4 (б)).



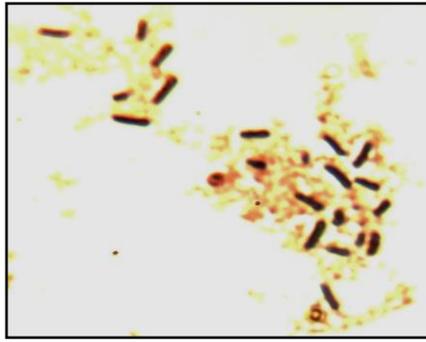
а) мелкие, круглые, блестящие колоний



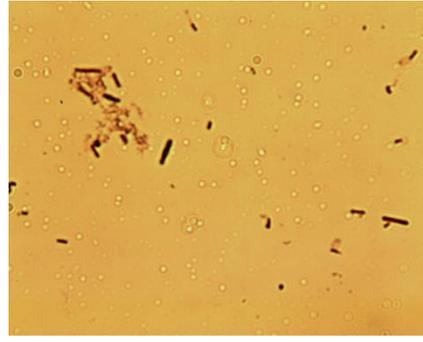
б) беловатый налет

Рисунок 4 – Рост колоний на кровяном агаре

Микроскопирование мазков, приготовленных из 24-часовой бактериальной культуры, проросшие на среде Китта-Тароцци, показало, что бактерии в среде Китта-Тароцци имеют вид грамположительных толстых коротких палочек с закругленными концами, расположенные одиночно. При рассмотрении бактерий заметно формирование спор по центру и ближе к концу бактерий. Фотоснимки бактерий представлены на рисунке 5.



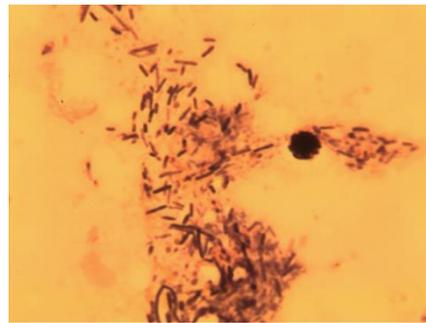
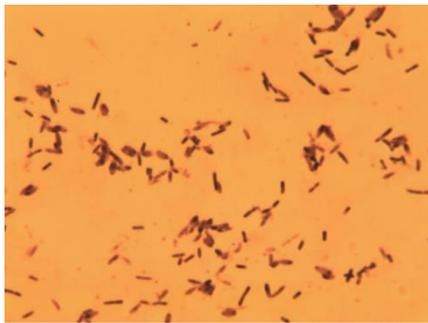
а) рост бактерий из почки



б) рост бактерий из печени

Рисунок 5 – Грамположительные палочки в среде Китта-Тароцци.
Окраска по Граму. Ув. 1000

Микроскопия мазков культур, проросших на кровяном агаре показала наличие преимущественно одиночно расположенных грамположительных бактерий (Рисунок 6). Встречаются бактериальные палочки, расположенные параллельно и цепочкой из двух бактерий. При рассмотрении заметно формирование спор, а также рост нитевидных бактерий.



а) рост бактерий на кровяносолевом агаре из селезенки; б) рост бактерий на кровяном агаре из сердца

Рисунок 6 – Бактерии на кровяном агаре. Окраска по Граму. Ув. 1000

Суточной культурой выделенных бактерий была поставлена биопроба на лабораторных животных. Белых мышей заразили внутрибрюшинно по 0,3 мл микробной суспензии. Животные погибли через 16-18 часов. При вскрытии павших животных в брюшной полости обнаружен серозно-геморрагический выпот. Кишечник вздут, сосуды его кровенаполнены. Печень набухшая, полнокровная, бордового цвета, на разрезе сглажен. Мышцы отекающие, сочные, имеются геморрагические инфильтраты. Подкожные сосуды полнокровны.

У подопытных мышей из органов приготовили мазки-отпечатки и провели микроскопию, при этом также обнаружены микроорганизмы сходные с выделенными микроорганизмами у сайгаков. Грамположительные палочки с закругленными концами, находящиеся в капсуле расположены одиночно, парно и короткими цепочками.

Данный опыт подтверждает, что падеж сайгаков был бактериальной этиологии и возбудителем инфекции были анаэробные клостридии.

Для определения видовой принадлежности выделенных бактерий провели исследования по определению биохимических свойств культур. Были отобраны две культуры, обладающие выраженными патогенными свойствами и культурально-морфологические характеристики, которые соответствовали клостридиозам. При этом культура №1 не проявляла ярких сахаролитических свойств и не образует индол, но вырабатывают сероводород и разжижают желатин (Рисунок 7), что характерно для

Clostridium histolyticum. Культура №2 обладала сахаролитическими свойствами на глюкозу, лактозу, глицерин, мальтозу и сахарозу с образованием кислоты, что заметно на рисунке 8 по лакмусовой бумаге. Не ферментируют манит. Протеолитическая активность по отношению к желатину слабая, по сравнению с культурой №1. На основании полученных данных по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам данная культура отнесена к виду *Clostridium perfringens*.

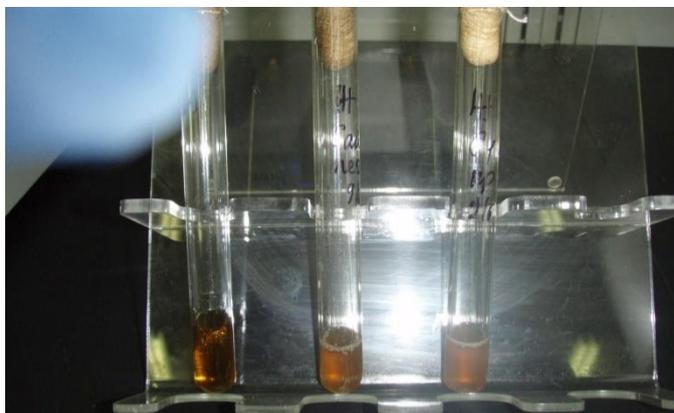


Рисунок 7 – Разжижение желатина

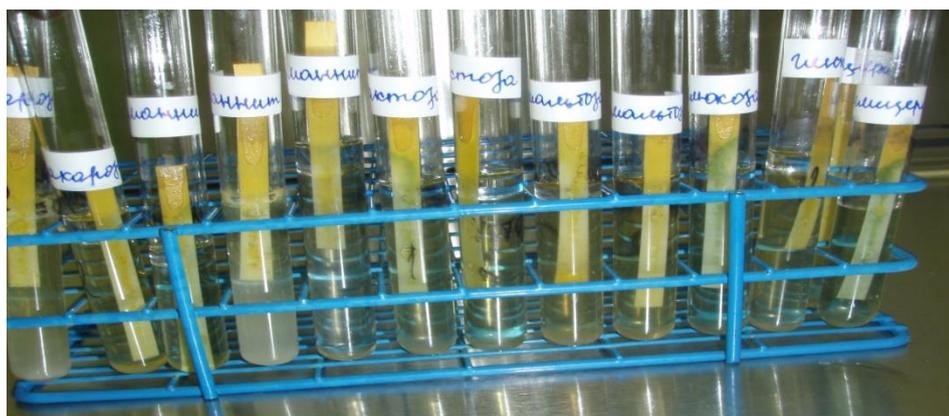


Рисунок 8 – Сахаролитические свойства культур

Выделенными культурами *Clostridium perfringens* и *Clostridium histolyticum* заразили морских свинок подкожно в области бедра по 0,5 суточной культуры и мышей подкожно по 0,3 мл. Животные пали через 8-18 часов.



а) лизис мышечной ткани (культура *C. histolyticum*)



б) пораженная брюшная полость (культура *C. perfringens*)

Рисунок 9 – Патологические изменения в органах морской свинки

Трупы животных вздуты. При вскрытии павших животных подкожные сосуды полнокровны, на месте инокуляции наблюдается серозно-геморрагический инфильтрат. Толстый и тонкий отделы кишечника геморрагически воспалены. В сердце геморрагический инфаркт миокарда, сосуды сердца инъецированы. Легкие местами спавшиеся ателектаз. Печень неоднородно окрашена, кровенаполнена. На животных, зараженных культурой *C. histolyticum* мышцы бедра на месте инокуляции темно-красного цвета. Мышцы деструктивно изменены, обнаруживаются геморрагические инфильтраты в скелетной мускулатуре.

В то время как предполагаемый диагноз *C. perfringens* может быть поставлен на основании клинических и патологических данных, подтверждение обычно выполняется с помощью традиционных методов микробиологического выделения и характеристики, включая бактериальный посев, биохимический анализ и иммуноферментный анализ [10, 11]. Традиционные процедуры культивирования являются дорогостоящими и трудоемкими и позволяют обнаружить только живые микроорганизмы. Таким образом, современные традиционные методы обнаружения неприменимы для обнаружения нежизнеспособных бактерий, таких как те, которые обнаружены в образцах тканей, зафиксированных формалином. ПЦР является общепринятым, быстрым и чувствительным методом обнаружения микробных патогенов, особенно в ситуациях с низким числом бактериальных копий [12]. Для выявления *C. perfringens* у сайгаков использовали ПЦР-анализы [13, 14, 15, 12].

Бактериальные культуры *Clostridium perfringens*, выделенные из органов павших сайгаков были идентифицированы методом ПЦР.

Для постановки ПЦР использовали фермент Taq DNA Polymerase. Реакционный состав и температурно-временные режимы подбирали согласно аннотации, прилагаемой к ферменту и характеристикам праймеров.

Наработка специфических участков ДНК проведена в термоциклере GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems.

Электрофорез продуктов амплификации ДНК проводили в аппарате для горизонтального электрофореза «G-100», фирмы «Pharmacia». Для электрофореза использовали 1,5 % раствор агарозы в TBE-буфере. Документирование полученных результатов проведено при помощи фотографирования гелей в гель-документирующей системе «BioRad». В качестве сравнительного маркера молекулярных масс использовали 1 kb Marker, фирмы Invitrogen.

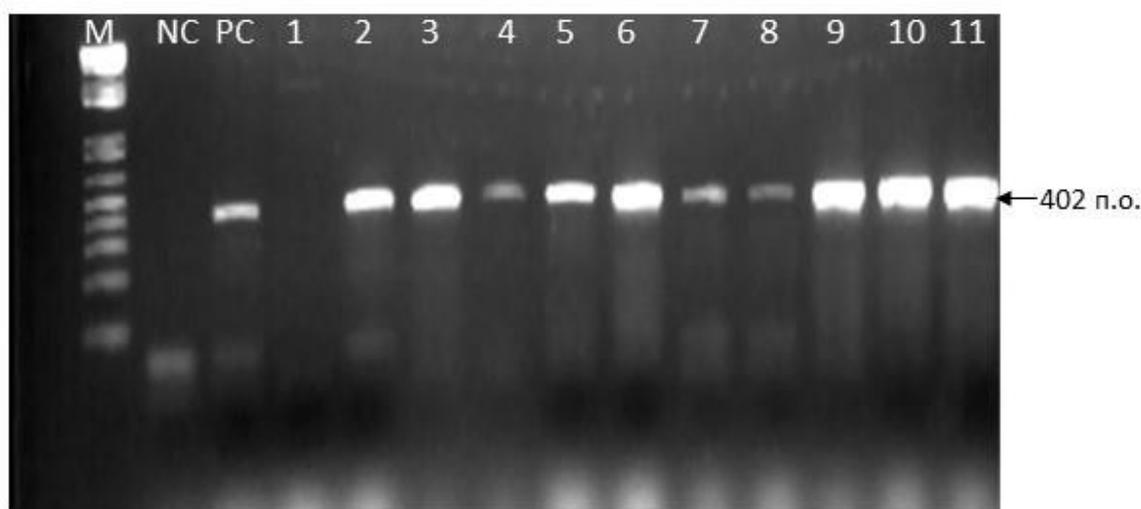


Рисунок 12 - Электрофореграмма продуктов амплификации α -токсина *Clostridium perfringens*

М – молекулярный маркер, NC – отрицательный контроль, PC – положительный контроль, № - 1 по 11 образцы, размер продукта амплификации – 402 п.н.

В результате проведения ПЦР наработаны все образцы в размере 402 п.о., кроме пробы №1, тогда как положительный контроль сработал положительно, отрицательный контроль – отрицательно. Тем самым, подтверждается наличие ДНК возбудителя клостридий у павших сайгаков.

Установлено, что штаммы *Clostridium perfringens* продуцируют только альфа-токсин и относятся к типу А. *C. perfringens* типа А – возбудитель некротического энтерита крупного рогатого скота, гангренозного мастита коров, энтеротоксемии телят [16]. Бактерия образует α -токсин невысокой активности (100-200 Dlm/ml для белых мышей), поэтому болезни протекают менее остро, чем при заражении другими типами бактерии, а летальность животных не превышает 25 % [17, 18, 19].

По характеру клинических признаков и по результатам бактериологических исследований падеж сайгаков вызван клостридиозами. При этом этиологическую роль сыграла ассоциативная форма клостридиоза. Выделенные у сайгаков патогенные формы анаэробов по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам относятся видам *C. histolyticum* и *C. perfringens*. Следовательно, можно утверждать, что на территории Западно-Казахстанской области имеются природные очаги, обсемененные возбудителями клостридий, которые вызывали эпизоотии в 2010 и 2011 годах среди Волго-Уральской популяции сайгаков. При этом у одного животных выделяется как *C. perfringens*, так и *C. histolyticum*, что подтверждает о смешанной форме инфекции в данном регионе.

Заключение

При вспышке клостридиозов в хозяйстве невозможно выделить какой-либо отдельный вид возбудителя, являющийся этиологической причиной заболевания. Например, злокачественный отек может быть вызван ассоциацией бактерий: *C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. sordellii*. В некоторых случаях изолируют нетоксигенные или слаботоксигенные бактерии вида *C. histolyticum*, образующие протеолитические ферменты, в значительной степени осложняющие течение болезни и вызывающие гнилостный распад тканей. Заболевания, протекающие по смешанному типу, клинически проявляются тяжелее, быстрее и, как правило, заканчиваются летально [20, 21, 22].

Массовый падеж сайгаков в 2010 и 2011 годах на территории Западно-Казахстанской области произошел вследствие заражения животных почвенной инфекцией, вызванной *C. histolyticum* и *C. perfringens*. Заболевание животных протекало в смешанной форме с преобладанием одного или другого возбудителя.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Сидорчук А.А., Воронин Е.С., Глушков А.А. Общая эпизоотология. М. – 2004. – С. 173.
2. Бесследный исход сайгаков [Электронный ресурс]. – URL: https://my.mail.ru/community/blog_nafs961/436A4DC7FE79F302.html?ysclid=lyh2ht1njs139744240
3. Абсатиров Г.Г., Ищанова А.С. Ретроспективный анализ массовой гибели и пути сохранения сайгаков в Казахстане | Институт степи (orensteppe.org) [Электронный ресурс].
4. Лобзин Ю.В., Кветная А.С., Скрипченко Н.В., Железова Л.И. Современные представления об этиопатогенетических и генетических особенностях токсинов *Clostridium perfringens* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2021. – №98(1). – С. 91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37.
5. Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Косилова И.С., Храмов М.В., Шепелин А.П. Питательные среды для выявления и культивирования клостридий // Бактериология. – 2021. – Том 6, (4). – С. 62-69. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-62-69.

6. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий: ГОСТ 7702.2.6-2015. М.: Стандартинформ. – 2016.
7. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе: ГОСТ 10444.1-84. М.: Стандартинформ – 2010.
8. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора – 2008.
9. Справочник. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции / Под ред. Б.И.Антонова. М.: Агропромиздат. – 1986. – С. 48-52.
10. Kadra B, Guillou J.P., Popoff M., Bourlioux P. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR) // *FEMS Immunol Med Microbiol.* – 1999. – Vol.24 (Pt 3). – P. 259-266. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01292.x.
11. Meer R.R., Songer J.G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens* // *Am J Vet Res.* – 1997. – Vol.58 (Pt 7). – P. 702-705. [PubMed] [Google Академия].
12. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y., Park Y.H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR // *J Clin Microbiol.* – 1997. – Vol.35 (Pt 1). – P. 228–232. doi: 10.1128/jcm.35.1.228-232.1997.
13. Gkiourtzidis K., Frey J., Bourtzi-Hatzopoulou E., Iliadis N., Sarris K. PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery // *Vet Microbiol.* – 2001. – Vol.82 (Pt 1). – P. 39-43. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00327-3.
14. 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 (Pt 2). – P. 103-110.
15. Songer J.G., Meer R.R. Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals // *Anaerobe.* – 1996. – Vol.2. – P. 197-203.
16. Silva R.O.S., Uzal F.A., Oliveira Jr.C.A., Lobato F.C.F. Clostridial Diseases of Animals // John Wiley & Sons, Ltd.; Hoboken, NJ, USA. Gangrene Gas (Malignant Edema). – 2016. – P. 243 – 254. DOI:10.1002/9781118728291.ch20
17. Пименов Н.В., Колесникова Ю.Н. Этиология анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота // Труды Всероссийского совета молодых ученых и специалистов аграрных образовательных и научных учреждений. – 2015. – С. 175-178.
18. Терентьева Т.Е., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. Видовой спектр бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2016. – Т. 1. – С. 5-9.
19. Choi Y.K., Kang M.S., Yoo H.S., Lee D.Y., Lee H.C., Kim D.Y. *Clostridium perfringens* type A myonecrosis in a horse in Korea // *J. Vet. Med. Sci.* – 2003. – vol.65 (pt.11). – pp. 1245-1247. DOI: 10.1292/jvms.65.124
20. Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Глотов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота // Сибирский вестник с.-х. науки. – 2017. – Т. 47 (Ч.1). – С. 90-96.
21. Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Скляр О.Д., Абросимова Н.С. Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* – 2017. – Т.63. – С. 170-175. DOI: 10.18551/rjoas.2017-03.21

22. Колесникова Ю.Н., Пименов Н.В., Капустин А.В. Этиология анаэробных инфекций у крупного рогатого скота и сравнительная характеристика выделенных штаммов клостридий // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2016. – Т.8 (Ч.56). – С.39-48.

References

1. Sidorchuk A.A., Voronin E.S., Glushkov A.A. (2004) Obshchaya epizootologiya [General epizootology]. M., p. 173.
2. Besslednyj iskhod sajgakov [The untraceable exodus of saigas] [Elektronnyj resurs]. – URL: https://my.mail.ru/community/blog_nafs961/436A4DC7FE79F302.html?ysclid=lyh2ht1njs139744240
3. Absatirov G.G., Ishchanova A.S. Retrospektivnyj analiz massovoj gibeli i puti sohraneniya sajgakov v Kazakhstane [A retrospective analysis of the mass death and conservation of saigas in Kazakhstan] | Institut stepi (orensteppe.org) [Elektronnyj resurs].
4. Lobzin Yu.V., Kvetnaya A.S., Skripchenko N.V., Zhelezova L.I. (2021) Sovremennye predstavleniya ob etiopatogeneticheskikh i geneticheskikh osobennostyah toksinov Clostridium perfringens [Modern ideas about the etiopathogenetic and genetic features of Clostridium perfringens toxins]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii, no 98(1), pp. 91-103. DOI: 10.36233/0372-9311-37.
5. Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Kosilova I.S., Hramov M.V., Shepelin A.P. (2021) Pitatel'nye sredy dlya vyyavleniya i kul'tivirovaniya klostridij [Nutrient media for the detection and cultivation of clostridium]. Bakteriologiya, vol. 6, no 4, pp. 62-69. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-62-69
6. Myaso pticy, subprodukty i polufabrikaty iz myasa pticy. Metody vyyavleniya i opredeleniya kolichestva sul'fitoreduciruyushchih klostridij [Poultry meat, offal and semi-finished products from poultry meat. Methods for detecting and determining the amount of sulfite-reducing clostridium]: GOST 7702.2.6-2015. M.: Standartinform (2016).
7. Konservy. Prigotovlenie rastvorov reaktivov, krasok, indikatorov i pitatel'nyh sred, primenyaemyh v mikrobiologicheskom analize [Preserves. Preparation of solutions of reagents, paints, indicators and nutrient media used in microbiological analysis]: GOST 10444.1-84. M.: Standartinform (2010).
8. Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nyh sred: metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2316-08 [Methods of control of bacteriological nutrient media: methodological guidelines of the MUC 4.2.2316-08]. (2008) M.: Federal'nyj centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora.
9. Spravochnik. Laboratornye issledovaniya v veterinarii [Guide. Laboratory research in veterinary medicine]. Bakterial'nye infekcii / Pod red. B.I.Antonova. (1986). M.: Agropromizdat, pp. 48-52.
10. Kadra B, Guillou J.P., Popoff M., Bourlioux P. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic Clostridium perfringens strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR) // FEMS Immunol Med Microbiol. – 1999. – Vol.24 (Pt 3). – P. 259-266. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01292.x.
11. Meer R.R., Songer J.G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping Clostridium perfringens // Am J Vet Res. – 1997. – Vol.58 (Pt 7). – P. 702-705. [PubMed] [Google Академия].
12. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y., Park Y.H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR // J Clin Microbiol. – 1997. – Vol.35 (Pt 1). – P. 228–232. doi: 10.1128/jcm.35.1.228-232.1997.
13. Gkiourtzidis K., Frey J., Bourtzi-Hatzopoulou E., Iliadis N., Sarris K. PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in Clostridium perfringens isolated from lambs with clostridial dysentery // Vet Microbiol. – 2001. – Vol.82 (Pt 1). – P. 39-43. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00327-3.

14. 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 (Pt 2). – P. 103-110.
15. Songer J.G., Meer R.R. Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals // *Anaerobe.* – 1996. – Vol.2. – P. 197-203.
16. Silva R.O.S., Uzal F.A., Oliveira Jr.C.A., Lobato F.C.F. Clostridial Diseases of Animals // John Wiley & Sons, Ltd.; Hoboken, NJ, USA. Gangrene Gas (Malignant Edema). – 2016. – P. 243 – 254. DOI:10.1002/9781118728291.ch20
17. Pimenov N.V., Kolesnikova Yu.N. (2015) Etiologiya anaerobnoj enterotoksemii u molodnyaka krupnogo rogatogo skota [Etiology of anaerobic enterotoxemia in young cattle]. *Trudy Vserossijskogo soveta molodyh uchenyh i specialistov agrarnyh obrazovatel'nyh i nauchnyh uchrezhdenij*, pp. 175-178.
18. Terent'eva T.E., Glotov A.G., Glotova T.I., Koteneva S.V. (2016) Vidovoj spektr bakterij roda *Clostridium*, vydelennyh ot krupnogo rogatogo skota na molochnyh kompleksah [Species spectrum of bacteria of the genus *Clostridium* isolated from cattle in dairy complexes]. *Rossijskij veterinarnyj zhurnal. Sel'skohozyajstvennye zhivotnye*, vol. 1, pp. 5-9.
19. Choi Y.K., Kang M.S., Yoo H.S., Lee D.Y., Lee H.C., Kim D.Y. *Clostridium perfringens* type A myonecrosis in a horse in Korea // *J. Vet. Med. Sci.* – 2003. – vol.65 (pt.11). – pp. 1245-1247. DOI: 10.1292/jvms.65.124
20. Glotova T.I., Terent'eva T.E., Glotov A.G. (2017) Vozbuditeli i vozrastnaya vospriimchivost' krupnogo rogatogo skota [Pathogens and age-related susceptibility of cattle]. *Sibirskij vestnik s.-h. nauki*, vol. 47 (pt.1), pp. 90-96.
21. Kapustin A.V., Laishevcev A.I., Sklyarov O.D., Abrosimova N.S. (2017) Razrabotka metoda kontrolya immunogennoj aktivnosti asociirovannoj vakciny protiv klostridiozov krupnogo rogatogo skota [Development of a method for monitoring the immunogenic activity of an associated vaccine against bovine clostridiosis]. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, vol. 63, pp. 170-175. DOI: 10.18551/rjoas.2017-03.21
22. Kolesnikova Yu.N., Pimenov N.V., Kapustin A.V. (2016) Etiologiya anaerobnyh infekcij u krupnogo rogatogo skota i sravnitel'naya harakteristika vydelennyh shtammov klostridij [Etiology of anaerobic infections in cattle and comparative characteristics of isolated clostridium strains]. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, vol.8 (pt.56), pp. 39-48.

АҚБӨКЕНДЕРДЕН КЛОСТРИДИЯЛАРДЫ ОҚШАУЛАУ ЖӘНЕ АНЫҚТАУ

С.К. Копеев , Ж.К. Кыдырбаев , Р.А. Рыстаева , К.А. Шораева ,
М.Д. Алмежанова* , А.А. Керимбаев , М.Б. Орынбаев 

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
«QazBioPharm» ұлттық холдингі» АҚ,
Гвардейский қтк, Қазақстан
*m.almezhanova@biosafety.kz

Аннотация. 2010 және 2011 жылдардағы эпизоотия кезінде Батыс Қазақстан облысынан әкелінген ақбөкендердің патологиялық материалына аймақты эпизоотологиялық зерттеу және микробиологиялық зерттеу нәтижелері бойынша ақбөкендердің жаппай қырылуының себебі анықталды. Құлаған ақбөкеннің ішкі мүшелерінен алынған саусақ ізінен алынған жағындыларда негізінен субтерминалды орналасқан споралары бар грам-оң бактериялары табылды. Бактериологиялық қоректік орталарда интенсивті лайлану (ЕПС), біркелкі лайлану (Китта-Тароцци) мол газ түзілуімен, ұсақ, дөңгелек, тегіс, түссіз колониялар

(қанды агар) түріндегі бактерия колонияларының өсуі байқалады. Китта-Тароцци ортасындағы колонияларды микроскопиялағанда грам-оң, жуан, қысқа бактериялар анықталды. Бактериялық культураны жұқтырған ақ тышқандар 16-18 сағаттан кейін толыққандық пен ісіну белгілерімен өлді. Өлген тышқандардың ішкі мүшелерінен алынған саусақ ізінің жағындыларында ұштары дөңгелектелген грам-оң бактериялары табылды.

Зерттеулерге сүйене отырып, ақбөкеннің анаэробты кластридиоздан өлгендігі дәлелденген. Бөлінген бактериялардың (*Clostridium histolyticum* және *Clostridium perfringens*) түр сәйкестігі культуралардың биохимиялық, молекулалық және генетикалық қасиеттерін зерттеу нәтижелері бойынша анықталды.

Түйін сөздер: ақбөкен; эпизоотология; кластридия; микроскопия; анықтау; биохимиялық қасиеттері; ошақ; жұқпалы ауру; бактерия

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CLOSTRIDIUM FROM SAIGAS

S.K. Kopeyev^{id}, Zh.K. Kydyrbayev^{id}, R.A. Rystayeva^{id}, K.A. Shorayeva^{id},
M.D. Almezhanova*^{id}, A.A. Kerimbayev^{id}, M.B. Orynbayev^{id}

«Research Institute for Biological Safety Problems» LLP, JSC "National Holding
«QazBioPharm», Gvardeysky, Kazakhstan
*m.almezhanova@biosafety.kz

Annotation. Based on the results of an epizootological survey of the area and microbiological studies of pathological material from saigas brought from the West Kazakhstan region during the epizootics of 2010 and 2011, the cause of the mass death of saigas was established. Gram-positive bacteria with spores, located predominantly subterminally, were found in fingerprint smears from the internal organs of a fallen saiga. Bacteriological nutrient media show the growth of bacterial colonies in the form of intense turbidity (MPA), uniform turbidity (Kitt-Tarozzi) with abundant gas formation, colonies of small, round, smooth, colorless (blood agar). Microscopic examination of colonies on Kitt-Tarozzi medium revealed gram-positive, thick, short bacteria. White mice infected with the bacterial culture died after 16-18 hours with signs of plethora and edema. Gram-positive bacteria with rounded ends were found in fingerprint smears from the internal organs of dead mice.

Based on the research, it is argued that the saiga died from anaerobic clostridiosis. The species identity of the isolated bacteria (*Clostridium histolyticum* and *Clostridium perfringens*) was determined based on the results of studying the biochemical, molecular and genetic properties of the cultures.

Key words: saiga; epizootology; clostridium; microscopy; identification; biochemical properties; outbreak; infectious disease; bacterium.