



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-280-289>
УДК 619:616-076:577.2:615.331.015.8:579.852.13



Разработка ПЦР-тест-систем для оценки распространённости генов антибиотикорезистентности у клостридий

Н. А. Безбородова¹, Т. И. Глотова², О. В. Соколова¹, И. А. Шкуратова¹, В. Д. Зубарева¹, Н. А. Мартынов¹, Е. В. Романов¹, А. Г. Готов²

¹ ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Россия

² ФГБНУ «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук», Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ИЭВСИДВ СФНЦА РАН), р. п. Краснообск, 630501, Новосибирская область, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Актуальность данной работы обусловлена ростом антибиотикорезистентности у патогенных клостридий в агропромышленном комплексе Уральского федерального округа, что приводит к снижению эффективности терапии, увеличению экономических потерь от инфекционных заболеваний и создает угрозу межвидового переноса генов резистентности, подчеркивая необходимость разработки современных инструментов для молекулярного мониторинга в рамках реализации национальных стратегий по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам.

Цель исследования. Разработка и апробация ПЦР-тест-систем для детекции генов антибиотикорезистентности (*tetM/B*, *ermB/Q*, *bcrA/B/D/R*) у *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile*.

Материалы и методы. Исследовали 472 пробы биологического материала (фекалии и раневое отделяемое от животных, корма, объекты окружающей среды), отобранные в 2023–2024 гг. на 32 молочно-товарных предприятиях региона. Видовую принадлежность выделенных изолятов подтверждали методом MALDI-ToF-масс-спектрометрии, а фенотипическую устойчивость к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в соответствии со стандартами EUCAST. С помощью ПЦР был сформирован банк ДНК, выделенной из поступивших проб биологического материала и изолятов клостридий, коллекционных штаммов различных видов спорообразующих анаэробов.

Результаты. В результате была создана и валидирована эффективная ПЦР-панель для детекции генов антимикробной резистентности у клостридий. Скрининг 123 проб, содержащих ДНК целевых патогенов, позволил выявить распространение генов антимикробной резистентности: доминирующим у *Clostridium difficile* являлся ген *ermB* (95,1%), у *Clostridium perfringens* – гены *ermB* (90,0%) и *ermQ* (67,1%). Ген *tetM* обнаруживали в 52,4 и 60,0% проб соответственно, гены *bcrA/B/D/R* – у 27,1–39,8% изолятов. Фенотипические исследования показали формирование у клостридий множественной лекарственной устойчивости.

Заключение. Разработанная тест-система стала надежным инструментом для молекулярного мониторинга антимикробной резистентности, полученные данные свидетельствуют о массовой циркуляции клостридий с генетическим потенциалом резистентности к клинически значимым антибиотикам.

Ключевые слова: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, антибиотикорезистентность, гены резистентности, ПЦР-диагностика, тест-системы

Благодарности: Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 23-26-00053 «Разработка тест-систем для молекулярно-генетической диагностики клостридий с идентификацией токсинотипов и генов антибиотикорезистентности» в отделе геномных исследований и селекции животных на базе Уральского научно-исследовательского ветеринарного института – структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН.

Для цитирования: Безбородова Н. А., Глотова Т. И., Соколова О. В., Шкуратова И. А., Зубарева В. Д., Мартынов Н. А., Романов Е. В., Готов А. Г. Разработка ПЦР-тест-систем для оценки распространённости генов антибиотикорезистентности у клостридий. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 280–289. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-280-289>

Конфликт интересов: Готов А. Г. является членом редколлегии журнала «Ветеринария сегодня» с 2020 г., но не имеет никакого отношения к решению опубликовать эту статью. Рукопись прошла принятию в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Для корреспонденции: Романов Егор Владимирович, младший научный сотрудник отдела ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, ул. Белинского, 112а, г. Екатеринбург, 620142, Россия, romanov.egor.2303@gmail.com

Development of PCR test systems for assessment of antibiotic resistance gene prevalence in *Clostridium* spp.

Natalia A. Bezborodova¹, Tatyana I. Glotova², Olga V. Sokolova¹, Irina A. Shkuratova¹, Vladlena D. Zubareva¹, Nikolai A. Martynov¹, Egor V. Romanov¹, Alexander G. Glotov²

¹ Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Belinskogo, 112a, Ekaterinburg 620142, Russia

² Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk 630501, Novosibirsk Oblast, Russia

ABSTRACT

Introduction. The rising prevalence of antibiotic resistance among pathogenic clostridia in the agro-industrial sector of the Ural Federal District highlights the need for this study. Emerging resistant strains compromise therapeutic outcomes, exacerbate economic losses attributable to infectious diseases, and pose a tangible threat of interspecies antimicrobial resistance gene transfer. These factors collectively necessitate the development of state-of-the-art molecular surveillance tools as a part of national antimicrobial resistance mitigation strategies.

Objective. The study was aimed at the development and testing of the PCR test systems for detection of antibiotic resistance genes (*tetM/B*, *ermB/Q*, *bcrA/B/D/R*) in *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*.

Materials and methods. During the study 472 biological samples (animal feces, wound discharge, feed, environmental objects) collected on 32 dairy holdings located in the region in 2023–2024 were tested. The recovered isolates' species identity was confirmed by MALDI-ToF mass spectrometry, and the phenotypic antibiotic resistance was determined by disc diffusion method in accordance with EUCAST standards. Bank of DNAs extracted with PCR from submitted biological samples and *Clostridium* isolates, strains of various species of spore-forming anaerobes kept at the Microorganism Strain Collection was created.

Results. Effective PCR test-kit for the detection of antibiotic resistance genes in *Clostridia* spp. was successfully developed and validated. Screening of 123 samples containing DNA of the target pathogens revealed a high prevalence of resistance genes: *ermB* gene (95.1%) was most common in *Clostridium difficile*, *ermB* (90.0%) and *ermQ* (67.1%) genes were predominant in *Clostridium perfringens*. The *tetM* gene was detected in 52.4 and 60.0% of samples, respectively, while the *bcrA/B/D/R* genes were detected in 27.1–39.8% of isolates. Phenotypic studies confirmed the emergence of multidrug resistance in *Clostridia* spp.

Conclusion. The developed test kit has proven to be a reliable and robust tool for molecular antimicrobial resistance surveillance. The data obtained indicate a widespread circulation of *Clostridium* spp. harboring genetic determinants for resistance to clinically significant antibiotics.

Keywords: *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, antibiotic resistance, resistance genes, PCR diagnosis, test-kits

Acknowledgements: The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation Project No. 23-26-00053 "Development of test systems for the molecular genetic diagnosis of *Clostridium* spp. with the identification of toxin types and antibiotic resistance genes" at the Department of Genomic Research and Animal Breeding on the premises of the Ural Veterinary Research Institute, a structural unit of the Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Bezborodova N. A., Glotova T. I., Sokolova O. V., Shkuratova I. A., Zubareva V. D., Martynov N. A., Romanov E. V., Glotov A. G. Development of PCR test systems for assessment of antibiotic resistance gene prevalence in *Clostridium* spp. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 280–289. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-280-289>

Conflict of interests: Glotov A. G. has been a member of the Editorial Board of the "Veterinary Science Today" journal since 2020, but was not involved in the decision-making process concerning the publication of this paper. The manuscript has passed the review procedure accepted in the journal. The authors did not declare any other conflicts of interests.

For correspondence: Egor V. Romanov, Junior Researcher, Department of Veterinary and Laboratory Diagnosis and Testing Laboratory, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Belinskogo, 112a, Ekaterinburg 620142, Russia, romanov.egor.2303@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные клостридии, вызывающие различные инфекционные заболевания у сельскохозяйственных животных, представляют серьезную ветеринарную и экономическую проблему для агропромышленного комплекса. Широкое распространение этих анаэробных спорообразующих микроорганизмов в окружающей среде, их способность к токсинообразованию и высокая патогенность обуславливают возникновение вспышек, ведущих к значительному падежу, особенно в условиях нарушения технологических и ветеринарно-санитарных норм [1, 2]. В структуре клостридиозов крупного рогатого скота наибольшую опасность представляют такие заболевания, как эмфизематозный карбункул (*Clostridium chauvoei*), злокачественный отек (*Cl. novyi* тип A, *Cl. septicum*, *Cl. sordellii*), а также анаэробные энтеротоксемии, вызываемые различными токсинотипами *Cl. perfringens* (A–E), столбняк (*Cl. tetani*), ботулизм (*Cl. botulinum*), некротизирующие энтериты, метриты и маститы (*Cl. perfringens* тип A) [3, 4].

В ходе многолетних исследований, охвативших 14 субъектов Российской Федерации (включая Московскую, Тюменскую, Рязанскую, Курскую, Иркутскую, Нижегородскую, Кировскую, Тверскую, Белгородскую,

Псковскую, Саратовскую, Самарскую, Челябинскую области и Республику Мордовию), установлено, что наиболее часто в биопробах выявляли *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*. Другие патогенные виды клостридий, такие как *Cl. septicum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentans* и *Cl. butyricum*, регистрировали значительно реже. Эти данные согласуются с результатами мониторинга на территории Свердловской области, где в 2020–2024 гг. частота обнаружения геномов *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* достигала 54,0–76,2% [5].

Критическим фактором, осложняющим борьбу с данными инфекциями в последние десятилетия, является рост резистентности к антимикробным препаратам у клостридий. Нерациональное применение антимикробных препаратов (АМП) в животноводстве привело к селекции резистентных штаммов бактерий, что существенно затрудняет лечение и повышает риск распространения устойчивости к антибиотикам [6]. Многочисленные зарубежные исследования выявляли у изолятов *Cl. perfringens* множественную лекарственную устойчивость к таким группам АМП, как тетрациклины, сульфаниламиды, макролиды и фторхинолоны, с обнаружением соответствующих детерминант резистентности (*tet*, *sul*, *erm* и др.) [7, 8]. Резистентность к таким препаратам, как ванкомицин

и метронидазол, отмечается также у других видов клостридий: *Cl. difficile* и *Cl. septicum* [4, 9, 10].

Несмотря на большое внимание в Российской Федерации к проблеме антибиотикорезистентности (в 2017 г. распоряжением Правительства РФ утверждена «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года»¹, а в 2024 г. – план мероприятий на 2025–2030 гг. по ее реализации²), информации о выявлении устойчивости у анаэробных возбудителей болезней сельскохозяйственных животных в доступной литературе представлено недостаточно. Причина этого – трудоемкость классических бактериологических методов исследования. В то же время современные молекулярно-генетические подходы, в частности ПЦР-детекция генов устойчивости, позволяют проводить быстрый и целенаправленный анализ. Однако коммерческие ПЦР-тест-системы для выявления таких генов у видов клостридий, имеющих значение для ветеринарии, на отечественном рынке отсутствуют.

Таким образом, существует очевидная научно-практическая потребность в разработке эффективных инструментов для мониторинга антибиотикорезистентности у возбудителей клостридиозов. Своевременная идентификация патогена и определение его профиля резистентности являются ключевыми элементами для принятия обоснованных решений по терапии, контролю вспышек и обеспечению эпизоотического благополучия в животноводческих хозяйствах.

Целью данной работы являлась разработка, оптимизация и практическая апробация тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления генов антибиотикорезистентности (*tetM*, *tetB*, *ermB*, *ermQ*, *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *bcrR*) у клостридий двух видов: *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы биоматериала. В период с 2023 по 2024 г. исследовали методом ПЦР 472 пробы биологического материала, отобранного от животных из 32 молочно-товарных предприятий Уральского федерального округа. В 123 пробах обнаружены *Cl. perfringens* ($n = 103$) и *Cl. difficile* ($n = 70$), данные изоляты были исследованы на наличие генов резистентности.

Перечень поступивших на исследование образцов: сборные пробы фекалий от телят и коров, соскобы с раневых поверхностей коров, смывы из носовых ходов, цервико-вагинальные смывы, суставная жидкость, кусочки паренхиматозных органов, мышечной ткани и плаценты, гомогенат из паренхиматозных органов абортрованного плода, смывы с объектов окружающей среды и оборудования, подстилка, образцы с кормового стола коров, пробы корма и кормового сырья (сенаж, монокорм, кормосмесь, зерно кукурузы, пшеницы и ячменя, силос кукурузный, белковая добавка, клевер, люцерна), пробы почвы.

Работы с применением MALDI-ToF-масс-спектрометрии были выполнены в лаборатории ООО «Кволити Мед» (г. Екатеринбург). Всего этим методом исследовали 87 проб (фекалии от телят и коров,

соскобы раневого отделяемого, пробы кормов и кормового сырья, пробы почвы).

Отбор проб биоматериала проводили с использованием стандартных транспортных систем: для фекалий от животных применяли пробирки с транспортной средой CARY BLAIR (fecalSwab, COPAN, Италия), а для раневого отделяемого – пробирки с транспортной средой AMIES (ESwab, COPAN, Италия). Получали средние пробы кормов, кормового сырья и почвы и помещали их в стерильные полиэтиленовые пакеты для транспортировки и бактериологических исследований.

Штаммы бактерий. Коллекционные штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 8739 (Microbiologics, США), *Clostridium perfringens* ATCC 13124 = CCUG 1795 = NCTC 8237, *Clostridium septicum* ATCC 12464 = CCUG 4855 = NCTC 547.

Питательные среды и растворы: основа колумбийского кровяного агар (Bio-Rad Laboratories, США), дефибрированная кровь барана (АО «ЭКОлаб», Россия), магниевая среда, висмут-сульфит агар, агар Плоскирева, ГРМ-агар (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия), агар Сабуро с 2% глюкозы и хлорамфениколом (SIFIN Diagnostics, Германия), агар Мюллера – Хинтона (SIFIN Diagnostics, Германия), триптиказо-соевый бульон с 20%-м глицерином (Conda, Испания).

Коллекционные штаммы микроорганизмов: *Cl. perfringens* ATCC 13124 = CCUG 1795 = NCTC 8237, *Cl. septicum* ATCC 12464 = CCUG 4855 = NCTC 547.

Методы исследований. Бактериологические исследования проводили в соответствии с ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов»³. Ферментативную активность у полученных изолятов определяли с использованием «Набора для идентификации анаэробных бактерий АНАЭРОтест 23» (Erba Mannheim, Чехия). Видовую идентификацию проводили с помощью MALDI-ToF-масс-спектрометрии на анализаторе Vitek MS (bioMérieux, Франция) [6]. Чувствительность к антимикробным препаратам определяли стандартным диско-диффузионным методом [9].

Полученные изоляты сохраняли на криосреде для пополнения банка ДНК и дальнейшей постановки ПЦР. В работе использовали дополнительно для измерения оптической плотности по McFarland прибор DensiChek (bioMérieux, Франция), прибор для приготовления питательных сред Masterclav09 (AES Chemunex, Франция), автоматический модуль для розлива в чашки APSOne (AES Chemunex, Франция), CO₂-инкубатор лабораторный 8000WJ (Thermo Scientific, США), инкубатор лабораторный Heratherm IMH60 (Thermo Scientific, Германия), автоматический анализатор антибиотикограмм ДДМ Adagio (Bio-Rad Laboratories, Франция).

Резистентность к антибиотикам определяли двумя параллельными методами [9, 10]. Исследование проводили на агаре Мюллера – Хинтона (Bio-Rad Laboratories, Франция) с использованием стандартных дисков, импрегнированных антибиотиками (Bio-Rad Laboratories, Франция). В работе применяли диски со следующими препаратами: амоксициллин / клавулановая кислота, гентамицин, левофлоксацин,

¹ <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71677266>

² <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/409448585>

³ <https://base.garant.ru/5916932>

Таблица 1
Перечень нуклеотидных последовательностей праймеров и меченых зондов

Table 1
List of nucleotide sequences of primers and labelled probes

Ген	Олигонуклеотидные последовательности (5'–3')	Размер ампликона (п. н.)	Референтная последовательность
<i>tetM</i>	Forward: TCATACTGTACTCCGCTCCC	82	NZ_CAEUHQ010000012.1
	Reverse: TCGAAGTCCACCGAATCCT		
	Probe: [FAM]TGGAAGCTGTGTACAGATAGACCA[BHQ2]		
<i>tetB</i>	Forward: AGGTTTTGGAGCGTCAATAATG	100	NG_048319.1
	Reverse: AAGACCTTCGCTCTCCCT		
	Probe: [ROX]ATCCATTTTGGGCGACAGTAGGCTT[BHQ2]		
<i>ermB</i>	Forward: AAGGATTCTACAAGCGTACCT	80	CP118266.1 (20,833-21,570)
	Reverse: CAATGCTGAATCGAGACTTGA		
	Probe: [FAM]TTCACCGAAGACTAGGGTTGCTCTTG[BHQ1]		
<i>ermQ</i>	Forward: ATTTACTCTCTAGGTATCCC	80	NG_047835.1
	Reverse: AAATCACCAACTGATATGTGG		
	Probe: [ROX]TCTTTTGGCGAACCTTTCTCCATAACT[BHQ2]		
<i>bcrA</i>	Forward: CCACCTCCAATCAGTTTAGAAAAGT	111	LN835295.1:71678-72595
	Reverse: AAGTGTGGAGAAATCAATCGAGAA		
	Probe: [FAM]CATTATCCTTGTACGAGCAGTCCA[BHQ1]		
<i>bcrB</i>	Forward: CCACTAGTAAGCTATATCCCTCCAA	107	LN835295.1:70936-71637
	Reverse: GCTTCTTTGGATTGTATGCTAAC		
	Probe: [ROX]AAGACAGCGTCATATAGCCCAAAAC[BHQ2]		
<i>bcrD</i>	Forward: ATGCTTCGCTCATATTAAGTGTAT	95	LN835295.1:72776-73390
	Reverse: AATTGTTGAGGGTATTACTGAGTGG		
	Probe: [FAM]TCATATGCTGTGCTGCTGATAGGT[BHQ1]		
<i>bcrR</i>	Forward: GCTCCATGATTCTTTTCAAACAA	120	LN835295.1:72776-73390
	Reverse: CTTTCATTACAGACACTACCCCAA		
	Probe: [ROX]CAGTTTCGCTATCCCAAGTGCAATCA[BHQ2]		

норфлоксацин, ципрофлоксацин, цефепим, цефиксим, цефоперазон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефтриаксон и цефтиофур. Результаты антибиотикограммы (диаметры зон задержки роста) считывали автоматически с помощью анализатора Adagio (Bio-Rad Laboratories, Франция).

Сформирован банк ДНК, выделенной из поступивших проб биологического материала и изолятов клостридий (*Cl. perfringens*), коллекционных штаммов различных видов спорообразующих анаэробов: *Cl. perfringens* E № 413, *Cl. perfringens* D № 222, *Cl. perfringens* A № 307, *Cl. perfringens* № 213, *Cl. perfringens* C «Октябрь», *Cl. perfringens* C «Амо», *Cl. perfringens* B «LD4», *Cl. perfringens* E № 342, *Cl. perfringens* A (коллекция штаммов ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Россия).

При разработке и оптимизации ПЦР-тест-систем для определения генов резистентности к антибиотикам у бактерий рода *Clostridium* использованы наиболее изученные и распространенные среди животных виды клостридий – *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*.

На основании литературных данных были выбраны наиболее распространенные генетические детерминанты (*tetM/B*, *ermB/Q*, *bcrA/B/D/R*), отвечающие за резистентность к АМП у изолятов *Cl. perfringens* и *Cl. difficile* [11, 12, 13, 14, 15].

Проведен поиск референтных последовательностей генов антибиотикорезистентности с использованием баз данных National Center for Biotechnological Information (NCBI) и National Database of Antibiotic Resistant Organisms (NDARO). Подбор олигонуклеотидов производили с помощью Primer3 web [16] с учетом рекомендаций [17] (табл. 1).

Таблица 2
Синтезированные олигонуклеотидные последовательности положительных контрольных образцов

Table 2
Synthesized oligonucleotide sequences of positive controls

Ген	Олигонуклеотидные последовательности (5'–3')	Размер ампликона (п. н.)
<i>tetM</i>	TCATACTGACTCCGCTCCCTAATGGAAGCTGTGCTACAG ATAGACCAATGGAAGCCAGAAAGATTCTGGTGGAACTTCGA	82
<i>tetB</i>	AGGTTTTGGAGCGTCAATAATGCATATGCAGGAAGACTTA AATCCATTTTGGGCGACAGTAGGCTTAGAAATAGAACCAG CAGGGAGAGGCGAAGGTCTT	100
<i>ermB</i>	AAGGATTCTACAAGCGTACCTTGGATATTCACGAACTA GGGTTGCTCTGCACACTCAAGTCTCGATTAGCAATTG	80
<i>ermQ</i>	ATTACTCTCTAGGTATCCATAAATCTTTTGCAGAACCT TTTCTCCATAACTAGCCACATATCAGTTGGTGAATTT	80
<i>bcrA</i>	CCACCTCCAATCAGTTTAGAAAAGTAGCTCTAAGTTTCCT CACTATCATTATCTTGTGACGAGCAGTTCGATTCGCAAATT CTCGATTGATTTCTCCAACACTT	111
<i>bcrB</i>	CCACTAGTAAGCTATATCCCTCAATGTAAGACA GCGTCATATAGCCACAACGATAAATATACCTGC CCATGTTACAAGGTTAGCATAACAATCCAAGAAGC	107
<i>bcrD</i>	ATGCTTCGCTCATATTAAGTGTGATAAATTCGTC CACAAGAATCATATGCTCTGTGCTGCTGATAGG TAGCCACTCAGTAATACCTCAACAATT	95
<i>bcrR</i>	GCTCCATGATTCCTTTTCAAACAACACACATC AGTTTCGCTATCCCAAGTGCAATCAAACAATAA AAACAATCCAATAGATTGCAAGATATTTGGGGT AGTGTCTGTAATGAAAG	120

Таблица 3
Программа амплификации с градиентом температур на этапе отжига праймеров

Table 3
Amplification program including a temperature gradient at the annealing stage

Стадия	Температура	Время	Цикл
Предварительная денатурация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	20 сек	40×
Отжиг праймеров	64–56 °C	20 сек	
Элонгация	72 °C	20 сек*	

* считывание уровня флуоресценции на этапе элонгации по соответствующему каналу (fluorescence signals are measured at the end of each elongation stage in the relevant fluorescence channel).

Полученные в ходе подбора праймеры были проверены на способность образовывать димеры в Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

Для валидации и оптимизации метода были синтезированы положительные контрольные образцы (табл. 2).

Для отработки праймерных систем использовали экстра-микс для ПЦР HS-taq (2×) (diaGene, Россия), реакционную смесь следующего состава: 12,5 мкл экстра-микса (2×) [100 мМ Трис-НCl, pH 8,5 (при 25 °C); 100 мМ KCl; 0,4 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата; 4 мМ MgCl₂; 0,06 ед. акт./мкл HS-Taq ДНК-

полимеразы; 0,2% Tween 20; стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы], 0,3 мМ каждого праймера и 0,3 мМ гидролизного зонда, 5 мкл исследуемого образца, H₂O дистиллированная до конечного объема 25 мкл. В качестве положительных контролей применяли синтезированные нуклеотиды, идентичные целевой последовательности генов антибиотикорезистентности.

Для определения оптимальных условий реакции проводили амплификацию с градиентом температур на этапе отжига праймеров (табл. 3) на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

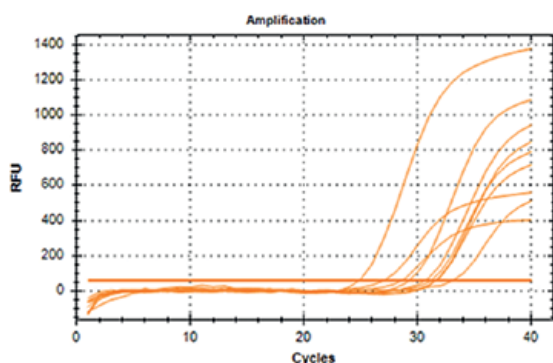


Рис. 1. График амплификации гена резистентности *tetB* у *Cl. perfringens*, *Cl. difficile* в ПЦР в реальном времени по каналу флуоресценции ROX

Fig. 1. Real-time PCR amplification curves of *tetB* resistance gene in *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* detected via the ROX fluorescence channel

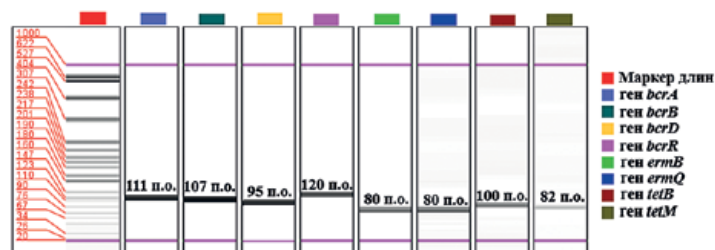


Рис. 2. Капиллярный электрофорез продуктов амплификации генов, отвечающих за резистентность к антибиотикам у *Cl. perfringens*, *Cl. difficile*

Fig. 2. Capillary electrophoresis analysis of PCR amplicons of antimicrobial resistance genes from *Cl. perfringens* and *Cl. difficile*

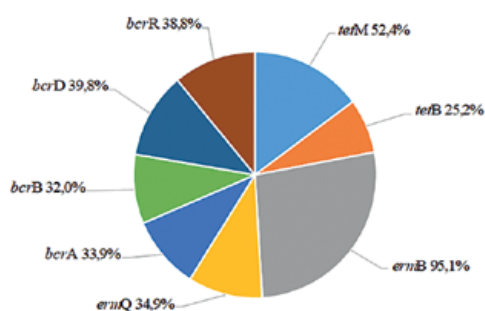


Рис. 3. Выявление генов резистентности к антибиотикам у изолятов *Cl. difficile* методом ПЦР (n = 103)

Fig. 3. Antibiotic resistance genes detected in *Cl. difficile* isolates with PCR (n = 103)

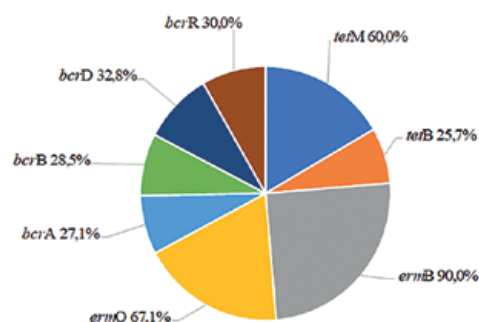


Рис. 4. Выявление генов резистентности к антибиотикам у изолятов *Cl. perfringens* методом ПЦР (n = 70)

Fig. 4. Antibiotic resistance genes detected in *Cl. perfringens* isolates with PCR (n = 70)

Специфичность праймеров дополнительно оценивали при помощи системы капиллярного электрофореза Qsep100 (BiOptic, Тайвань).

Выделение ДНК проводили с помощью набора Diatom DNA Prep 200 (ООО «ИзоГен», Россия). ПЦР-исследования для выявления ДНК клостридий в биологическом материале выполняли с использованием коммерческой тест-системы «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile*/*Cl. perfringens*», а для типирования токсигенных штаммов – коммерческого набора «РеалБест-Вет ДНК *Cl. difficile* tcdA/tcdB/CDT» (АО «Вектор-Бест», Россия). Концентрацию полученных нуклеиновых кислот определяли флуориметрическим методом на приборе Qubit 4 (Invitrogen, США) с применением набора QuDye BR для количественного определения двухцепочечной ДНК в диапазоне от 2 до 1000 нг (Lumiprobe, Россия).

Дифференциацию между генами резистентности проводили за счет использования олигонуклеотидных гидролизных зондов и считывания результатов в процессе амплификации по каналам FAM и ROX. Валидацию анализа выполняли с применением ДНК выделенных из биологических проб изолятов *Cl. perfringens*, ДНК коллекционных штаммов и ДНК *Cl. difficile*, выде-

ленной из биологических проб с использованием коммерческого набора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения исследования были отработаны и адаптированы протоколы для идентификации генов резистентности. Установили, что подобранные нами праймеры инициируют амплификацию целевых участков генов *tetM* (82 п. н.), *tetB* (100 п. н.), *ermB*, *ermQ* (80 п. н.), *bcrA* (111 п. н.), *bcrB* (107 п. н.), *bcrD* (95 п. н.), *bcrR* (120 п. н.).

Получены графики амплификации на наличие генов резистентности *tetM*, *tetB* к тетрациклину, *ermB*, *ermQ* – к макролидам и *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *bcrR* – к полипептидным антибиотикам у *Cl. perfringens* и *Cl. difficile*. Образцы считали положительными, если пороговое значение *Ct* по каналам FAM/ROX было ≤ 38 (рис. 1).

Специфичность разработанных праймеров для идентификации генов резистентности оценивали при помощи системы капиллярного электрофореза Qsep100 (рис. 2).

Результаты ПЦР по выявлению генов резистентности к антибиотикам у *Cl. difficile* и *Cl. perfringens* представлены на рисунках 3 и 4.

Из представленных данных видно, что *Cl. difficile* имеет широкий спектр генов антибиотикорезистентности. Наиболее часто, в 95,1% случаев, обнаруживался ген *ermB*, обуславливающий устойчивость к макролидам. Также к этому классу в 34,9% случаев относился ген *ermQ*. Были выявлены гены *tetM* (52,4%) и *tetB* (25,2%), отвечающие за устойчивость к тетрациклинам. Устойчивость к бацитрацину была ассоциирована с генами *bcrD* (39,8%), *bcrR* (38,8%), *bcrA* (33,9%) и *bcrB* (32,0%). Полученные данные о высокой распространенности и генетическом разнообразии механизмов устойчивости у данного патогена, в частности выявленные нами гены *ermB* и *tetM*, согласуются с результатами других исследований [12, 18, 19, 20].

Обнаружение генов *bcr* у значительной части изолятов *Cl. difficile* (32,0–39,8%) может быть обусловлено селективным давлением, создаваемым применением бацитрацина в лечебных целях при инфекционных заболеваниях у крупного рогатого скота, а также активными механизмами горизонтального переноса генетических детерминант устойчивости в популяциях патогена. Устойчивость *Cl. difficile* к бацитрацину опосредована несколькими генетическими механизмами. Прежде всего, это оперон *bcrRABD*, кодирующий ABC-транспортер и ундекапептидазу, синтез которой увеличивается при воздействии антибиотика [21]. Кроме того, важную роль играют двухкомпонентная регуляторная система *DraRS*, активирующая экспрессию локуса *hex*, необходимого для синтеза нового гликолипида и повышающего устойчивость к бацитрацину примерно в 4 раза [22], а также протеаза *PrsW*, регулирующая активность внецитоплазматических σ -факторов в ответ на воздействие бацитрацина [23]. Высокая частота детекции генов *bcr* в исследованных изолятах может быть объяснена их локализацией на мобильных генетических элементах, что обеспечивает их эффективное распространение в популяциях *Cl. difficile* посредством горизонтального переноса [21].

У изолятов *Cl. perfringens* также выявлены гены резистентности к макролидам: *ermB* был обнаружен в 90,0% случаев, а *ermQ* – в 67,1%. Наиболее распространенным геном, опосредующим устойчивость к тетрациклинам, оказался *tetM* (60,0%), тогда как *tetB* выявлялся реже – в 25,7% проб. Гены, ассоциированные с устойчивостью к бацитрацину, также присутствовали: *bcrD* (32,8%), *bcrR* (30,0%), *bcrB* (28,5%), *bcrA* (27,1%).

Проведенный скрининг на наличие генов резистентности у коллекционных штаммов показал присутствие у штаммов *Cl. perfringens* С «Амо» и *Cl. perfringens* Е № 342 гена *bcrR*, отвечающего за устойчивость к бацитрацину – полипептидному антибиотику, синтезируемому штаммами бактерии *Bacillus subtilis*. У одного изолята *Cl. perfringens* типа А, полученного из проб фекалий от телят, был обнаружен ген *ermB*, обуславливающий резистентность к эритромицину.

Изоляты *Cl. perfringens* были фенотипически устойчивы к антибиотикам группы фторхинолонов (ципрофлоксацин, марбофлоксацин, норфлоксацин, энрофлоксацин, левофлоксацин), аминогликозидов (гентамицин) и пенициллинов (амоксиклав). Генотипическая характеристика показала, что гены устойчивости к эритромицину из группы макролидов присутствовали у изолятов по отдельности или в комбинации.

Полученные данные о распространении генов антибиотикорезистентности у *Cl. perfringens* согласу-

ются с результатами других авторов. Частота детекции генов *ermB* и *tetB* у изолятов *Cl. perfringens* в наших исследованиях соответствует показателям, полученным зарубежными авторами [12, 15, 21, 22, 23, 24], а уровень выявления гена *tetB* (25–26%) близок к данным, представленным V. Adams et al. [11]. Также ранее в наших научных работах [4, 5] уже была описана устойчивость к бацитрацину, обусловленная генами *bcr*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы разработана и апробирована тест-система на основе ПЦР для выявления генов антибиотикорезистентности у клостридий. На основании анализа 472 проб биологического материала от животных с молочно-товарных предприятий Уральского федерального округа отработаны и валидированы протоколы для одновременного выявления восьми ключевых генетических детерминант (*tetM*, *tetB*, *ermB*, *ermQ*, *bcrA*, *bcrB*, *bcrD*, *bcrR*), ответственных за устойчивость к тетрациклинам, макролидам и бацитрацину.

Разработанная тест-система позволила выявить высокую распространенность этих генов у изолятов *Cl. perfringens* ($n = 103$) и *Cl. difficile* ($n = 70$). Критическими являются показатели устойчивости к макролидам; ген *ermB* у *Cl. difficile* обнаружен в 95,1% случаев, у *Cl. perfringens* – в 90,0% случаев. Значительная частота встречаемости отмечена для генов резистентности к тетрациклинам: у *Cl. difficile* (*tetM* до 52,4%) и *Cl. perfringens* (*tetM* до 60,0%); к бацитрацину: у *Cl. difficile* (*bcrD* до 39,8%) и *Cl. perfringens* (*bcrD* до 32,8%). Результаты выявления генов резистентности свидетельствуют о формировании у клостридий, циркулирующих у животных, лекарственной устойчивости к антибиотикам разных групп.

Таким образом, в ходе работы на основе ПЦР разработана тест-система для мониторинга резистентности к антибиотикам и получены данные, свидетельствующие о распространении резистентных видов клостридий в животноводческих хозяйствах региона. Разработанная тест-система может быть использована для совершенствования мер системного контроля распространения клостридиозов среди крупного рогатого скота и рационального применения антимикробных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Судоргина Т. Е., Глотова Т. И., Нефедченко А. В., Котенева С. В., Велькер Д. А., Глов А. Г. Частота выделения бактерий *Clostridium* spp. и их ассоциаций при различных формах клостридиоза крупного рогатого скота. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2024; 54 (3): 55–62. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-3-6>
2. Нефедченко А. В., Глотова Т. И., Судоргина Т. Е. Видовой состав и токсигенные свойства клостридий крупного рогатого скота в Западно-Сибирском регионе и разработка тест-системы для их выявления. *Инновационные достижения ветеринарной науки и практики: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию доктора ветеринарных наук, профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации Тарнуева Юрия Абогевича (Улан-Удэ, 14–16 июля 2024 г.)*. Улан-Удэ: Бурятская ГСХА им. В. Р. Филиппова; 2024; 145–151. <https://elibrary.ru/yvltlw>
3. Нефедченко А. В., Судоргина Т. Е., Глотова Т. И., Котенева С. В., Глов А. Г. Видовая идентификация бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота, при помощи мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2025; 17 (2): 315–333. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1178>
4. Безбородова Н. А., Соколова О. В., Кожуховская В. В., Томских О. Г., Печура Е. В., Суздальцева М. А. Патогенные виды клостридий и их устойчивость к антибиотикам, факторы вирулентности и геномные

особенности. *Инновации и продовольственная безопасность*. 2023; (3): 39–51. <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2023-41-3-39-51>

5. Безбородова Н. А., Порываева А. П., Шилова Е. Н., Кожуховская В. В., Соколова О. В., Яценюк С. П. Оценка эффективности вакцин против клостридиозов крупного рогатого скота, с учетом доминирующих анаэробных возбудителей на территории Свердловской области. *Ветеринария Кубани*. 2025; (1): 4–7. <https://elibrary.ru/jugmez>

6. Андреева С. В., Шадрова Н. Б., Скитович Г. С. Методические рекомендации по идентификации микроорганизмов с применением масс-спектрометра MALDI-ToF Autof MS 1000: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 23.06.2023 № 44-23. Владимир; 2023. 43 с.

7. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>

8. Hassani S., Pakbin B., Brück W. M., Mahmoudi R., Mousavi S. Prevalence, antibiotic resistance, toxin-typing and genotyping of *Clostridium perfringens* in raw beef meats obtained from Qazvin City, Iran. *Antibiotics*. 2022; 11 (3):340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030340>

9. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004. 91 с.

10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf

11. Adams V., Han X., Lyras D., Rood J. I. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid*. 2018; 99: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.07.002>

12. Anju K., Karthik K., Divya V., Mala Priyadharshini M. L., Sharma R. K., Manoharan S. Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry. *Anaerobe*. 2021; 67:102298. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102298>

13. Holt H. M., Danielsen T. K., Justesen U. S. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015; 34 (11): 2243–2246. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>

14. Huang H., Weintraub A., Fang H., Wu S., Zhang Y., Nord C. E. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe*. 2010; 16 (6): 633–635. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.09.002>

15. Imwattana K., Rodríguez C., Riley T. V., Knight D. R. A species-wide genetic atlas of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Microbial Genomics*. 2021; 7 (11):000696. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000696>

16. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40 (15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

17. Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J. J., Andrade M. J. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: *PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1275. Ed. by C. Basu. New York: Humana Press; 2015; Chapter 3: 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3

18. Schmidt K., Löffler B., Ackermann G. Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 59 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.009>

19. Spigaglia P., Mastrantonio P. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; 53 (11): 1129–1136. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45682-0>

20. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>

21. Kartalidis P., Skoulakis A., Tsilipounidaki K., Florou Z., Petinaki E., Fthenakis G. C. *Clostridioides difficile* as a dynamic vehicle for the dissemination of antimicrobial-resistance determinants: review and in silico analysis. *Microorganisms*. 2021; 9 (7):1383. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071383>

22. Pannullo A. G., Zbylicki B. R., Ellermeier C. D. Identification of DraRS in *Clostridioides difficile*, a two-component regulatory system that responds to lipid II-interacting antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 2023; 205 (10):e00164-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00164-23>

23. Ho T. D., Ellermeier C. D. PrsW is required for colonization, resistance to antimicrobial peptides, and expression of extracytoplasmic function

o factors in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*. 2011; 79 (8): 3229–3238. <https://doi.org/10.1128/iai.00019-11>

24. Kather E. J., Marks S. L., Foley J. E. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*. 2006; 113 (1–2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.021>

REFERENCES

1. Sudorgina T. E., Glotova T. I., Nefedchenko A. V., Koteneva S. V., Velker D. A., Glotov A. G. The frequency of bacterial isolation of *Clostridium* spp. and their associations in various forms of clostridiosis in cattle. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2024; 54 (3): 55–62. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-3-6> (in Russ.)

2. Nefedchenko A. V., Glotova T. I., Sudorgina T. E. Species composition and toxigenic properties of clostridium in cattle in the West Siberian region and development of a test system for their detection. *Innovatsionnye dostizheniya veterinarnoi nauki i praktiki: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu doktora veterinarnykh nauk, professora, zaslužennogo deyatelya nauki Rossiiskoi Federatsii Tarnueva Yuriya Abogovovicha (Ulan-Ude, 14–16 iyulya 2024 g.) = Innovations in Veterinary Science and Practice: proceedings of the International Scientific and Practical Conference devoted to the 85th anniversary of Yuriy Abogovovich Tarnuev, Professor, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Honored Scientist of the Russian Federation (Ulan-Ude, July 14–16, 2024)*. Ulan-Ude: V. R. Filippov Buryat State Agricultural Academy. 2024; 145–151. <https://elibrary.ru/yvltlw> (in Russ.)

3. Nefedchenko A. V., Sudorgina T. E., Glotova T. I., Koteneva S. V., Glotov A. G. Species identification of bacteria of the genus *Clostridium* isolated from cattle by multiplex real-time PCR. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2025; 17 (2): 315–333. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2025-17-2-1178> (in Russ.)

4. Bezborodova N. A., Sokolova O. V., Kozhukhovskaya V. V., Tomsikh O. G., Pechura E. V., Suzdal'tseva M. A. Pathogenic species of *Clostridia* and their antibiotic resistance, virulence factors, and genomic features. *Innovations and Food Safety*. 2023; (3): 39–51. <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2023-41-3-39-51> (in Russ.)

5. Bezborodova N. A., Poryvaeva A. P., Shilova E. N., Kozhukhovskaya V. V., Sokolova O. V., Yatsentyuk S. P. Evaluation of the efficiency of vaccines against bovine clostridiosis, taking into account the dominant anaerobic pathogens in Sverdlovsk region. *Veterinaria Kubani*. 2025; (1): 4–7. <https://elibrary.ru/jugmez> (in Russ.)

6. Андреева С. В., Шадрова Н. Б., Скитович Г. С. Methodical guidelines for microorganism identification with MALDI-ToF Autof MS 1000 mass spectrometer: approved by the Federal Centre for Animal Health, on 23 June 2023 No. 44-23. Vladimir; 2023. 43 p. (in Russ.)

7. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>

8. Hassani S., Pakbin B., Brück W. M., Mahmoudi R., Mousavi S. Prevalence, antibiotic resistance, toxin-typing and genotyping of *Clostridium perfringens* in raw beef meats obtained from Qazvin City, Iran. *Antibiotics*. 2022; 11 (3):340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030340>

9. MG 4.2.1890-04 Testing of microorganisms for susceptibility to antimicrobials: methodical guidelines. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance (Russian Ministry of Health); 2004. 91 p. (in Russ.)

10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf

11. Adams V., Han X., Lyras D., Rood J. I. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid*. 2018; 99: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.07.002>

12. Anju K., Karthik K., Divya V., Mala Priyadharshini M. L., Sharma R. K., Manoharan S. Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry. *Anaerobe*. 2021; 67:102298. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102298>

13. Holt H. M., Danielsen T. K., Justesen U. S. Routine disc diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* and association with PCR ribotype 027. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015; 34 (11): 2243–2246. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2475-x>

14. Huang H., Weintraub A., Fang H., Wu S., Zhang Y., Nord C. E. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe*. 2010; 16 (6): 633–635. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.09.002>

15. Imwattana K., Rodríguez C., Riley T. V., Knight D. R. A species-wide genetic atlas of antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Microbial Genomics*. 2021; 7 (11):000696. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000696>
16. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40 (15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
17. Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J. J., Andrade M. J. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: *PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology Methods in Molecular Biology*. Vol. 1275. Ed. by C. Basu. New York: Humana Press; 2015; Chapter 3: 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
18. Schmidt C., Löffler B., Ackermann G. Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 59 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.009>
19. Spigaglia P., Mastrantonio P. Comparative analysis of *Clostridium difficile* clinical isolates belonging to different genetic lineages and time periods. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; 53 (11): 1129–1136. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45682-0>
20. Bendary M. M., Abd El-Hamid M. I., El-Tarabili R. M., Hefny A. A., Algendy R. M., Elzohairy N. A., et al. *Clostridium perfringens* associated with foodborne infections of animal origins: insights into prevalence, antimicrobial resistance, toxin genes profiles, and toxinotypes. *Biology*. 2022; 11 (4):551. <https://doi.org/10.3390/biology11040551>
21. Kartalidis P., Skoulakis A., Tsilipounidaki K., Florou Z., Petinaki E., Fthenakis G. C. *Clostridioides difficile* as a dynamic vehicle for the dissemination of antimicrobial-resistance determinants: review and in silico analysis. *Microorganisms*. 2021; 9 (7):1383. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071383>
22. Pannullo A. G., Zbylicki B. R., Ellermeier C. D. Identification of DraRS in *Clostridioides difficile*, a two-component regulatory system that responds to lipid II-interacting antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 2023; 205 (10):e00164-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00164-23>
23. Ho T. D., Ellermeier C. D. PrsW is required for colonization, resistance to antimicrobial peptides, and expression of extracytoplasmic function σ factors in *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*. 2011; 79 (8): 3229–3238. <https://doi.org/10.1128/iai.00019-11>
24. Kather E. J., Marks S. L., Foley J. E. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*. 2006; 113 (1–2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.021>

Поступила в редакцию / Received 07.04.2026

Поступила после рецензирования / Revised 19.06.2026

Принята к публикации / Accepted 10.07.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Безбородова Наталья Александровна, канд. вет. наук, старший научный сотрудник отдела геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>, n-bezborodova@mail.ru

Глотова Татьяна Ивановна, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии – диагностического центра ИЭВСИДВ СФНЦА РАН, пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, t-glotova@mail.ru

Соколова Ольга Васильевна, д-р вет. наук, ведущий научный сотрудник отдела геномных исследований и селекции животных, руководитель Уральского научно-исследовательского ветеринарного института – структурного подразделения ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1169-4090>, nauka_sokolova@mail.ru

Шкуратова Ирина Алексеевна, д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела экологии и незаразной патологии животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>, shkuratova@bk.ru

Зубарева Владлена Дмитриевна, младший научный сотрудник отдела геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0284-0276>, zzub97@mail.ru

Мартынов Николай Александрович, лаборант отдела геномных исследований и селекции животных ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9251-0056>, martynov_kolya98@mail.ru

Natalia A. Bezborodova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Department of Animal Genomics and Selection, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2793-5001>, n-bezborodova@mail.ru

Tatyana I. Glotova, Dr. Sci. (Biology), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Biotechnology – Diagnostic Center, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3538-8749>, t-glotova@mail.ru

Olga V. Sokolova, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Department of Animal Genomics and Selection, Head of Ural Scientific Research Veterinary Institute, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1169-4090>, nauka_sokolova@mail.ru

Irina A. Shkuratova, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Department of Ecology and Animals' Noncontagious Pathology, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0025-3545>, shkuratova@bk.ru

Vladlena D. Zubareva, Junior Researcher, Department of Animal Genomics and Selection, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0284-0276>, zzub97@mail.ru

Nikolai A. Martynov, Laboratory Assistant, Department of Animal Genomics and Selection, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9251-0056>, martynov_kolya98@mail.ru

Романов Егор Владимирович, младший научный сотрудник отдела ветеринарно-лабораторной диагностики с испытательной лабораторией ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия; <https://orcid.org/0009-0006-4980-0481>, romanov.egor.2303@gmail.com

Egor V. Romanov, Junior Researcher, Department of Veterinary and Laboratory Diagnosis and Testing Laboratory, Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; <https://orcid.org/0009-0006-4980-0481>, romanov.egor.2303@gmail.com

Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, glotov_vet@mail.ru

Alexander G. Glotov, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Professor, Corresponding Member of the RAS, Head of the Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Oblast, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2006-0196>, glotov_vet@mail.ru

Вклад авторов: Безбородова Н. А. – администрирование, дизайн исследования, отбор проб, лабораторные исследования, подготовка и редактирование текста; Глотова Т. И. – администрирование, подготовка и редактирование текста; Соколова О. В. – дизайн исследования, подготовка и редактирование текста; Шкуратова И. А. – подготовка и редактирование текста; Зубарева В. Д. – отбор проб, лабораторные исследования, работа с литературой, редактирование текста; Мартынов Н. А. – дизайн опытов, лабораторные исследования, обработка данных; Романов Е. В. – лабораторные исследования, работа с литературой, редактирование текста; Глотов А. Г. – работа с литературой, редактирование текста.

Contribution of the authors: Bezborodova N. A. – managing, study design, sampling, laboratory tests, paper text preparation and editing; Glotova T. I. – managing, paper text preparation and editing; Sokolova O. V. – study design, paper text preparation and editing; Shkuratova I. A. – paper text preparation and editing; Zubareva V. D. – sampling, laboratory tests, literature searching and reviewing; Martynov N. A. – test design, laboratory tests, test data processing; Romanov E. V. – laboratory tests, literature searching and reviewing, paper text editing; Glotov A. G. – literature searching and reviewing, paper text editing.
