

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.151>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ НА ВЫБОРКЕ ИНДЕЕК ИЗ СОЗДАВАЕМОГО СРЕДНЕГО КРОССА

Научная статья

Шепляков А.В.¹, Терлецкий В.П.^{2*}, Тыщенко В.И.³, Овчарова Е.С.⁴, Титов Ю.В.⁵

³ORCID : 0000-0003-4964-9938;

^{1,5}Северо-кавказская зональная опытная станция по птицеводству - филиал Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства, Ставрополь, Российская Федерация

^{2,3}Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург, Российская Федерация

⁴Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства - филиал Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства, Ломоносов, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (valeriter1[at]mail.ru)

Аннотация

Создание нового среднего кросса индеек отечественной селекции должно сопровождаться надёжной схемой профилактических и противоэпизоотических мероприятий, которые основываются на применении современных молекулярно-генетических методов. Проводимые исследования были выполнены с использованием ПЦР-генотипирования бактериальных изолятов, выделенных у индеек при создании нового среднего кросса. Отбор проб производился у взрослой павшей птицы на производственной базе СПЦ «СКЗОСП» в 2023 году для выявления микроорганизмов бактериальной природы с последующим изучением спектров при RAPD-PCR-генотипировании с праймерами ERIC и M13. Анализ полученных генетических профилей показал существенное генетическое разнообразие бактериальных изолятов. Данные, полученные по двум RAPD праймерам, хорошо согласовывались друг с другом.

Ключевые слова: индейки, новый кросс, бактериальные изоляты, праймеры, метод RAPD-PCR-генотипирования.

USE OF PCR GENOTYPING ON A SAMPLE OF TURKEYS FROM THE CREATED MEDIUM CROSS

Research article

Sheplyakov A.V.¹, Terletsii V.P.^{2*}, Tyshchenko V.I.³, Ovcharova Y.S.⁴, Titov Y.V.⁵

³ORCID : 0000-0003-4964-9938;

^{1,5}North Caucasus Zonal Experimental Station for Poultry Breeding - branch of the All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Breeding, Stavropol, Russian Federation

^{2,3}All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals, Saint-Petersburg, Russian Federation

⁴All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry - branch of the All-Russian Research and Technological Institute of Poultry, Lomonosov, Russian Federation

* Corresponding author (valeriter1[at]mail.ru)

Abstract

Creation of a new medium cross of domestic breeding turkeys should be accompanied by a reliable scheme of prophylactic and anti-epizootic measures, which are based on the use of modern molecular genetic methods. The studies were carried out using PCR-genotyping of bacterial isolates extracted from turkeys during the creation of a new medium cross. Sampling was performed from adult fallen birds at the production base of SSC "SKZOSP" in 2023 to identify microorganisms of bacterial nature, with subsequent study of spectra by RAPD-PCR-genotyping with primers ERIC and M13. The analysis of the obtained genetic profiles showed a significant genetic diversity of bacterial isolates. The data obtained using the two RAPD primers were in agreement with each other.

Keywords: turkeys, new cross, bacterial isolates, primers, RAPD-PCR genotyping method.

Введение

Циркулирование возбудителей бактериальных инфекций во внешней среде приводит к периодическим вспышкам заболеваний [1], [2], [3]. Такое заболевание как колибактериоз, несёт особую угрозу, так как в промышленных условиях индейки находятся при определённой плотности посадки. Биологические особенности современных промышленных кроссов предрасполагают к острому течению многих инфекционных заболеваний, снижению рентабельности производства.

В настоящее время постоянно обнаруживаются резистентные бактерии к новейшим препаратам. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов наиболее актуальна в отрасли птицеводства, в нашем случае для индейководства. Снижение актуальности этой проблемы достигается как контролируемым применением антибиотиков, так и использованием генотипирования в профилактических целях [7], [8]. Разработка системы контроля бактериальных болезней индеек в промышленных условиях с использованием быстрой диагностической процедуры на основе RAPD-PCR и других методов генотипирования является одним из путей решения [4], [5], [6]. Тестирование микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам как традиционным методом индикаторных

дисков, так и с использованием ПЦР-генотипирования позволяет определить антибиотикорезистентность по генетической природе микроорганизмов для последующей корректировки схемы ветеринарно-санитарных мероприятий [9], [10], в том числе и в индейководстве.

Цель исследований: целью научно-исследовательской работы являлось определение антибиотикорезистентности патогенной и условно-патогенной микрофлоры, выделяемой у индеек создаваемого среднего кросса СГЦ «СКЗОСП» для составления схем ветпрофилактики и биозащиты, подбор условий для выявления методом RAPD-PCR генетических вариантов патогенных штаммов *E. coli* – актуального патогена птиц промышленных пород.

Методы и принципы исследования

Исследования были проведены на производственной базе СГЦ «СКЗОСП» – филиала ФНЦ «ВНИТИП». В соответствии с государственным заданием в СГЦ проводится работа по созданию нового среднего кросса индеек. После завершения всех регистрационных процедур кросс получит свое официальное название. Совместно с исполнителями темы от ВНИВИП – филиала ФНЦ «ВНИТИП» было проведено клиническое обследование всего поголовья индеек, проанализированы меры биобезопасности, исследована действующая схема профилактических и противоэпизоотических мероприятий, проведено вскрытие павшей индейки, отобран патологический материал для дальнейшего бактериологического и ПЦР-анализа. Бактерии выделяли также из 20 клинически здоровых индеек для молекулярно-генетического исследования. Данные работы проводились в лаборатории молекулярной генетики ВНИИГРЖ (лаборатория имеет статус «Лаборатория молекулярно-генетической экспертизы», который был выдан в соответствии с приказом № 605 МСХ РФ 29 декабря 2018 г. со сроком действия на 5 лет). Биопробы из внутренних органов индеек помещены в транспортную среду Кэри-Блэйра. После транспортировки все пробы пересеяны на питательную среду для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов: мясопептонный бульон для дальнейшего термостатирования при 37°C. Через 24 часа сделаны пересевы на дифференциально-диагностические среды – XLD-агар, агар Эндо, энтерококк агар, желточно-солевой агар, мясопептонный агар. Выделенные на дифференциально-диагностических средах культуры в дальнейшем исследованы на определение чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона. В результате бактериологического исследования проб внутренних органов и проб смывов с клоаки были выделены 22 культуры *E. coli*, которые служили объектом для ПЦР-генотипирования. Из них 20 изолятов представляли собой культуры, выращенные из мазков клоаки индеек. Помимо этих изолятов в анализ были включены также бактериальные культуры, полученные от павшей индейки под номерами 21 и 22.

Объектом исследования по генотипированию методом RAPD-PCR являлись изоляты бактерий *Escherichia coli*, выделенные из органов павшей индейки, а также из здоровых особей. Механизм детекции различий методом ПЦР заключается в разных местах связывания праймеров у разных видов и штаммов, что приводит к амплификации фрагментов ДНК разной длины.

Условия ПЦР для праймеров ERIC и M13: 95°C – 3 минуты, потом 45 циклов: 95°C – 15 секунд, 37°C – 15 секунд, 72°C – 60 секунд, в конце 72°C – 3 минуты. После завершения ПЦР образцы переносятся в лунки 1,5% агарозного геля и проводится электрофорез в течении 3-х часов при напряжении 100 вольт (примерно 5В/см). В гель предварительно вносится бромид этидия для визуализации свечения полос ДНК. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использован GeneRuler (Thermo Fischer™) и ДНК фага λ, обработанная рестриктазой *HindIII*. Визуализация результатов проводилась с помощью окраски ДНК бромидом этидия на стадии перенесения в лунки геля и геле-документации под УФ-светом в трансиллюминаторе ECX-F20.M Vilber Lourmat.

Основные результаты

В 2023 году проведено выделение на дифференциально-диагностических средах культур, которые в дальнейшем подвергались культурально-биохимическим исследованиям и определению чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона (Табл. 1).

Таблица 1 - Определение чувствительности выделенных культур микроорганизмов, к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.151.1>

Культура микроорганизмов	Место выделения	Чувствительна	Погранична	Устойчива
<i>Escherichia coli</i>	Селезенка, почка	Флорфеникол, энрофлоксацин, ципрофлоксацин, меропенем, левофлоксацин	Доксициклин, фосфомицин, пefлоксацин, амоксициллин-клавулановая кислота	Амоксициллин, Ко-тримоксазол, тетрациклин, налидиксовая кислота, азитромицин
<i>Enterococcus faecalis</i>	Почка, легкое	Ванкомицин, амоксициллин	-	Доксициклин, левофлоксацин, ципрофлоксацин, тетрациклин,
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Легкое	левофлоксацин	-	Тетрациклин, азитромицин,

				ванкомицин, доксциклин, ципрофлоксацин, амоксициллин
<i>Proteus mirabilis</i>	Печень, сердце, почка, селезенка, легкое, красный костный мозг	Флорфеникол, энрофлоксацин, амоксициллин, Ко-тримоксазол, меропенем, фосфомицин, амоксициллин+ клавулановая кислота, левофлоксацин	Ципрофлоксацин	Доксциклин, тетрациклин, налидиксовая кислота, пепфлоксацин, азитромицин

В результате бактериологического исследования проб внутренних органов и проб смывов с клоаки были выделены 22 культуры *E.coli*, которые служили объектом ПЦР-генотипирования. Из них 20 изолятов представляли собой культуры, выращенные из мазков клоаки индеек. Помимо этих изолятов в анализ были включены также бактериальные культуры, полученные от павшей индейки под номерами 21 и 22.

В результате проведения ПЦР-генотипирования с использованием праймеров ERIC получены генетические профили изучаемых бактерий (Рис. 1) с формированием трех групп. К первой группе относятся изоляты под номерами 9, 10 и 11, второй – 7 и 16, третьей – 2, 4, 5 и 17. У отдельных изолятов праймеры ERIC не привели к четкой амплификации ДНК: 1, 4, 8, 13. Изоляты 21 и 22 были выделены из почки и селезенки павшей особи, видно, что между генетическими профилями есть различия. Данное наблюдение свидетельствует о возможности циркулирования разных штаммов в одной особи (в разных органах). В связи с тем, что праймеры ERIC выявляют малое число фрагментов ДНК в геномах *E.coli*, не удивительно, что у некоторых штаммов амплификат отсутствовал. Для достижения большей дискриминационной способности необходимо проведение генотипирования с большим числом праймеров и комбинирования этих результатов.

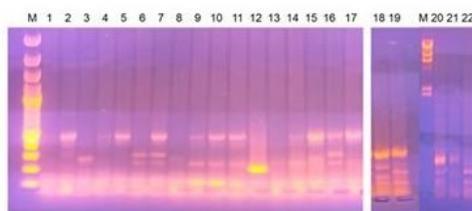


Рисунок 1 - Результаты генотипирования 22 изолятов *E.coli* методом ПЦР с парой праймеров ERIC: 1-17 – смыв из клоаки индеек (выделение изолятов 07.04.23); 18-20 – смыв из клоаки индеек (выделение изолятов 21.04.23); 21 – изолят из почки павшей индейки (выделение изолята 07.04.23); 22 – изолят из селезенки павшей индейки (выделение изолята 07.04.23)

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.151.2>

Далее было проведено генотипирование этих же изолятов с помощью универсального праймера M13. Результаты генотипирования свидетельствуют о высоком генетическом разнообразии в изучаемой группе изолятов. Бактерии выращивались из мазков клоаки, т.е. имели эндогенную природу, что, возможно, объясняет их разнообразие. Тем не менее в отдельных случаях генетические профили совпадали, что говорит о существовании идентичных штаммов в кишечнике разных особей.

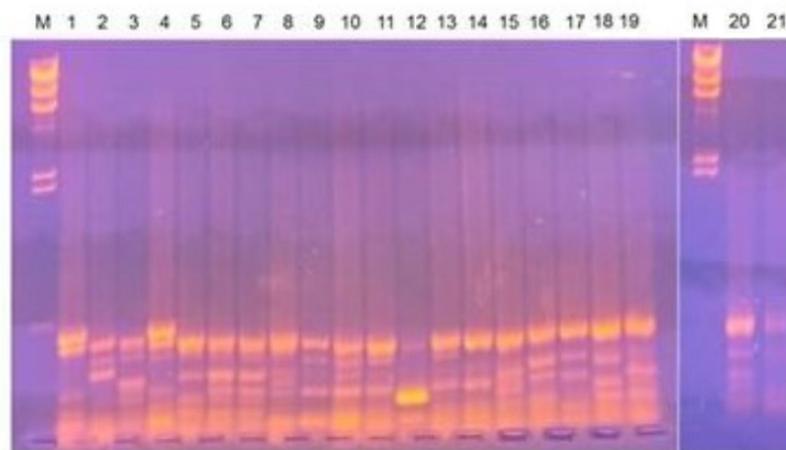


Рисунок 2 - Результат генотипирования 21 изолятов *E. coli* с универсальным праймером M13:
1-19 – смывы из клоак здоровых индеек; дорожка 20 – изолят из почки павшей индейки; дорожка 21 – изолят из селезёнки заболевшей индейки
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.137.151.3>

Анализ генетических профилей показал хорошую воспроизводимость результатов, полученных с праймерами ERIC и M13. Таким образом, в случае недостаточной дискриминации штаммов при ПЦР-генотипировании с праймерами ERIC дополнительно можно провести амплификацию с праймером M13.

Заключение

В 2023 году в СГЦ «СКЗОСП» – филиале ФНЦ «ВНИТИП» были продолжены исследования бактериальных изолятов от индеек создаваемого среднего кросса. Научная новизна работы заключается в валидации RAPD-PCR-метода генотипирования с применением праймеров ERIC и M13 на изолятах, полученных от индеек. Показано существенное генетическое разнообразие изолятов данной бактерии и хорошая воспроизводимость результатов при генотипировании с разными праймерами (ERIC и M13). Данный метод по генотипированию изолятов *E. coli* является одним из самых быстрых и не дорогих подходов к идентификации бактериальных штаммов. Результатом исследования используются при составлении схем ветеринарно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий для поголовья индеек.

Дополнительные материалы

Дополнительные материалы доступны на онлайн-странице статьи.

Финансирование

Работа поддержана бюджетным финансированием по темам госзадания 121021600202-7 и 0445-2021-0010.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Supplementary materials

Supplementary materials are available online on the article's webpage.

Funding

The work was supported by budget funding on the topics of state assignment 121021600202-7 and 0445-2021-0010.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Жебрун А.Б. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями / А.Б. Жебрун, С.Л. Мукомолов, О.В. Нарвская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2011. — № 4. — С. 28-36.
2. Бондарева О.С. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций / О.С. Бондарева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2014. — № 1. — С. 34-44.
3. Шпилева М.В. Использование методов генотипирования *Neisseria gonorrhoeae* / М.В. Шпилева, О.А. Образцова, А.В. Честков // Вестник дерматологии и венерологии. — 2015. — № 6. — С. 33-40.
4. Turki Y. Comparison of Five Molecular Subtyping Methods for Differentiation of *Salmonella* Kentucky Isolates in Tunisia / Y. Turki, I. Mehri, I. Fhoula [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2014. — Vol. 30. — № 1. — P. 87-98.
5. Walters S.P. *Salmonella* Enterica Diversity in Central Californian Coastal Waterways / S.P. Walters, N. González-Escalona, I. Son [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2013. — Vol. 79. — № 14. — P. 4199-4209.

6. Wang K. Detection and Characterization of Antibiotic-resistant Bacteria Using Surface-enhanced Raman Spectroscopy / K. Wang, S. Li, M. Petersen [et al.] // *Nanomaterials (Basel)*. — 2018. — Vol. 8. — № 10.
7. Щепеткина С.В. Современные принципы антибиотикотерапии в птицеводстве / С.В. Щепеткина, О.Б. Новикова, А.В. Забровская [и др.] — СПб: Изд-во ФГБОУ ВПО СПбГАВМ, 2015. — 160 с.
8. Давидович Н.В. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы) / Н.В. Давидович, Н.Н. Кукалевская, Е.Н. Башилова [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2020. — Т. 65. — № 6. — С. 387-393.
9. Щепеткина С.В. Биобезопасность — залог здоровья птицы / С.В. Щепеткина // *Животноводство России*. — 2015. — № 2. — С. 25.
10. Фисинин В.И. Стратегические тренды развития мирового и отечественного птицеводства. Ветеринария и биобезопасность в птицеводстве / В.И. Фисинин // *Zootecnica International*. — 2021. — Т. 15. — № 9. — С. 34.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Zhebrun A.B. Genotipirovanie i molekularnoe markirovanie bakterij i virusov v jepidemiologicheskom nadzore za aktual'nymi infekcijami [Genotyping and Molecular Labeling of Bacteria and Viruses in the Epidemiological Surveillance of Ropical Infections] / A.B. Zhebrun, S.L. Mukomolov, O.V. Narvskaja // *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. — 2011. — № 4. — P. 28-36. [in Russian]
2. Bondareva O.S. Sovremennye podhody k genotipirovaniju vozбудitelej osobo opasnyh infekcij [Modern Approaches to Genotyping of Pathogens of Especially Dangerous Infections] / O.S. Bondareva, S.S. Savchenko, G.A. Tkachenko [et al.] // *Jepidemiologija i infekcionnye bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. — 2014. — № 1. — P. 34-44. [in Russian]
3. Shpilevaja M.V. Ispol'zovanie metodov genotipirovanija Neisseria gonorrhoeae [The Use of Genotyping Methods for Neisseria Gonorrhoeae] / M.V. Shpilevaja, O.A. Obrazcova, A.V. Chestkov // *Vestnik dermatologii i venerologii [Proceedings of Dermatology and Venerology]*. — 2015. — № 6. — P. 33-40. [in Russian]
4. Turki Y. Comparison of Five Molecular Subtyping Methods for Differentiation of Salmonella Kentucky Isolates in Tunisia / Y. Turki, I. Mehri, I. Fhoula [et al.] // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2014. — Vol. 30. — № 1. — P. 87-98.
5. Walters S.P. Salmonella Enterica Diversity in Central Californian Coastal Waterways / S.P. Walters, N. González-Escalona, I. Son [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2013. — Vol. 79. — № 14. — P. 4199-4209.
6. Wang K. Detection and Characterization of Antibiotic-resistant Bacteria Using Surface-enhanced Raman Spectroscopy / K. Wang, S. Li, M. Petersen [et al.] // *Nanomaterials (Basel)*. — 2018. — Vol. 8. — № 10.
7. Shhepetkina S.V. Sovremennye principy antibiotikoterapii v pticevodstve [Modern Principles of Antibiotic Therapy in Poultry Farming] / S.V. Shhepetkina, O.B. Novikova, A.V. Zabrovskaja [et al.] — SPb: Publishing House of the FGBOU VPO SPbGAVM, 2015. — 160 p. [in Russian]
8. Davidovich N.V. Osnovnye principy jevoljucii antibiotikorezistentnosti u bakterij (obzor literatury) [Basic Principles of the Evolution of Antibiotic Resistance in Bacteria (literature review)] / N.V. Davidovich, N.N. Kukalevskaja, E.N. Bashilova [et al.] // *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika [Clinical and Laboratory Diagnostics]*. — 2020. — Vol. 65. — № 6. — P. 387-393. [in Russian]
9. Shhepetkina S.V. Biobezopasnost' — zalog zdorov'ja pticy [Biosafety is a Guarantee of Bird Health] / S.V. Shhepetkina // *Zhivotnovodstvo Rossii [Russian Animal Husbandry]* — 2015. — № 2. — P. 25. [in Russian]
10. Fisinin V.I. Strategicheskie trendy razvitija mirovogo i otechestvennogo pticevodstva. Veterinarija i biobezopasnost' v pticevodstve [Strategic Trends in the Development of Global and Domestic Poultry Farming] / V.I. Fisinin // *Zootecnica International*. — 2021. — Vol. 15. — № 9. — P. 34. [in Russian]