

На правах рукописи



003064319

СЕМЕНИХИН ВЛАДИМИР ИВАНОВИЧ

ПРОГРАММЫ И ЭКСПРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНТИЧЕСКОГО МАРКИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ИНФИКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ
В МОЛКУЛЯРНОЙ ЭПИЗООЛОГИИ

16 00 03 - ветеринарная микробиология, вирусология эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунологией
03 00 23 - биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

A handwritten signature consisting of a stylized letter 'C' followed by a curved line.

02 АВГ 2007

Новосибирск - 2007

Работа выполнена в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии

Научный консультант доктор ветеринарных наук, профессор,
академик Россельхозакадемии,
заслуженный деятель науки РФ
Донченко Александр Семенович

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор
Димов Сергея Константинович
ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Беляевская Валентина Александровна,
ФГУППЦ ВВ «Вектор»

доктор биологических наук, профессор
Обухов Игорь Леонидович,
ФГУ ВГНИИ

Ведущая организация Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарии вирусологии и микробиологии (ВИИВиМ, г. Покров)

Защита состоится «___» 200_ г. в «___» часов на заседании
диссертационного совета Д 006 045 01 в Государственном научном учреждении
Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО
Россельхозакадемии по адресу 630501, Новосибирская область Новосибирский
район, г Краснообск, СО Россельхозакадемии ГНУ ИЭВСиДВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХ СО Россельхозакадемии

Автореферат разослан «___» 200_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Г М Стеблева

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы Основными объектами и точками приложения молекулярной эпизоотологии являются индикация, дифференциация и полиморфизм патогенных микроорганизмов. В изучении их структуры мРНК и ДНК получили распространение методы генетического маркирования, основанные на полимеразной цепной реакции ДНК (Б.Льюин, 1987, Ю.П. Алтухов, 1989, Ю.П. Алтухов, Л.И. Корочкин, Ю.Г. Рычков, 1996, Забаровский Е.Р., 2001)

В последние годы список ДНК-маркеров был заметно увеличен, благодаря привлечению молекулярных маркеров, основанных на различных модификациях ПЦР (C Wong, W Wilson, A J Jeffreys, S L Thein, 1986, Ю.П. Алтухов, 1989, С.А. Булат, Н.В. Мироненко, 1989, Г.Е. Сулимова, Г.О. Шайхаев, Э.М. Берберов, А.Ю. Маркарян, Л.Г. Кандалова, 1991, Ю.П. Алтухов, 1995, J Chen, P D Hebert, 1998)

Молекулярно-генетическое маркирование заключается в выявлении специфических последовательностей ДНК, способных охарактеризовать организм с одной стороны как набор отдельных генов, отвечающих за те или иные признаки, а с другой как целостную генетическую структуру, отличающуюся от других на молекулярном уровне (Г.Е. Сулимова, Г.О. Шайхаев, Э.М. Берберов, А.Ю. Маркарян, Л.Г. Кандалова, 1991, Е.Р. Забаровский, 2001, E.R. Zabarovsky, L. Petrenko, A. Protoporopov, O. Vorontsova et al, 2003)

Существует мономорфное и полиморфное мРНК и ДНК маркирование. При мономорфном маркировании помимо обычной двух праймерной ПЦР для транс амплифицируемых участков ДНК, а также в тех случаях, когда матричная ДНК присутствует в следовых количествах, ПЦР проводят в два раунда, то есть используют систему, так называемых вложенных (nested) праймеров (I.A. Gvoisman, H. Ochman, 1993, B.F. Cheetham, M.F. Katz, 1995, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург, 1999 К.Т. Моминалиев, В.М. Говорун, 2000). Если возникает необходимость генетического маркирования по нескольким генам в одной реакционной среде, то проводится мультипраймерная ПЦР с использованием нескольких пар праймеров. Таким образом, осуществляется скрининг сразу по нескольким генам (G. Paglia, M. Morgante, 1998).

Другим вариантом ДНК-маркеров являются полиморфные маркеры, основанные на тестировании однокарбонатных замен (SNPs) с помощью ПЦР-ПДРФ анализа (Г.Е. Сулимова, Г.О. Шайхаев, Э.М. Берберов и др., 1991, Г.Е. Сулимова, И.Г. Удина, Г.О. Шайхаев, И.А. Захаров, 1995, И.Г. Удина, Е.Е. Карамышева, С.О. Туркова и др., 2003).

Особый класс полиморфных ДНК-маркеров основан на использовании праймеров, имеющих множественную локализацию в геноме. Это может быть достигнуто при использовании одного короткого праймера с произвольной последовательностью, так называемый RAPD-анализ (M.P. Snyder, D. Kimbrell, M. Hunkapiller, 1982, E. Nevo, A. Beilis, R. Ben-Shlomo, 1984, С.А. Булат, О.К. Кобаев, Н.В. Мироненко, Ф.М. Ибатулин и др., 1992, R.D. Ward, D.O.F. Skibinski, M. Woodwark, 1992, J.G.K. Williams, M.K. Hanafey, J.A. Rafalski, S.V. Tingey, 1993, И.А. Шагинян, А.Л. Гинцбург, 1995, Ю.П. Алтухов, 1995). В доступной отечественной литературе на начало наших исследований отсутствовали сообщения по мРНК и ДНК-маркированию вирусов КЧС и ВД КРС, а также

культур *Fusobacterium necrophorum* и *Mycoplasm* с целью их дифференциации по родам, что и определило цель и задачи исследований

Цель и задачи исследований является теоретическое и экспериментальное обоснование применения различных типов генетического маркирования нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных болезней животных на примере классической чумы свиней, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота, искробактериоза и микоплазмоза

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи

1 Теоретически обосновать использование различных типов генетического маркирования нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных болезней животных и области их применения

2 Разработать способы EST-РНК мономорфного маркирования мРНК вируса классической чумы свиней и вируса вирусной диареи крупного рогатого скота

3 Разработать STSs-ДНК мономорфного маркирования геномной ДНК *Fusobacterium necrophorum* на основе мобильного элемента с помощью гнездовой ПЦР, а также способ гипермутации штаммов и изолятов *Fusobacterium necrophorum* при помощи ПДРФ-ПЦР

4 Разработать способ для мономорфного STSs-ДНК генотипирования с помощью мультипраймерной ПЦР для выявления генетических признаков культур *Fusobacterium necrophorum*

5 Разработать SNPs-маркирование на основе RAPD-ПЦР с праймерами имеющими множественную локализацию в генах *Fusobacterium necrophorum* и *Mycoplasm*

6 Изучить полиморфизм мономеров культур *Fusobacterium necrophorum*

Научная новизна

- разработан способ EST-РНК мономорфного маркирования нуклеотидной последовательности в консервативной области мРНК вируса классической чумы свиней с помощью ОТ-ПЦР, позволяющий выявлять большее число вариантов вирусов циркулирующих как в Европейских, так и в Дальневосточных регионах РФ (патент №2120994 от 27 октября 1998)

- разработан способ EST-РНК мономорфного маркирования нуклеотидной последовательности в консервативной области мРНК вируса вирусной диареи крупного рогатого скота с помощью ОТ-ПЦР позволяющий дифференцированно по отношению к классической чуме свиней выявлять персистенцию этого вируса у свиней (патент №2158306 от 27 октября 2000 г)

- впервые в РФ разработан способ STSs-ДНК мономорфного маркирования нуклеотидных последовательностей *Fusobacterium necrophorum* на основе мобильного элемента с помощью гнездовой ПЦР, позволяющий выявлять патогенные подвиды *Fusobacterium necrophorum* (патент №2203951 от 10 мая 2003 г)

- впервые в РФ разработан способ мономорфного STSs- генотипирования *Fusobacterium necrophorum* с помощью мультипраймерной ПЦР, позволяющий проводить обнаружение генетических признаков характерных для патогенного подвида *Fusobacterium necrophorum subspecies necrophorum*, обладающих патогенным свойством агглютинировать эритроциты (патент №2294374 от 27 февраля 2007 г)

- впервые в РФ разработаны способы RAPD-ПЦР для полиморфного маркирования культур *Fusobacterium necrophorum* и *Mycoplasm* с помощью

праймеров №38/1 и №39, позволяющих разграничивать их по кластерам с минимальными генетическими дистанциями

- впервые в РФ изучен полиморфизм мономеров культур *Fusobacterium necrophorum*, данные которого помогут в определении изменчивости под воздействием различных факторов и закономерностей в циркуляции эпизоотических штаммов в скотах

- дана биологическая и генетическая характеристика депонированным штаммам бактерий *Fusobacterium necrophorum subspecies necrophorum* 12TSK630501 НИИ ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» В-1076 и 8TS630501 НИИ ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» В-1075 пригодных для изготовления диагностических и защитных препаратов против некробактериоза животных (Справка ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор» № 1805 от 8 сентябрь 2005 г на шт 12TSK630501 Справка ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор» № 1705 от 8 сентябрь 2005 г на шт 8TS630501)

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, так как создают перспективы применения молекулярных маркеров для мономорфного и полиморфного маркирования, основанные на различных модификациях ПЦР (ОТ-ПЦР, гнездовая ПЦР, ПДРФ-ПЦР, мультиплексной ПЦР и RAPD-ПЦР) для использования в молекулярной эпизоотологии, где главной точкой приложения является изучение изменчивости патогенных микроорганизмов. Сведения, получаемые с помощью генетического маркирования составляют научную основу молекулярной эпизоотологии. Мономорфное и полиморфное маркирование применяется не только в диагностике, но и при идентификации, генотипировании изолятов и генетическом картировании культур возбудителей болезней животных, в том числе классической чумы свиней, вируса вирусной диареи крупного рогатого скота, некробактериоза и микоплазмозов.

Получены штаммы бактерий *Fusobacterium necrophorum subspecies necrophorum* 12TSK630501 НИИ ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» В-1076 и 8TS630501 НИИ ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» В-1075. Указанные штаммы расширили арсенал штаммов бактерий *Fusobacterium necrophorum subspecies necrophorum*, которые могут быть использованы для изготовления диагностических и профилактических препаратов против некробактериоза животных. На их основе можно проводить лифференцирование выделенных изолятов от других анаэробов, морфологически схожих с *Fusobacterium necrophorum*, проводить разграничение на подвиды *subspecies necrophorum* и *subspecies lunduliforme* и проводить подбор производственных культур для изготовления защитных препаратов.

Получаемые данные с помощью ДНК- маркирования на основе ПЦР с праймерами, имеющими множественную локализацию (RAPD- анализ) в геноме культур *Fusobacterium necrophorum* и *Mycoplasma* и белковому полиморфизму на основе 10% Ds-Na-ПААГ анализов возможно использовать в популяционной генетике и молекулярной эпизоотологии для оптимизации противоэпизоотических мероприятий, подбора референтных штаммов.

Материалы диссертации нашли отражение в нормативных документах инструкции «Тест-система для выявления *Fusobacterium necrophorum subspecies necrophorum* методом полимеразной цепной реакции с помощью гнездовых праймеров» и ТУ 9388-001-05095732-2006 (Свидетельство о государственной регистрации № ПВР-1-2 6/01846 от 20 февраля 2007 г Учетная серия 35-1-2 6-1495) и были использованы при составлении методических рекомендаций.

– «Взятие и доставка проб сыворотки и патологичебского материала для лабораторной диагностики вирусных болезней животных» рассмотрены и утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (1987),

– «Выделение геномной ДНК *Fusobacterium necrophorum* из биологических образцов» рассмотрены и утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (протокол №1 от 22 февраля 2002 г) и подсекции секции инфекционной патологии отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии «Проблемы инфекционной патологии животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» (протокол №3 от 22 февраля 2002 г.)

– «Выявление РНК вируса вирусной диареи крупного рогатого скота и индикация методом низерн-блот гибридизации» рассмотрены и утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и подсекции секции инфекционной патологии отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии «Проблемы инфекционной патологии животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» (2002),

– «Применение тест-системы для выявления патогенных *Fusobacterium necrophorum* методом совмещенной гнездовой полимеразной цепной реакции (two in one nested PCR)» рассмотрены и утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (2006),

– «Применение тест-системы для генотипирования культур *Fusobacterium necrophorum* методом мультиплексной одношаговой полимеразной цепной реакции (ПЦР)» рассмотрены и утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (2006),

– «Использование RAPD-ПЦР анализа для молекулярно-генетического картирования культур *Fusobacterium necrophorum»* рассмотрены и утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и подсекции «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (2006)

Апробация работы Материалы диссертационной работы доложены на заседаниях Ученого совета ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (Новосибирск 1999-2005), III Всесоюзной конференции по эпизоотологии (Новосибирск 1991) Международной научно-практической конференции (Новосибирск, 1999), Научно-практической конференции (Новосибирск, 1998, 1999), 3-ей Международной научно-практической конференции (Алматы 2000), Научно-практической конференции «Внедрение ресурсосберегающих технологий в сельскохозяйственном производстве» (Новокузнецк 2000), Научно-практической конференции «Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и других этиологий и меры борьбы с ними» (Иркутск 2001) Международной научно-практической конференции «Биологико-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людем» (Покров, 2002), На 5-ой Международной научно-практической конференции «Научное обеспечение АНК Сибири Монголии, Казахстана Беларуси и Башкортостана» (Новосибирск, 2002) I- ом Международном конгрессе «Актуальные проблемы в развитии ветеринарной науки и практики» (Алматы, 2002) Международной научно-практической конференции «Ветеринарные и медицинские аспекты зооагропонозов» (Покров 2003) Международной научно-практической конференции «Современное состояние и актуальные проблемы в развитии ветеринарной науки и практики» (Алматы, 2005), На II-ой Международной конференции молодых Ученых

«Новинные направления развития аграрной науки в работах молодых ученых (Новосибирск, 2006)

Публикации результатов исследований По теме диссертации опубликовано 44 печатных работы, в том числе 17 статей в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрзования РФ («Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук», «Молекулярная генетика, микробиология и вирусология», «Сибирский вестник сельскохозяйственных наук»), в которых полноценно отражено содержание работы, а также в Сборниках научных трудов и других научных трудах и изданиях

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 418 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов практических предложений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 43 рисунками и 20 таблицами. Список литературы включает 409 отечественных и зарубежных источников.

Основные положения, выносимые на защиту

- Теоретическое и экспериментальное обоснование ДНК-маркирования в генетических исследованиях типы маркеров, их свойства и области применения,
- Способ FST-ПЦР мономорфного маркирования экспрессирующихся посевательностей мРНК вируса классической чумы свиней с использованием ОТ-ПЦР,
- Способ для S1SS-ДНК мономорфного маркирования нуклеогидных посевательностей *Fusobacterium necrophorum* на основе мобильного элемента (транспозона) с использованием гнездовой и мультициклической ПЦР,
- Способ SNPs-маркирования на основе RAPD-ПЦР с праймерами, имеющих множественную токализацию в геномах *Fusobacterium necrophorum* и *Mycoplasma*.

Теоретический анализ, обобщение результатов, экспериментальные исследования выполнены автором самостоятельно.

Автор выражает глубокую благодарность за участие в выполнении некоторых фрагментов диссертации А.А. Самоловову, С.Ф. Орешковой, Д.А. Хузину, М.А. Фининенко, Е.Хранову, А.В. Мокеевой, а также сотрудникам лаборатории С.А.Юрик и Н.В. Некрасовой.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в 1991-2006 гг. в лаборатории генной инженерии ГНУ ИЭВСиДВ.

Культивирование клеток РК-15, заражение их вакцининым штаммом вируса классической чумы свиней (КЧС) ЛК-ВНИИВиМ осуществляли согласно «Методическим указаниям по иммунофлуоресцентной диагностике классической чумы свиней» (Москва, 1984) и «Методическим указаниям по лабораторной диагностике классической чумы свиней» (Москва, 1996). Также использовали перевиваемую культуру клеток MDBK. Культивирование клеток, заражение их вакциниальными штаммами вируса вирусной лихорадки ВК-1 – ВИЭВ и Орегон С-24 V осуществляли согласно рекомендациям по серодиагностике вирусных инфекций (Сюрин В.Н., Беюсовова Р.В., Фомина Н.В., 1991).

В начале исследований культуры *F. necrophorum*, выделенные сотрудниками лаборатории по изучению некробактериоза животных Самолововым А.А., Лопатиным С.В. и переданные в лабораторию генной инженерии ГНУ ИЭВСиДВ. Культуры были получены от больных животных на территории Западной Сибири.

№1 - Кемеровская область - К (Кемерово), №3 - ГНУ ИЭВСиДВ - М2, №4 - Новосибирская область, Коченевского района - Кр, №5 и №6 - НСО, Новосибирского района - 5Р и 6Р (Раздельное), №7 - Алтайский край - Атт № 8 - Томская область - 42ТС (свинокомплекс), а также изолят «Чик-1020» от ботыон коровы Коченевского района НСО. В качестве референтных использовали культуру №2 из ВИЭВ - 2В любезно предоставленную Караваевым и культуру № 3430 ВГНИИ. В дальнейшем исследовали 40 культур *E. necrophorum* любезно представленные нам сотрудниками сектора контроля и стандартизации биопрепараторов Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань) Макаевым и Х.Н., Хузиным Д.А. Бактерийные культуры были выделены от животных на территории Татарстана, Башкортостана, Марий Эл, Удмуртии, Ульяновской и Самарской областей по клиническим показаниям. Для подтверждения специфичности полимеразной цепной реакции использовали референтные штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pyogenes* (grp A), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* (полевой штамм) *Bacillus subtilis* ТНП-3 *Salmonella dublin* 373 315/52 представители сотрудниками лаборатории по изучению болезней молодняка сельскохозяйственных животных ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН.

При ДНК-маркировании микоплазм использовали референтные штаммы *M. bovis genitalium*, *M. bovis suis*, *M. bovirhinis*, *M. alcalescens*, *M. mycooides*, *M. aIGINini*, полученные из лаборатории по изучению болезней молодняка сельскохозяйственных животных ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН а также культуры, выделенные от коров с патологией воспроизводительной функции в ОПХ «Элитное» № 6-01, 11-01, 12-01 выделены в 2001 г, а № 15-03, 16-03 9-03 01-03 в 2003 г. Культивирование микоплазм осуществляли в соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике, приведенные в «Справочнике по микробиологическим и вирусологическим методам исследования» под ред. М.О. Биргера (1982). Все культуры были протестированы ИИР - системой «МИК-КОМ» кат №VLT-4 ИИИИ Эпидемиологии МЗ РФ.

Выделение геномной РНК вирусов классической чумы свиней и вирусной диареи крупного рогатого скота (ВД КРС) проводили с применением 6 М гуанидиниоц无声酸盐和 дополнительной церотенинизацией смесью фенола с хлороформом и осаждением мРНК этанолом.

Выделение ДНК *E. necrophorum* из биологических образцов проводили в двух вариантах. В первом варианте при выделении суммарной ДНК использовали протеиназу К (10 мг/мл). Во втором варианте выделение суммарной ДНК проводили 10% СТАВ. Качество получаемого препарата нуклеиновых кислот проверяли путем гидролиза этионуклеазами, приобретенных в ООО «СибЭнзим», в режимах, рекомендуемых производителем.

Выделение ДНК *Mycoplasma* проводили путем лизиса ткани гуанидиниоц无声酸盐和 с последующей сорбцией ДНК на стеклянном носителе.

Для определения патогенности после ювательности и анализа праймеров при маркировании мРНК вирусов КЧС и ВД КРС был применен пакет программ Alignment Service V 4.0 OLIGO 4.0 и GENCNER, а также обработанные опубликованные нуклеотидные последовательности некоторых штаммов вирусов КЧС штамм Alfort (Meyers G, Ruemenaft T and Ghiel H-J, 1989), штамм Brescia (Moormann R J, Wartmerdam P A, van der Meer B, Schaper W M, Wensvoort G and Hulst M M, 1990), штамм "WEIBRID NCBI gi 297783"(Muyldermans G,

San Gabriel M , Caij A , De Smet A and Hamers R , 1993), изолят HChV с Тайваня (Chang Y 1993), и BVDV штамм Osloss(De Moerlooze L Lecomte C M , Brownshimer S I et al , 1993), штамм SD-1(Deng R , Brock K V , 1992) штамм NADL(Collet M S , Larson R , Gold C et al , 1988), штамм Oregon (Pellerin C , Mon S Lecomte I Tijssen P 1993)

Анализ фрагментов нуклеогидных последовательностей *Gusobacterium necrophorum* и определение последовательности праймеров для гнездовой ПЦР проводили с помощью тех же программ

Установление для мутигиплексной ПЦР последовательностей праймеров №210-220 с целью выявления фрагмента гена белка оболочки (grpB) в 906 нп, №215-216GN гена фермента ДНК-гиразы (DNA-gyrase B protein gene, гомозимера II) в 370 нп, №180-191 гена гемагглютинина (ompH) в 645 нп и №17-19 сплайса (вставки) 16S-23S линкотоксина F *necrophorum* в 228 нп проводили по алгоритму выравнивания нуклеотидных последовательностей в программах BLAST с использованием базы данных GenBank. Одновременно в реакции применяли две или три пары праймеров. Одна пара праймеров для выявления гемагглютинина была постоянна, а другие менялись.

При проведении RAPD-анализа ДНК *Gusobacterium necrophorum* «произвольные» праймеры длиной в 10 нуклеотидов выбирали, взяв за основу нуклеотидную последовательность лейкотоксина F *necrophorum* штамма A25 (AF312861).

Для RAPD-маркирования ДНК штаммов и культур микоплазм использовали «произвольные» праймеры со случайной нуклеотидной последовательностью длиной в 10 нуклеотидов сконструированные на основе ДНК генов mhp3 mhp (оперон MgPa) *Mycoplasma bovisigenitalium*.

Химический синтез всех специфических и произвольных праймеров был осуществлен амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе АСМ-102U (Biosset Ltd, Новосибирск) в отделе химии природных соединений ФГУН ГНЦ ВВ "Вектор" Россельзопогребнадзора МЗ РФ

Постановку полимеразной цепной реакции осуществляли на амплификаторах "Бис" М-105 и "Герцин" по общепринятым методикам (Р. Санки и др , 1990, В Г Дебанов 1990, А Б Вартапетян, 1991)

Анализ полученных результатов в ПЦР проводили методом электрофореза в 1.5-2 % агарозном геле при силе тока 25-40 мА в течение 30-50 мин (Т. Маниатис и др 1984). В качестве маркера использовали ДНК pUC18 гидролизованную AluI (на фрагменты 667, 521, 251, 226 и 131 нп) или маркер ООО «СибЭнзим» 100 bp , 1,5 Kb, также маркером служила ДНК pQPR гидролизованная HaeIII. Документирование полученных результатов проводили с помощью цифровой фотокамеры.

Количественную оценку различий между изолятами проводили путем парного сравнения паттернов. Расчет индексов подобия D осуществляли аналогично, используя формулу $D_{ab} = 2N_{ab}/(N_a + N_b)$, где N_a и N_b – число фрагментов ДНК в дорожках a и b соответственно, а N_{ab} – число совпадающих по электрофоретической подвижности фрагментов в дорожках a и b (V. Miteva, A. Abadjieva, R. Grigorova, 1991). Для проведения статистического анализа были составлены бинарные матрицы, которые использовали для построения дендрограмм методом кластерного анализа (STATISTICA 6). В результате получали дендрограмму генетических расстояний.

Полиморфизм отигомеров Г псеогригория Биологические пробы на белых мышах проводили согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза» (Москва 1987) В каждой из 3-х групп было по 3 животных весом 18-29гр Зарождение белых мышей осуществляли подкожной инъекцией в области корня хвоста в объеме 0,6мл 16 часовой культурой Г псеогригория в следующих вариантах 1 опыт – культуральной средой с бактериями, 2 опыт – бактериями отмытых физиологическим раствором, 3 опыт – культуральной средой без бактерии В каждом опыте животным контрольной группы 1 вводили физиологический раствор, а контрольной группы 2 – культуральную среду без выращивания в ней бактерий Наблюдение длилось 14 дней Затем животных выводили из опыта

Изучение полиморфизма белков с помощью 10% Ds-Na-ПЛАГ азотов, основанное на определении молекулярной массы мономеров, получаемых при диссоциации исходного отигомера (белка) под воздействием денатурирующего агента ДСН (долецилсульфата натрия) проводили по общепринятой методике в описании Маниагис Т, Фрич Э, Сэмбрук Д, 1984 и Glover Д (1989)

Схемы проведения экспериментов и методики исследований приведены по мере изложения материалов собственных исследований в начале соответствующих подразделов диссертации

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Теоретическое обоснование применения различных типов генетического маркирования нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных болезней животных

Молекулярная эпизоотология, предметом изучения которой являются молекулярные механизмы, составляющие основу развития эпизоотического процесса, входит в контекст общей эпизоотологии Основными объектами приложения молекулярной эпизоотологии являются индикация, дифференциация и полиморфизм патогенных организмов

Теоретической базой ДНК-маркирования является концепция комплементарности, где основным механизмом выявления полиморфности является гибридизация Это позволяет тестировать генетический полиморфизм непосредственно на уровне генов, а не на уровне продуктов генов, как в случае использования метода белкового полиморфизма Применение ДНК-маркеров решает проблему насыщения генома маркерами, и маркировать практически любые участки ДНК, в том числе не кодирующие Кроме того, эта маркерная система дает возможность использовать для анализа любые ткани и органы, независимо от стадии развития организма и имеет целый ряд преимуществ по сравнению с другими типами маркеров Для этого применяются молекулярные маркеры мономорфного и полиморфного вариантов, основанных на различных модификациях ПЦР ОТ-ПЦР, гнездовая ПЦР, ПДРФ-ПЦР, мультиплексной ПЦР и RAPD-ПЦР

За прошедшие годы было доказано, что полиморфизм в природных популяциях поддерживается известными микрэволюционными факторами – точковыми мутациями, микроделациями, миграцией, случайному генетическим дрейфом и естественным отбором, взаимодействующими в различных сочетаниях В дальнейшем спектр возможных причин был расширен, и в настоящее время основная роль отводится таким факторам, как крупные делеции и вставки,

трансверсии, транслокации, но также присутствием отдельных фрагментов ДНК, так называемым мигрирующими или подвижными элементами. Они имеют специальную структурную организацию, которые могут перемещаться в геноме (M P Snyder, D Kimbrell, M Hunkapiller, 1982, E Nevo, A Beilis, R Ben-Shlomo, 1984, R D Ward, D O F Skibinski, M Woodwark, 1992, Ю П Алтухов, 1995, Забаровский Е Р, 2001)

При анализе опубликованных нуклеотидных последовательностей микроорганизмов было установлено, что по ряду компонентов геномной ДНК разные виды и подвиды бактерий имеют совпадения, несмотря на значительные различия в основных проявлениях вирулентности. Поэтому эти компоненты не могут служить элементами маркирующих тест-систем с высокой специфичностью и не вполне пригодны для генетического маркирования внутри вида и подвида. Поэтому было обращено внимание на нуклеотидные последовательности подвижных элементов (транспозонов) и вставок (IS-элементы) между генами (E A Groisman, H Ochman, 1993, B F Cheetham, M E Katz, 1995, Ю М Романова, А Л Гинцбург, 1999)

По сравнению с фенотипическими и белковыми маркерами молекулярные ДНК-маркеры затрагивают саму основу всех процессов происходящих в живых организмах. В целом, молекулярно-генетическое маркирование заключается в выявлении специфических последовательностей ДНК, способных охарактеризовать организм с одной стороны как набор отдельных генов, отвечающих за те или иные признаки, а с другой, как целостную генетическую структуру, отличающуюся от других на молекулярном уровне. Использование подобных маркерных последовательностей имеет большие перспективы связанных с изучением генетических ресурсов организмов и их использованием.

Landegren U, Kaiser R, Caskey C, Hood L (1988), Вартапетян А Б (1991), Аксенов М Ю, Гинцбург А Л (1993), Сулимова Г Е, Удина И Г, Шайхаев Г О, Захаров И А (1995), Монахиалиев К Т, Говорун В М (2000), Орешкова С Ф (2002), Алтухов Ю А, Салменкова Е А (2002), Жимулов И Ф (2006) в своих публикациях сообщили о принципах и использовании возможных вариантов ПЦР в маркировании нуклеиновых последовательностей. Различные модификации метода ПЦР легли в основу создания разнообразных типов ДНК-маркеров, широко используемых в настоящее время в различных областях биологии и медицины. ДНК- маркеры можно разделить на две группы. Рассмотрим несколько вариантов ДНК-маркеров, основанных на полимеразной цепной реакции

Мономорфные ДНК-маркеры STSs-маркеры (Sequence Tagged Sites). Для данного типа маркеров необходима известность нужной последовательности нуклеотидов и не-встречаемость ее в других геномах. Например, транспозоны (IRAP - Inter-retransposon amplified polymorphism), IS- вставки, ДНК повторы можно рассматривать как мономорфные ДНК-маркеры. Их используют в экспериментах, когда наличие полиморфизма не требуется и часто используют при разработке диагностических тест-систем по выявлению специфического фрагмента ДНК. Варианты STSs-маркирования - это гнездовая и мультипраймерная ПЦР при маркировании ДНК *Fusobacterium necrophorum*.

EST-маркеры (Expressed Sequence Tags). Одной из разновидностей STSs-маркеров являются EST-маркеры и представляют собой маркеры к экспрессирующемся последовательностям генов. При создания EST-маркеров использовали нуклеотидные последовательности комплементарные мРНК кДНК,

получаемые с помощью обратной транскриптазы на основе изолированной из вирусов геномной РНК вирусов КЧС и ВД КРС

Полиморфные ДНК-маркеры ПДРФ-ПЦР (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ампликона) метод основанный на тестировании одноклеточных замен в синтезируемых ампликонах и применяли при идентификации культуры *F. necrophorum*

RAPD-ПЦР анализ К этому типу полиморфных маркеров принадлежат ДНК-маркеры на основе ПЦР с праймерами, имеющими множественную локализацию в геноме Использовали в популяционной генетике *Fusobacterium necrophorum* и *Mycoplasma*

Таким образом, применение в эпизоотологии молекулярного маркирования генетического материала и оценке его на новой теоретической основе составляет предмет специальной отрасли знания - молекулярная эпизоотология. Основными объектами и точками приложения молекулярной эпизоотологии являются индикация, дифференциация и изменчивость патогенных организмов. В последние годы в изучении структуры мРНК и ДНК получил распространение методы генетического маркирования, основанные на полимеразной цепной реакции ДНК. В экспериментальных исследованиях на примерах разного типа патогенных микроорганизмов была показана возможность с помощью разного типа генетического маркирования осуществлять их индикацию, идентификацию и изучать изменчивость

2.2.2 Экспериментальное обоснование принципов мономорфного и полиморфного маркирования возбудителей болезни животных

2.2.2.1 LST-маркирование экспрессирующихся последовательностей мРНК генов вирусов КЧС и ВД КРС

была выбрана область последовательностей генома вируса КЧС и вируса ВД КРС, соответствующие кодирующие белки-предшественники гликопротеина gp44/48 и g33. Затем провели выравнивание нуклеотидных последовательностей gp44/48 фрагментов из геномов различных штаммов КЧС. Несмотря на то, что при сравнении друг с другом различные штаммы вируса обнаруживают гетерогенность, были выбраны наиболее гомологичные участки генома вируса для синтеза одноклеточных праймеров (рис 1), применение которых в методе ОТ-ПЦР

11amp		5'-ataactcaatggAACCTG-3'			
AI.FORT		AGCCGAGAACATAACTCAATGGAACCTGAGTGACAAACGGC		1200	
PRES.CIA	A	T	A	T	1197
WEIBRID	A	T			1196
TAJVAN	----	A	T	T	36
12rev		3'-gcattcagtgggtccggtc-5'			
AI.FORT		TACCGATGTCA	CGTGGTCACCCAGGCCAGGAATAGGCCA	1560	
PRES.CIA	G	T	CA	T	A C
WEIBRID	G	T	CA	T	A CC
TAJVAN	CG	T	CA..	A	C
					396

Рис 1 - Фрагменты выравниенных нуклеотидных последовательностей вируса КЧС, имеющих наибольшее сходство между собой

позволило бы выявить все доступные нам изоляты вируса КЧС. Выбрав с учетом комплементарности и уровня свободной энергии праймеры №12Rev 3'-
gcatacgatggatcggtc-5' и №11Amp 5'-ataactcaatggAACCTG-3' и проводя реакции ОТ-ПЦР, мы получили специфические для мРНК вируса КЧС продукты синтеза – фрагменты кДНК в 252 нп. Затем провели тестирование вируса в пробах полученных от свиней различных свинокомплексов "Кудряшовский" Новосибирской, "Север" Тюменской областей и "Красный Октябрь" Красноярского края. Патологический материал (образцы селезенки, лимфатических узлов, почек и легких) был взят от животных, у которых наблюдалась клиническая картина заболевания классической чумой свиней. Выявление вируса вели методом ОТ-ПЦР, используя праймеры №12 и №11 в сравнении с РПИ на культуре клеток РК-15. Во всех анализируемых пробах был выявлен вирус КЧС. Результаты выделения вирусов на культуре клеток совпали с данными, полученными в ОТ-ПЦР (табл. 1).

Результаты, проведенных экспериментов показывают, что положительные анализы продуктов ПЦР получаются только тогда, когда в качестве матрицы используют кДНК классической чумы свиней. Анализы были отрицательными, когда использовали кДНК вируса вирусной диареи крупного рогатого скота.

Таблица 1 Результаты сравнительного исследования биологических образцов в РПИ на культуре клеток РК-15 и ОТ-ПЦР

Наименование хозяйства	Исследовано проб	Методы исследования	
		ОТ-ПЦР	Культ клет РК-15 в РПИ
С-3 «Север»	2	1 положительно	1 положительно
С-3 «Кр. Октябрь»	5	3 положительно	3 положительно
С-3 «Кудряшовский»	10	10 положительно	10 положительно
Вирус ВД КРС шт ВК-1 ВИЭВ	3	3 отрицательно	не исследовали
Вирус КЧС шт ЛК-ВИИИИИИМ	3	3 положительно	3 положительно
Контроль – культура РК-15	2	2 отрицательно	2 отрицательно

Далее в комиссиях опытах от свиней из Новосибирской обл., Красноярского края и Хакасской республики подозреваемых в заболевании КЧС при исследовании одного и того же биоматериала от свиней с помощью ОТ-ПЦР и культуры клеток РК-15 в РПИ на 47 биообразцах была подтверждена специфичность разработанной тест-системы GST-маркирования вируса КЧС. Было определено, что при генетическом маркировании мРНК вируса КЧС в консервативной в области, кодирующей белки-предшественники гликопroteина gp44/48 с помощью проб на 27% больше, чем при использовании культуры клеток

При маркировании мРНК вириуса ВД КРС (рис 2) праймер №1rev использовали для синтеза первой цепи кДНК, комплементарной вирусной РНК ВД КРС, в реакции обратной транскрипции а нижний праймер - №4amp1 в полимеразной реакции для синтеза второй цепи кДНК. Затем оба праймера

№4amp1	5'-ggaaagggatacaacgggc-3'					
NADL	TGGGACCGGAAGGGATACAAACGGGC	AAT	1254			
SD1	I		1254			
OREGON	A		1254			
ST890	C C A G A A T		1254			
CSLOSS	A		C	1252		
№1rev	5'-cccaagccagacaccttagat-3'					
NADL	TACCAAGGGTCGGTCTGGAATCTA	CCAAAT	2238			
SD1		T	2238			
OREGON		T	2238			
ST890	A A G C G G		2238			
CSLOSS	T A T T G		2236			

Рис 2 - Участки выравненных нуклеотидных последовательностей вириуса ВД КРС, имеющих наибольшее сходство

использовали для амплификации участка генома вириуса в полимеразной цепной реакции. Анализ считали положительным, если продукт ПЦР соответствовал ожидаемому размеру фрагмента в 997 нуклеотидных пары. Результаты, проведенных экспериментов показали, что положительные анализы продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве матрицы использовали кДНК вириусной лиарен. Анализы были отрицательными, когда использовали кДНК вириуса классической чумы свиней.

Стандартизованные маркерные системы с помощью ОТ-ПЦР обладают высокой специфичностью. Сокращают время исследования биологических образцов с 192 часов на культуру к тесту до 28-30 часов.

2.2.2.2 S1SS-маркирование нуклеотидных последовательностей *Fusobacterium necrophorum*

2.2.2.2.1 Выделение суммарной ДНК *F. necrophorum* из биообразцов с использованием протеиназы K (10 мг/мл) и 10% СТАВ

Нами разработаны це модификации по выделению геномной ДНК *Fusobacterium necrophorum*. В первой – основная цепротеиназизация ДНК *Fusobacterium necrophorum* достигается обработкой протеиназой K при +55°C в течение 18-20 часов с последующим дополнительном обработкой фенол-хлороформенной смесью и осаждением этанолом (рис 3). Во второй – основная цепротеиназизация ДНК осуществляется обработкой 10% СГВ при +80°C в течение 1,5 часов с последующим дополнительном обработкой фенол-хлороформенной смесью и осаждением этанолом. Для качественной оценки выделенной ДНК проводили рестрикцию ферментами EcoRI, Alul, HindIII, SacII, BamHI, SalI, XbaI, MspI, затем электрофорез в 1% агарозе с нанесением в "карман" 5 мкл гидролизованной ДНК. Выделение считали удовлетворительным поскольку патогенная ДНК была

видна в виде полосы, а после гидролиза эндонуклеазами EcoRI, AluI, HindIII, HaeIII - в виде нескольких фрагментов разной длины.

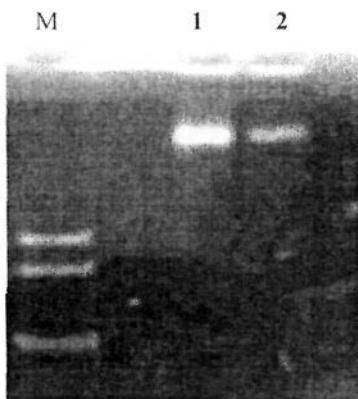


Рис. 3. - Геномная ДНК *F. necrophorum* шт. «Чик-1020», выделенная с ломошью протеиназы К (10 мг/мл): М – маркер плазмида pUC18 гидролизованная AluI; 1 - ДНК *F. necrophorum*, внесено в «карман» 5 мкл; 2 - ДНК *F. necrophorum*, внесено в «карман» 3 мкл

Проверка чистоты выделенной ДНК. Проверку качества выделения ДНК по двум вышеописанным методикам осуществляли по Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. (1984). Делали два замера плотности раствора ДНК пробы на спектрофотометре марки СФ-26 при длине волн: D260 нм и D280 нм. Если соотношение величин плотности D260/D280 равно 1,8, то это показатель свободной от белков выделенной ДНК. При использовании модифицированных нами методик получали соотношение величин плотности раствора ДНК D260/D280 равное 1,74-1,75.

2.2.2.2. Конструирование полимеразной цепной реакции для выявления *Fusobacterium necrophorum*

При разработке маркерной тест-системы столкнулись с тем, что в отечественной литературе мы не нашли описания ни одного референтного штамма разных подвидов *Fusobacterium necrophorum*, на что указывали в своих работах О.И. Соломаха, Л.В. Кирилов, Н.Н. Кружков, Е.Г. Лавченко, З.М. Межнева (2000). Поэтому экспериментальные исследования проводили, основываясь на данных по последовательности *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* шт. ATCC 25586. Нами были синтезированы несколько пар праймеров к нуклеотидным последовательностям повторов (транспозонов) в разных областях генома: TR 1001088-1002569, TR 1443345 - 1443968, TR 369003 - 370178, TR 483480 - 484138 и TR 896181 - 896900, которые прилегают к нескольким генам кодирующим гемолизин. Проведенные разведочные ПЦР показали перспективность области TR 483480 - 484138 и эти результаты согласуются с исследованиями A.L.M. Hodgson, L.A. Nicholson, T.J. Doran, L.A. Corner (1993).

С учетом опубликованных данных по секвенированию отдельных фрагментов ДНК *Fusobacterium necrophorum* были выбраны и синтезированы праймеры в области, характерной для вирулентных штаммов *Fusobacterium*, которая отсутствует в сопутствующей микрофлоре, такой как стафилококки, стрептококки, микрококки, кишечная палочка. Праймер №11 и №12 для синтеза с помощью фермента Tag-полимеразы фрагмента в 558 нп геномной ДНК в

полимеразной цепной реакции. Внутри синтезированного фрагмента был запланирован сайт рестрикции *Msp*I, по которому наработанный фрагмент после гидролиза должен образовать два меньших фрагмента в 197 и 358 н.п.

С помощью (наружных) праймеров №11 и №22 в ПЦР синтезировали фрагмент в 558 н.п. на матрице ДНК культуры *F. necrophorum* «Чик-1020». Однако при постановке ПЦР с наружными праймерами полоса синтезированного фрагмента ДНК в геле 1% агарозы была очень слабой. В то же время общее количество суммарной ДНК микроорганизмов, выделяемых из проб патологического материала было значительным. Это свидетельствовало о большой примеси ДНК сопутствующей микрофлоры и о малом содержании в образце ДНК *F. necrophorum*. Поэтому после синтеза, клонирования и секвенирования фрагмента ДНК культуры «Чик-1020» синтезировали внутренние (гнездовые) праймеры: №011 и №022. Их использовали для усиления положительного сигнала при проведении реамплификации. С помощью праймеров №011 и №022 синтезировали фрагмент внутри первого в 289 н.п.

При проведении испытаний тест-системы на специфичность выделяли ДНК из культур микроорганизмов (рис. 4 и табл. 2), наиболее часто встречающихся при

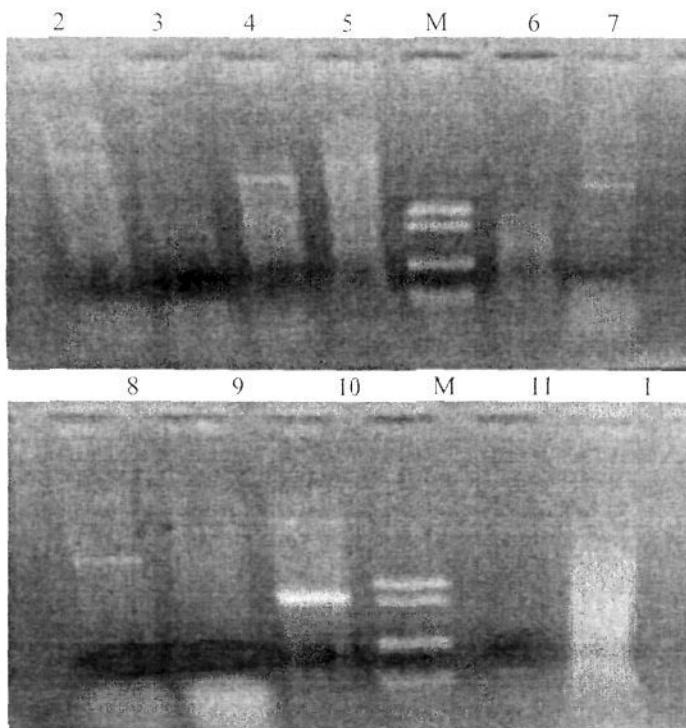


Рис. 4. - Результаты проверки на специфичность праймеров №11 и №22: 1- *E.coli*; 2- *E.coli* JM103; 3- *Str. pyogenes*; 4- *Prot. vulgaris*; 5- *Bac.subtilis*; 6- *St.aureus*; 7- *F. necroph.* M5/1; 8- *F. necroph.* M5/2; 9- *F. necroph.* M5/3; 10- *F. necroph.* «Чик»; 11- дистилл. вода. М- pUC18/*Alu*I

некробактериозных поражениях, а также имеющих схожую клиническую картину: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus album*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Proteus vulgaris*.

Таблица 2. Результаты исследований на специфичность праймеров тест-системы

№ п/п	Наименование культуры	ПЦР с праймерами	
		наружные	Внутренние
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Отрицательно	Отрицательно
2	<i>Staphylococcus albus</i>	Отрицательно	Отрицательно
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Отрицательно	Отрицательно
4	<i>Streptococcus epidermidis</i>	Отрицательно	Отрицательно
5	<i>Escherichia coli</i>	Отрицательно	Отрицательно
6	<i>Salmonella Dublin</i>	Отрицательно	Отрицательно
7	<i>Proteus vulgaris</i>	Отрицательно	Отрицательно
8	«Чик-1020» ГНУ ИЭВСиДВ	Положительно	Положительно
9	<i>F. necrophorum</i> , ВИЭВ-1	Отрицательно	Положительно
10	<i>F. necrophorum</i> , ВИЭВ-2	Отрицательно	Положительно
11	<i>F. necrophorum</i> , ГНУ ИЭВСиДВ	Отрицательно	Положительно
12	Дистиллированная вода	Отрицательно	Отрицательно

Для дополнительной проверки специфичности гнездовой ПЦР осуществили идентификацию культуры «Чик-1020» ГНУ ИЭВСиДВ, отнесенного к *F. necrophorum* с помощью ПДРФ-ПЦР анализа (рис. 5). С этой целью провели гидролиз большого фрагмента эндонуклеазой *MspI* и получили генетический профиль (паттерн), состоящий из двух фрагментов длиной в 359 н.п. и 199 н.п. После

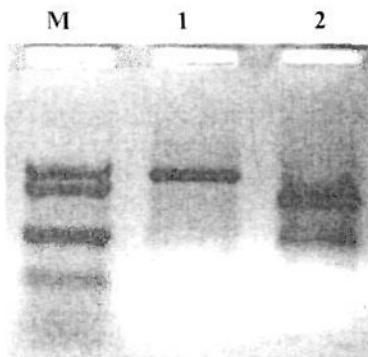


Рис.5. Гидролиз ампликона эндонуклеазой *MspI*: М - плазмида *pUC18*, гидролизованная *AluI* (маркер).
 1. Продукт амплификации изолята "Чик"
 2. Продукт гидролиза ампликона *MspI*

гидролиза внутреннего фрагмента ДНК в 289 н.п. получали генетический профиль (паттерн), состоящий из двух фрагментов длиной в 121 н.п. и 178 н.п. Размеры этих фрагментов совпадали с ожидаемыми. На основании вышеизложенного можно заключить, что фрагмент, синтезируемый на матрице ДНК культуры *F. necrophorum*

«Чик-1020» ГИУ ИЭВСиДВ по последовательности обеих пар праймеров (наружных и внутренних) и местоположению сайта рестрикции можно отнести к вирулентному подвиду Г *necrophorum* subsp *necrophorum*. Далее провели определение нуклеотидной последовательности по двум цепочкам ДНК, используя общепринятую методику Максама-Гилберта. При сравнении фрагмента ДНК из культуры «Чик-1020» ГИУ ИЭВСиДВ (AY241175 г 31087943) с последовательностью ДНК шт FnSI установили что они совпадают с последовательностью шт FnSI Г *necrophorum* subsp *necrophorum* за исключением одной делеции G в позиции 15 и двух вставок соответственно A и G в позициях 441 и 538 нп. Чувствительность разработанного способа гнездовой ПЦР для диагностики некробактериоза составила 12,0 пг/мкл суммарной ДНК.

Было обращено внимание на то, что практически в большинстве случаев фрагмент ДНК *Fusobacterium necrophorum*, где были животные с хроническим инфицированием, визуализируется только после использования двух пар праймеров наружных и внутренних. Исключение составляли случаи после острого заболевания некробактериозом (без медикаментозного вмешательства), при которых после проведения ПЦР с наружными праймерами визуализировался больший фрагмент. Однако после нескольких пассажей на печеночной среде культуры *Fusobacterium* утрачивали это качество и визуализировались только после проведения дополнительно ПЦР с внутренними праймерами. Это ориентировало на малое число копий тестируемого фрагмента в полной последовательности ДНК *Fusobacterium necrophorum*.

2.2.2.2.3 Совмещенная гнездовая полимеразная цепная реакция (two in one nested PCR) для выявления патогенных *Fusobacterium necrophorum*

По иммеразную цепную реакцию проводили в два этапа в объеме 25,0 мкл.

Первый этап - ПЦР с наружными праймерами проводили аналогично, что и при раздельном проведении гнездовой реакции при следующем режиме прогревание реакционной смеси при 95°C в течение 3 мин - 1 цикл затем денатурация при 94°C - 0 3 мин, отжиг - при 56°C - 0 4 мин и синтез - при 72°C - 0 6 мин – 30 циклов. Далее один цикл – пауза 5,0 мин при 72°.

Второй этап - во время паузы в 5 мин в каждую пробирку вносили по 3,0 мкл смеси второй пары праймеров №№ 011-022. Амплификацию продолжали при температуре отжига 60°C. С помощью наружных праймеров №11 и №22 синтезировали фрагмент в 558 нп, а с помощью внутренних праймеров №011 и №022 - фрагмент внутри первого в 289 нп.

Результаты исследований учитывали по наличию специфических фрагментов ДНК в положительном контроле размском в 558 нп или в 289 нп. Исследуемые пробы считали отрицательными, если в них не было выявлено никаких полос, или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе. Документирование полученных результатов проводили с помощью цифровой фотокамеры.

Совмещенное проведение гнездовой ПЦР по выявлению патогенных *Fusobacterium necrophorum* позволило сократить время выделения геномной ДНК при использовании 10% СТАВ с 22ч до 5ч, снизить стоимость выделения в 3 раза, сократить время проведения реакции на 2 5 часа и сэкономить реактивы на проведение 50 реакций ПЦР.

2.2.2. 2. 4. Мультиплексная полимеразная цепная реакция для генотипирования культур *Fusobacterium necrophorum*

Одним из немногих признаков, позволяющих дифференцировать подвиды *Fusobacterium necrophorum*, является способность F.n. subspecies *necrophorum* агглютинировать эритроциты птиц (T.Shinjo, K. Hiraiwa and S. Miyazato, 1990; T.Shinjo, T. Fujisawa and S. Miyazato, 1991; L.A. Nicholson, C.J. Morrow, L.A. Corner and L.M.Hodgson, 1994; Z.L. Tan, T.G. Nagaraja and M.M. Chengappa, 1994; О.И. Соломаха, Л.В. Кирилов, Н.Н. Кружков и др., 2000).

Достоверным критерием по выявлению *Fusobacterium necrophorum* и разграничению их на подвиды будет определение у них общих генов и гена гемагглютинина с помощью мультиплексной одношаговой ПЦР. В реакции в объеме 25 мкл при температуре отжига в 56°C использовали в одном варианте одновременно три пары праймеров: №210-220, №180-191 и №215-216GN (рис. 6, 7). В другом варианте в реакции участвовали две пары праймеров: №17-19 и №180-191.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

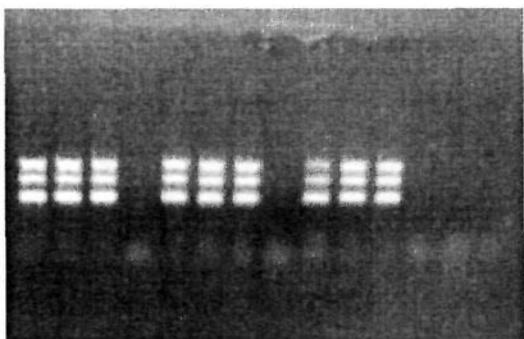


Рис.6.- Генотипирование культур *Fusobacterium necrophorum* с помощью мультиплексной ПЦР по трем генам: протеина оболочки, ДНК-гиразы, гемагглютинина: -A 1 - №1, 2 - №2, 3 - №3, 4 - №4, 5 - №5, 6 - №8, 7 - №9, 8 - К-, 9 - №12, 10- №13, 11- №15,12 - *Staf. aureus*, 13 - *Strept. albus*, .14- *E.coli* (фрагмент исследований)

36 37 38 39 40 41 42 43 44 K- M

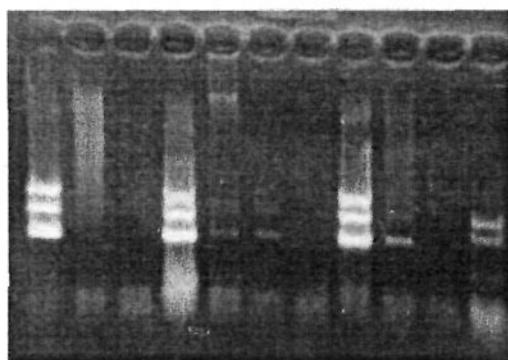


Рис.7.- Генотипирование культур *Fusobacterium* с помощью ПЦР по трем генам: протеина оболочки, гемагглютинина, ДНК-гиразы: 36 - №4Kм, 37 - №2В, 38 - М2, 39 - №7Кр, 40 - №5Р, 41 - №6Р, 42 - 10Ал, 43 - №11Чк, 44 - №12Кр, К- дистилл. вода, М - pUC18/Alu1. (фрагмент исследований)

Анализ считали положительным, если размеры ампликонов соответствовали соответственно в 906, 645, 370 и 645 228 нп. Маркером служила ДНК pQPR, гидролизованная НасIII. Далее провели генотипирование культур *Fusobacterium necrophorum* с целью их идентификации с помощью мультиплексной одношаговой ПЦР по трем генам – это гены белка оболочки (proB), фермента ДНК-гиразы (DNA gyrase B) и гемагглютинина (ompH) и одной межгенной вставки (16S-23S лейкотоксина). Для сравнения использовали ДНК, выделенные из бактерий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* и *Escherichia coli*. Результаты были положительными, если ДНК культуры относилась к виду *Fusobacterium necrophorum*, и были отрицательными, если ДНК было выделено из сопутствующей микрофлоры.

Для подтверждения специфичности тестируемых генов белка оболочки (proB), фермента ДНК-гиразы (DNA gyrase B protein), ген гемагглютинина (ompH) и спайсер 16S-23S лейкотоксина мы наработали эти фрагменты на матрице ДНК соответствующих культур № 8(8TS630501) № 12(12TSK630501) и № 27 (27TSM630501) и провели секвенирование.

Анализ нуклеотидных последовательностей синтезируемых фрагментов проводили методами выравнивания с другими опубликованными последовательностями. Установили, что рассматриваемая нуклеотидная последовательность вставки 16S-23S лейкотоксина изолята № 8(8TS630501) совпадала с нуклеотидной последовательностью культур № 12 (12TSK630501) и № 27 (27TSM630501) и штаммов Гп subsp *necrophorum* Гп 48 (AF410959) и JCM3716 (AF410965) и Гп subsp *funduliforme* Гп 513 (AF410961) и JCM3717 (AF410967).

Определено, что нуклеотидная и аминокислотная последовательности гена proB культуры № 8(8TS630501) совпадают соответственно с последовательностями культур № 12 (12TSK630501), № 27 (27TSM630501) и штаммов Гп subsp *necrophorum* ATCC 25286 (AF527637) и на 30% с Гп subsp *funduliforme* шт. АГСС 51357 в районе 3'-конца.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности исследуемого фрагмента гена ompH (ген гемагглютинина) культуры № 8(8TS630501) совпадает с последовательностью культуры № 12 (12TSK630501), № 27 (27TSM630501) и штамма Гп subsp *necrophorum* ATCC 28256.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности исследуемого фрагмента гена фермента ДНК-гиразы (DNA gyrase B protein topoisomerase II) культуры № 8(8TS630501) совпадают соответственно с последовательностями штаммов Гп subsp *necrophorum* NCTC10576 (AY372007), Гп1 (AY370663) и Гп subsp *funduliforme* Гп45 (AY370665), а также с последовательностями культур № 12 (12TSK630501) и № 27 (27TSM630501). Из полученных данных следует, что индифференцирующим признаком между Гп subsp *necrophorum* и Гп subsp *funduliforme* является ген гемагглютинина имеющийся только у Гп subsp *necrophorum*.

Таким образом, на основании анализа результатов исследований, впервые в РФ сконструирован вариант мультиплексной одношаговой потимеразной цепной реакции пригодной для генотипирования выделенных культур *Fusobacterium necrophorum*. Эта реакция обладает специфичностью, так как согласуется с гибридной ИФР и высокой чувствительностью в 10 нг/мкл.

2 2 2 2 5 Идентификация и депонирование штаммов

Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum

В процессе исследования культур *Fusobacterium necrophorum*, выделенных от больных животных в разных регионах Российской Федерации, согласно «Методическим» указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза (Утвержд ГУВ Госагропрома СССР, 1987), было отмечено следующее С увеличением числа проведенных пассажей на питательных средах количество положительно реагирующих в гнездовой и мультиплексных ПЦР уменьшалось (от 3-го к 23-му пассажу) и далее стабилизировалось Так, из 40 культур из Приволжского региона в начале исследований 4 культуры, не-~~с~~мотря на морфологическое сходство с *Fusobacterium* и патогенность для белых мышей, по результатам ПЦР были отрицательны В последующем с увеличением числа пассажей их стало больше Количество положительно реагирующих стабилизировалось на 10 культурах Аналогичную картину наблюдали и с культурами, выделенными в Западно-Сибирском регионе, где из 7 положительных культур в начале исследований, осталось стабильно положительными 2

Мы полагаем, что при проведении диагностических исследований согласно «Методическим» указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза (Утвержд ГУВ Госагропрома СССР, 1987) наряду с *Fusobacterium necrophorum* выделяются и не идентифицированные (*uncultured*) *Fusobacterium*, а также *Fusobacterium pseudonecrophorum* и другие анаэробы, морфологически схожие с *F necrophorum*, но обладающие несколько большей энергией роста Доля чистых культур при этом способе составляет около 30% (т е около одной трети от всех выделенных анаэробов) Об этом сообщали и зарубежные исследователи Tajima K , Arai S , Ogata K , Nagamine T , Matsui H , Namakura M , Aminov R I and Benno Y (2000)

По результатам генотипирования культур выбраны две, как наиболее характерные представители *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* штамма штамм № 8(8TS630501) и штамм № 12 (12TSK630501) Принадлежность, которых к подвиду *necrophorum* подтверждена установлением нуклеотидной последовательности генов транспозона, белка оболочки, топоизомеразыII (ДНК-гираза), гемагглютинина и межгенной вставки (16S-23S лейкотоксина) Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов приведены в GenBank/NCIBI locus DQ417656 [gi 89891991] (ДНК-гираза, топоизомераза II), DQ417657 [gi 89891993] (спейсер), DQ335667[gi 84872488] (белок оболочки) и DQ341278[gi 85002770] (гемагглютинин) Эти два штамма были депонированы по заявке двух институтов ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и ВНИВИ (г Казань) в НИИ «Коллекции культур микроорганизмов» ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор» *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* штамм № 8(8TS630501) №1705/В-1075 от 8 сентября 2005 г и *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* штамм № 12 (12TSK630501) №1895/ В-1076 от 8 сентября 2005 г Данные штаммы *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* могут быть использованы при разработке диагностических систем и генетическом маркировании изолятов *Fusobacterium necrophorum*

2.2 2 2 6 Изучение геномного полиморфизма культур

***Fusobacterium necrophorum* с помощью RAPD-ПЦР**

В настоящее время широкое распространение получила технология полимеразной цепной реакции (ПЦР) Для выявления генетического

по иноморфизму у разных групп организмов она широко используется с короткими в 10-15 нн праймерами со «случайной», произвольно выбранной постетовательностью – RAPD-анализ (random amplified polymorphic DNA)(СА Булаг, ОК Кобаев, ИВ Мироненко, ФМ Ибагутин, ЛА Лучкина, АВ Суслов 1992, ИА Шагинян, АЛ Гинцбург, 1995, JG K Williams M K Hanafey, JA Rafalski, S V Tingey, 1993) Метод RAPD-маркеров позволяет получать большое число маркеров, рассеянных по всему геному, поэтому такие маркеры удобны для построения генетических карт (Ю П Алтухов Е А Салменкова, 2002, ИА Шагинян, АЛ Гинцбург, 1991 СР Joshi, НТ Nguyen, 1993, JG K Williams, M K Hanafey, JA Rafalski, S V Tingey, 1993)

При анализе ДНК-паттернов, для установления уровня родства очень важен выбор олигонуклеотидных праймеров, которые давали бы наибольшую информативные картины геномного полиморфизма *F. necrophagum*. Из проанализированных 50 олигонуклеотидов были выбраны и синтезированы следующие десятинуклеотидные праймеры № 13, № 16, № 18, № 20, № 21, № 023, № 0023, № 27, № 28, № 36, № 38, № 44, № 48, № 50. После осуществления ИФР и сравнения полученных паттернов, выявили, что не все сконструированные нами праймеры были пригодны для внутривидовой дифференциации изолятов *F. necrophagum*. Малоинформативными оказались олигонуклеотиды № 16, 18, 20, 21, 0023, 28, 36, 44, 48, 50. Результаты генотипирования с оставшимися праймерами приведены в таблице 3.

Таблица 3 Значения величин индексов подобия при попарном сравнении базовых культур с изолятами *F. necrophagum* в Западной Сибири

Культуры	Кемеров обл	ВИЭВ							Алтайск краи	Томск обл
			3 М2	4 Кр	5 Р	6Р	7 А п	8 1С		
Праймер № 13										
3 М2	0,63	0,75	-	0,71	0,57	0,67	0,47		не иссл	
2 ВИЭВ-1	0,87	-	0,75	0,80	0,63	0,86	0,46		не иссл	
6 Р	0,67	0,80	0,67	0,77	0,4	-	0,38		не иссл	
Праймер № 023										
3 М2	0,40	0,55	-	0,62	0,13	0,40	0,20		не иссл	
2 ВИЭВ-1	0,14	-	0,36	0,46	0,27	0,44	0,44		не иссл	
6 Р	0,15	0,44	0,60	0,36	0,57	-	0,50		не иссл	
Праймер № 27										
3 М2	0,50	0,20	-	0,77	0,20	0,22	0,25		не иссл	
2 ВИЭВ-1	0,50	-	0,60	0,44	0,33	0,60	0,50		не иссл	
6 Р	0,29	0,40	0,44	0,25	0,8	-	0,67		не иссл	
Праймер № 38										
3 М2	0,86	0,92	-	0,77	0,40	0,92	0,92		-	
2 ВИЭВ-1	0,93	-	1,00	0,92	0,50	0,93	0,78		0,48	
6 Р	0,80	0,86	0,92	0,71	0,59	-	0,71		0,50	

Анализ величин индексов подобия при попарном сравнении изолятов относящихся к патогенному виду *Tusubacterium necrophagum*, показал,

что наиболее пригодным для генотипирования был праймер № 38. Проведенное генотипирование с помощью «произвольных» олигонуклеотидов, праймирующих геномную ДНК *F. necrophorum* выявило высокую степень гомологии всех изолятов со штаммом №2В (ВИЭВ), кроме изолята Раздольное №5 и №8 – из свинокомплекса, где индекс схожести был низким и составил 0,50. При попарном сравнении ДНК изолятов культуры №3 М2(ИЭВСиДВ) с ДНК культуры №6 также была выявлена низкая степень подобия 0,40 и 0,59 с культурой №5. Следовательно, в хозяйстве «Раздольное» НСО выявлена циркуляция двух вариантов патогенных *F. necrophorum*, которые морфологически схожи. Культура №6 более патогенен для белых мышей, чем культура №5.

Был получен спектр паттернов при проведении RAPD-ПЦР с помощью праймера №38 и проведен их анализ ДНК культур *F. necrophorum*, выделенных от животных разных регионов Западно-Сибирского округа (рис. 8). Для распределения изучаемых изолятов *F. necrophorum* по группам связанных с общностью их

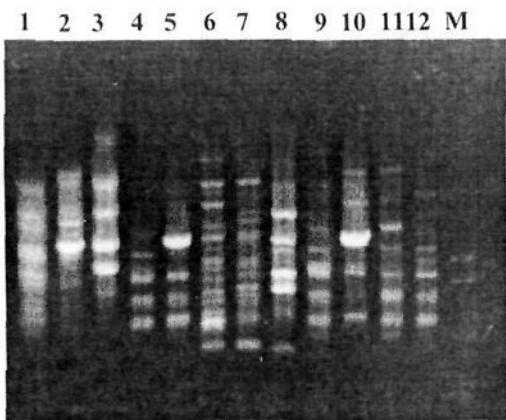


Рис.8. - RAPD-ПЦР анализ ДНК *F. necrophorum*, выделенных от животных Западно-Сибирского округа с помощью праймера №38: 1 - *Str. Epidermyt.*, 2 - *Staf. Album*, 3 - *E. coli*, 4 - №9Кр. культура 3 пассаж, 5 - №8Чик, 6 - №7Алт., 7 - №6Р., 8 - №5Р., 9 - №4Кр. культура 1 пассаж, 10 - 3 М2 (ИЭВСиДВ), 11 - 2В (ВИЭВ-1), 12 - №1Кем., М - маркер pUC18/AluI

происхождения был проведен кластерный анализ полученных паттернов. Генетические связи между культурами *Fusobacterium necrophorum*, выделенных из разных регионов Западно-Сибирского округа изображены на дендрограмме (рис.9), построенной на основании RAPD изменчивости, выявляемой с использованием праймера №38. Кластерный анализ разделил изучаемые культуры на два кластера. В один кластер, отмеченный малой стрелкой, с двумя субклUSTERами вошли четыре культуры *Fusobacterium necrophorum*: №3 М2(ИЭВСиДВ), №5Р, №6Р и №7Алт. Из них наиболее генетически схожими были №5Р и №7Алт. К ним примыкает культура №6Р. Отдельной ветвью стоит культура №3. В другом кластере, отмеченный большой стрелкой, объединены пять культур *Fusobacterium*

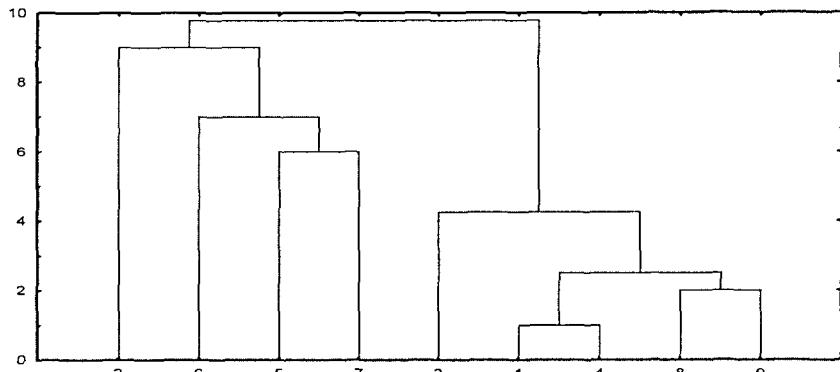


Рис. 9.- Дендрограмма распределения культур *F necrophorum*, выделенных от животных Западно-Сибирского региона по результатам кластерного анализа По вертикали показаны генетические дистанции, а по горизонтали даны номера изолятов 1 - №1Кем , 2 - 2В (ВИЭВ), 3 - М2 (ИЭВСиДВ), 4 - №4Кр культуры 1-й пассаж, 5 - №5Р , 6 - №6Р , 7 - №7 Алт, 8 - №8Чик, 9 - №4Кр культуры 3-й пассаж культуры №4К

necrophorum №1Кем , 2В (ВИЭВ), №4Кр . №8Чик, №9Кр культура 3 пассаж Наибольшее генетическое сходство проявили культуры №1Кем , №4Кр а затем культуры №8Чик и №9Кр 3 пассаж Несколько отдельной ветвью стоит культура №2В (ВИЭВ) Проведенные исследования показали возможность выявлять генетические связи между различными культурами *F necrophorum* Установлена циркуляция в одном хозяйстве двух вариантов патогенности *F necrophorum* №5Р и №6Р, которые генетически разно удаленных как по отношению к культурам №1Кем и №4Кр) так и к культурам №3 М2 (ИИУ ИЭВСиДВ) и №2В (ВИЭВ)

При тестировании культур из Приволжского региона использовали ранее апробированный «произвольный» праймер № 38 5'-дсдддсдддс-3' Результаты сравнения полученных ДНК-паттернов (табл 4) позволили разделить прогерстированные изоляты по уровню схожести к штаммам посевательности культуры № 3430 на три группы Одна из них (11 из 36) с высоким уровнем схожести от 0,73 до 0,90, другая группа (6 из 36) со средним уровнем подобия от 0,53 до 0,73 и третья группа (18 из 36) с очень низким уровнем схожести от 0,13 до 0,53 Из этих данных следует что, на территории округа циркулируют культуры *F necrophorum* с различным уровнем опасности, где низкий уровень схожести среди них занимает значительное место По результатам RAPD-ИЦР провели кластерный анализ для распределения изучаемых культур *Fusobacterium necrophorum* по группам связанных с общностью их происхождения Генетические связи между культурами *F necrophorum*, выделенных из разных регионов Приволжского округа, изображены на дендрограмме (рис 10) Она построена на основании RAPD изменчивости, выявляемой с использованием праймера №38

Таблица 4 Значения величин индексов подобия при ионарном сравнении культур I песторогого, выделенных в Приволжском регионе

Примечание «+» - по тождественным результатам

N пробы	Наименование культуры	Выявление генетозона	Уровень томоэтии	N пробы	Наименование культуры	Выявление генетозона	Уровень томоэтии
Московская обл (ВИИКН)				Татарстан			
2	3430	+	1,00	3	СиМ	+	0,73
НИИСХКС				4	АА	+	0,53
1	89,9	+	0,53	5	ГИ	+	0,13
ВИЭВ				10	С-6	+	0,13
2В	ВИЭВ-1	+	0,40	11	ЛП	+	0,13
Саратовская обл (С)				12	ВК	+	0,13
8	10	+	0,61	13	Ашат	+	0,88
Башкортостан				14	ГЧ	не выявлен	0,88
9	НФ1	+	0,13	15	Аи-14	+	0,13
Марий Эл				16	Аи-12	+	0,13
20	МИНО	+	0,83	17	Го1	+	0,80
27	МИНО-2	+	0,13	18	Усп	+	0,13
28	МИЗ	+	0,13	35	б-2	+	0,13
29	РК	+	0,13	36	УК	+	0,13
30	МК	+	0,13	38	ВУП	+	0,13
Самарская область				40	Шах	+	0,13
6	СКк		0,90	Ульяновская область			
7	1907	-	0,88	23	УВР	+	0,67
21	С1	+	0,73	24	Кз	+	0,13
22	Искра	не выявлен	0,73	25	Свияга	+	0,36
Удмуртия				39	УММ	+	0,78
32	РМ	+	0,13				
33	Р-4	+	0,13				
34	Мок	не выявлен	0,78				

Кластерный анализ разделил изучаемые культуры на три кластера (рис 10) один из них средний включает два субкластера Наиболее разнородный средний кластер (одна короткая стрелка), объединяющий культуры, выделенные в Ульяновской области (№24, 25, 39), республиках Марий Эл (№27, 28, 29, 30), Удмуртии (№32, 33) и Р Татарстане (№5, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18 36, 38). Следует отметить в этой группе два субкластера В один входят №35 и 40 (Р Татарстан) а в другой - №3 и 25 (соответственно республика Татарстан и Ульяновская область). Отдельной ветвию стоит культура №4 (Р Татарстан). Во второй кластер (две короткие стрелки) вошли культуры №7, 21, 22 (Самарской обл), №13,14, и 17 (Р Татарстан), №23 (Ульяновская обл) и №1 (НИИСХ Крайнего Севера). В третьем кластер отмеченный двиной стрелкой входят две культуры имеющие огражденные генетические связи с культурами двух других кластеров Это культура №6 (Самарская обл) и №2 (Московская обл)

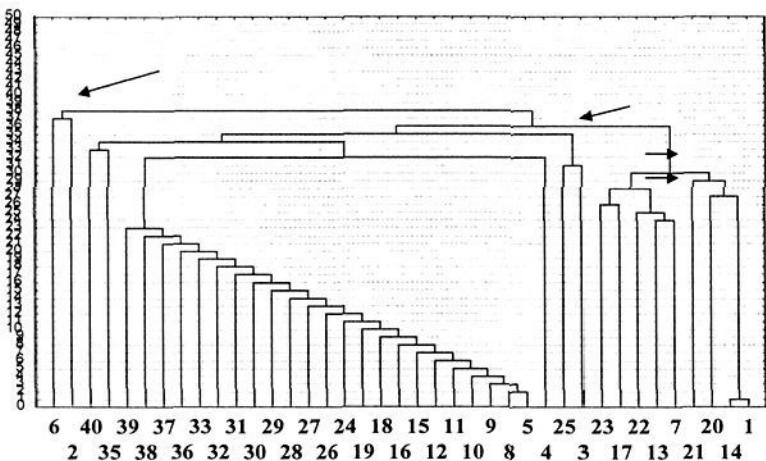


Рис. 10. - Дендрограмма распределения культур *F. necrophorum* выделенных в Приволжском регионе по результатам кластерного анализа RAPD-ПЦР с праймером №38. По горизонтали даны номера изолятов, по вертикали – генетические дистанции.

Исследования полиморфизма ДНК культур *F. necrophorum* выявили неоднородность их популяции. Далее нами были испытаны в RAPD-ПЦР еще несколько произвольных праймеров: с №55 по № 65. Эти праймеры были выбраны на основании анализа нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих белок оболочки, а № 38/1 – белок лейкотоксина. Наиболее информативными оказались праймеры № 38/1 и №60 в паре с №61.

При анализе RAPD – спектров, полученных с помощью праймера №38/1 5'-gccccggata-3' были выявлены характерные для большинства исследуемых изолятов фрагменты. Методом кластерного анализа были определены генетические расстояния между изолятами. На дендрограмме (рис. 11) выделяются два основных кластера: в первый входят изоляты № 9, 8, 12, 2, 19 и 16; во второй – № 41, 2В и 40. В отдельные кластеры входят № 20, 22, 34.

При проведении RAPD-анализа одновременно с праймерами № 60 и № 61 (рис.12) соответственно 5'-gcttatggc-3' и 5'-gcatatgggc-3' выбранными по нуклеотидным последовательностям белка оболочки, были определены расстояния связывания кластеров среди исследуемых культур. На дендрограмме выделяются два основных кластера: в первый входят изоляты № 19, 2, 41, 17 и 1; во второй – № 8, 27, 12 и 13. В отдельные кластеры входят № 34 и 37.

Каждый из основных кластеров (рис.11) представляет собой смешанную группу. Так степень сходства (праймер №38/1) между основными кластерами находится на уровне 0,42–0,54, что ориентирует на значительный полиморфизм между изолятами данной выборки по патогенности. У двух основных кластеров (рис.12) полученных с

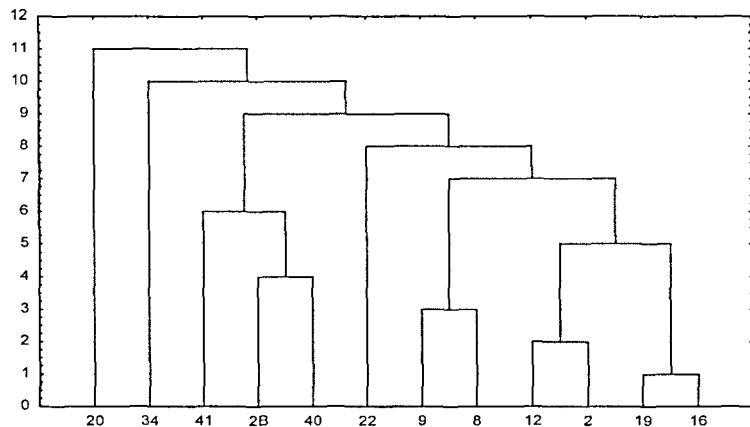


Рис 11. - Дендрограмма 12 изолятов *Fusobacterium necrophagum*, построенная по результатам RAPD-анализа с праймером № 38/1. По горизонтали - номера культур, по вертикали - генетические дистанции

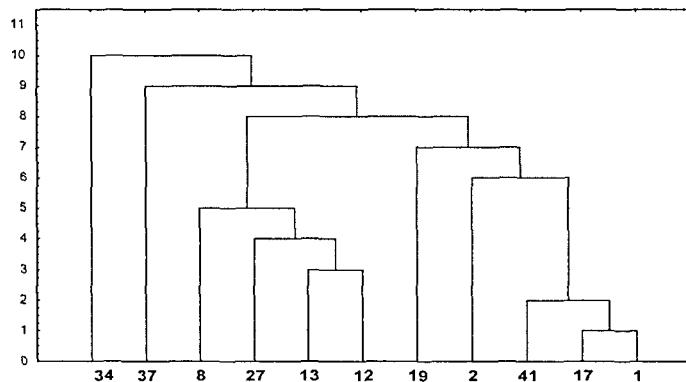


Рис 12. - Дендрограмма 11 культур *Fusobacterium necrophagum* по результатам RAPD-анализа с праймерами № 60-61. По горизонтали - номера изолятов, по вертикали - генетические дистанции

помощью праймеров №60-61 уровень сходства составляет 0,45–0,63%. Так как эти праймеры были выбраны на основании пуккотидных последовательностей, кодирующих белки оболочки, а у анаэробов разных видов они выполняют в основном один и те же функции, то и сходство между изолятами основных кластеров несколько выше. Эксперименты на белых мышах с этими культурами выявили различное воздействие на животных: сухой некроз подкожных тканей или парезич конечностей, или похудание при параличе задних конечностей. То

есть исследуемая группа изолятов данного вида микроорганизмов оказалась разнородной, несмотря на морфологическое сходство

Проведенное маркирование с помощью RAPD-ПЦР и использование производных праймеров сконструированных на основе нуклеотидной последовательности лейкогоксина - №38/1 и протеина - №60-№61 *Fusobacterium necrophorum* более полно ограждают степень схожести культур из разных территорий в сравнении с результатами морфологических и биологических исследований. Высокие показатели полиморфизма внутривидовых генетических лингвистических свидетельствуют о значительной генетической неоднородности популяций исследованного вида *Fusobacterium necrophorum*. Отобранные маркеры можно использовать по маркированию ДНК и паспортизации культур *F. necrophorum*, а также могут помочь в определении закономерностей появления и циркуляции эпизоотических штаммов в стадах, выявлять изменчивость микроорганизмов под воздействием различных факторов.

2 2 2 2 7 Исследование белкового полиморфизма культур

Fusobacterium necrophorum крупного рогатого скота

В нашей стране и за рубежом поиск специфических препаратов в виде вакцин и гипериммунных сывороток не принес ожидаемых результатов А С Донченко, А А Самоловов (1998) высказали мнение, что создание при некробактерозе высокоэффективных вакцин традиционными методами маловероятно. В неудачах, которые долгое время сопутствовали работам по созданию специфических средств профилактики некробактероза имело немаловажное значение игнорирование авторами неоднородности циркулирующих в природе эпизоотических штаммов *Fusobacterium necrophorum*.

Из полученных данных морфологических и биологических исследований свойств изолятов *Fusobacterium necrophorum* заключили, что изучаемые культуры представляют достаточно однородную группу микроорганизмов. Являются неподвижными грамотрицательными бактериями, располагаются в поле зрения в виде палочек или нитей разной длины со слабой или сильной зернистостью. Согласно данных литературы длинные нити, палочки образуют не только *F. necrophorum*, но и культуры *F. godiaformans*, *F. mortiferum*, *F. necrogenes*, *F. periodonticum*, выделяемые от животных.

Fusobacterium necrophorum морфологически также схож с родом *Bacteroides*, культуры которых можно выделить из пищеварительного тракта (слепая кишка, рубец). Для подтверждения однородности в антигенном отношении изучаемых изолятов *Fusobacterium necrophorum* провели биологические пробы на белых мышах.

Несмотря на схожесть изучаемых культур по морфологическим и культуральным свойствам, при проведении биологической пробы на белых мышах клиническое проявление заболевания и картины посмертного вскрытия были разнообразными. Это ориентировало нас на полиморфизм белков у этих культур.

При изучении полиморфизма белков культур *F. necrophorum* базовыми культурами, с которыми мы сравнивали остальные, были №8, №12 и №27, которые нами идентифицированы и №34 не идентифицирован. Из анализа паттернов следует, что наибольшее сходство отмечали у №8, №12 и №27, а расхождение с №16, №22, №24, №34 и №40. Особенно отличалась от других культуры №34, которая не идентифицировалась при проведении ПЦР с разными парами праймеров и при проведении RAPD-ПЦР анализа также

занимала особое положение. Это свойство культуры №34 было постоянным, как и №8, №12 и №27. На рисунке 13 (фрагмент исследований) видно как бы две группы культур отличающихся по распределению молекулярных весов мономеров. Номера 5, 8, 12, имеют схожее распределение

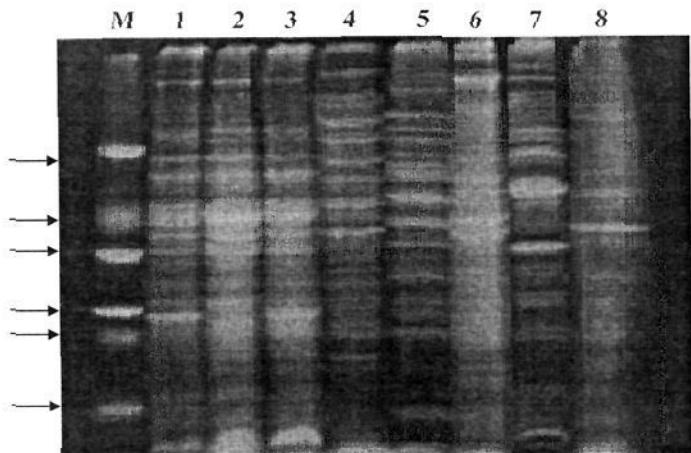


Рис. 13. - 10% Ds-Na-PAAG электрофорез бактериальных лизатов культур *F. necrophorum*: 1 – №5, 2 – №8, 3 – №12, 4 – №21, 5 – №28, 6 – №34, 7 – №38, 8 – №6Р, М – маркер молекулярного веса с верху вниз (kDa): 66 –►, 45 –►, 36 –►, 29 –►, 24 –►, 20,1 –►. (фрагмент исследований)

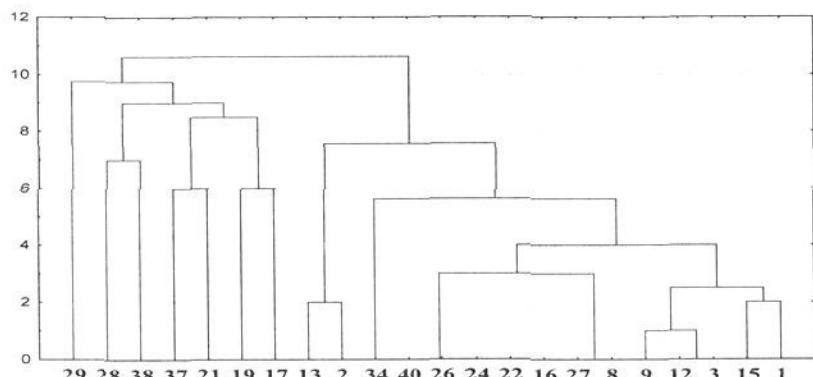


Рис. 14. - Кластерный анализ мономеров культур *Fusobacterium necrophorum* с праймером №38. По горизонтали приведены номера исследуемых культур, а по вертикали – уровни подобия.

белковых фрагментов, отличное от №№21,28, 34, 38, 6Р Методом кластерного анализа результатов электрофореза белковых мономеров культур *Fusobacterium necrophorum* были определены генетические расстояния между изолятами На рисунке 14 выделяются два основных кластера, В первый кластер входят номера культур 1, 3, 8, 9, 12, 15, 16, 22, 24, 26, 27 и субклuster с №2 и №13 Отдельной ветвью располагается культура №34 Во второй кластер вошли №№17, 21, 28, 37, 38 и отдельной ветвью №29

И в завершение был проведен кластерный анализ ДНК девяти культур *Fusobacterium necrophorum* (рис 15 и 16), дающих наиболее схожие результаты при исследовании в RAPD-ПЦР с праймером №38/1, и его результаты сравнили с результатами кластерного анализа мономеров этих же девяти культур *Fusobacterium necrophorum*

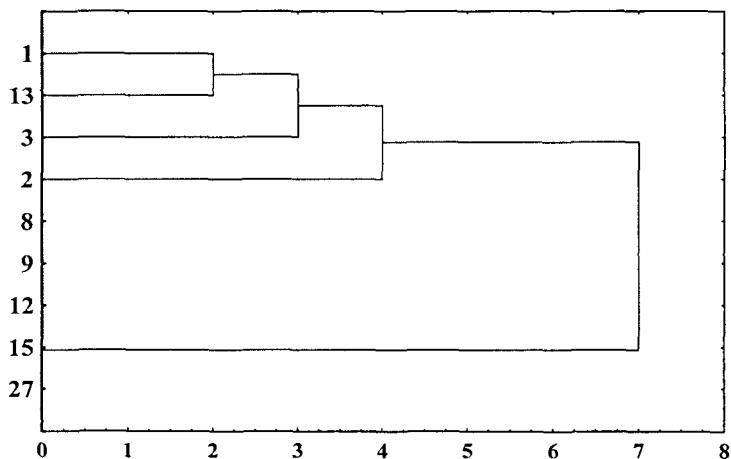


Рис 15 Кластерный анализ ДНК девяти культур *Fusobacterium necrophorum*, дающих наиболее схожие результаты при исследовании в RAPD-ПЦР с праймером №38/1 По горизонтали приведены уровни подобия, а по вертикали – номера исследуемых культур

Кластерный анализ ДНК девяти культур *Fusobacterium necrophorum* (№№1, 2, 3, 8, 9, 12, 13, 15, 27), дающих наиболее схожие результаты при исследовании в RAPD-ПЦР с праймером №38/1 разделит их на две группы (рис 15) В одну вошли культуры №№8, 9, 12, 15, 27 Уровень подобия между собой наибольший Во вторую группу вошли №№1, 3 и 13 Отдельной ветвью входит №2

Кластерный анализ мономеров девяти культур *Fusobacterium necrophorum* (№№1, 2, 3, 8, 9, 12, 13, 15, 27) разделит их на два кластера (рис 16) В один вошли три субкластера первый – культуры №1 и №15 в другой – №3, 12, 9 и в

третий - №8 и №27 Уровень подобия наибольший между №8 и №27, затем у №3, 12, 9 и далее у №1 и №15 Во второй кластер вошли №2 и №13

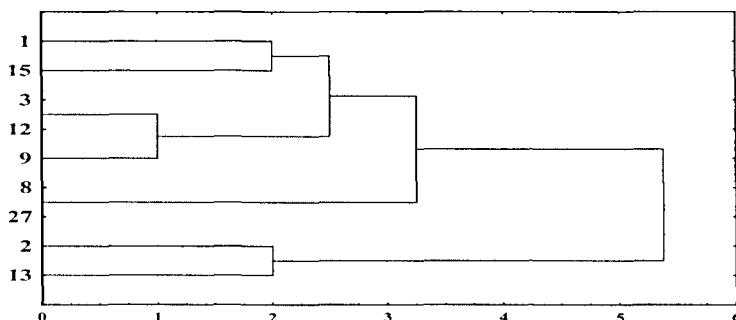


Рис. 16 – Кластерный анализ мономеров девяти культур *Fusobacterium necrophorum*, дающих наиболее схожие результаты при исследовании в разных типах ПЦР. По горизонтали приведены номера исследуемых культур а по вертикали – уровни подобия

Распределение по группам при проведении кластерного анализа ДНК мономеров девяти культуры *Fusobacterium necrophorum* совпадают за исключением №1, №3. Исследуемые культуры при генотипировании по генам топоизомеразы II транслюзону, белку оболочки лемаллюминину и спайсеру 16S-23S лейкотоксина были идентифицированы как *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum*. Исследования полиморфизма мономеров в течение 2-х летнего периода давали схожие результаты. Это ориентирует на то, что была проведена фиссоидация структурных олигомеров, которые могут быть пригодны для исследования в качестве маркеров структурных генов.

Можно заключить что исследуемая группа культур данного вида микроорганизмов оказалась разнородной, несмотря на морфологическое сходство. Выявленные высокие показатели полиморфизма внутривидовых дистанций свидетельствуют о значительной биологической неоднородности полученных исследованного вида *Fusobacterium necrophorum*.

2.2.2.7 Изучение геномного полиморфизма культур *Mycoplasma* с помощью RAPD-ПЦР

При анализе ДНК-паттернов, для установления уровней родства, очень важен выбор «произвольных» праймеров, которые давали бы наиболее информативные картины (паттерны) геномного полиморфизма микоплазм. Из проанализированных 43 олигонуклеотидов были выбраны и синтезированы 10. После проведения RAPD-ПЦР с референтными культурами микоплазм и сравнения полученных паттернов выявили, что не все сконструированные нами праймеры были пригодны для дифференциации видов возбудителя (табл. 5). Малоинформативными олигонуклеотидами для дифференциации родов микоплазм оказались № 11, 12, 23, 32, 34, 36, 43. Наиболее интересным олигонуклеотидами, на наш взгляд, являются №15 5'-gtttcgccca и №39 5'-gagcgcggtc. Так если паттерны, полученные с помощью праймера №15 сравниваются с

M bovigenitalium и с *M bovimastitidis*. Если же за репер взять шт *M arginini*, то выявляется высокий уровень гомологии между остальными культурами микоплазм при использовании праймеров № 11, 32, 34, 39, 40 и 43, за исключением *M bovigenitalium* и *M bovimastitidis*. Схожую дифференциацию выявляет праймер №39. То есть «произвольные» праймеры № 15 и 39 дифференцируют *M bovigenitalium* от остальных штаммов микоплазм, показывая низкую с ними гомологию, за исключением штамма *M bovimastitidis*. В данном случае, несмотря на то, что гомология достаточно высокая (индексы соответственно 0,89 и 1,0), эти штаммы не идентичны.

Таблица 5 Результаты анализа генетических профилей штаммов микоплазм с помощью RAPD-ПЦР при попарном сравнении

пр\штамм	сравнение с <i>M bovigenitalium</i>						
	<i>M arginini</i>	<i>M bovimast</i>	<i>M bovirhinis</i>	<i>M alcalenses</i>	<i>M mycoides</i>	<i>E coli</i>	<i>Staph aureus</i>
12	0,2	-	0,2	0,22	0,22	-	-
15	-	0,89	-	-	-	-	-
23	0,22	-	0,29	0,44	0,44	-	-
32	0,2	0,33	0,2	0,2	0,2	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-
36	0,4	0,44	0,44	0,67	0,4	-	-
39	0,29	0,53	0,29	0,29	0,29	0,38	0,38
40	0,25	0,4	0,25	0,25	0,25	0,3	0,3
43	0,5	0,47	0,5	0,5	0,47	0,4	-
11	0,29	0,25	0,29	0,29	0,29	0,25	-
пр\штамм	сравнение с <i>M bovimastitidis</i>						
	<i>M bovigen</i>	<i>M arginini</i>	<i>M bovirhinis</i>	<i>M alcalenses</i>	<i>M mycoides</i>	<i>E coli</i>	<i>Staph aureus</i>
12	-	0,4	0,4	0,44	0,44	-	0,15
15	0,89	-	-	-	-	-	-
23	-	0,29	0,4	0,29	0,29	-	-
32	0,83	0,33	0,33	0,33	0,33	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-
36	0,44	-	-	-	-	0,44	0,29
39	0,67	0,27	0,27	0,27	0,27	0,35	0,4
40	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,53	0,53
43	0,47	0,8	0,8	0,8	0,75	0,52	0,18
11	0,5	0,57	0,57	0,57	0,57	-	-
пр\штамм	сравнение с <i>M arginini</i>						
	<i>M bovigen</i>	<i>M bovimast</i>	<i>M bovirhin</i>	<i>M alcalenses</i>	<i>M mycoides</i>	<i>E coli</i>	<i>Staph aureus</i>
12	0,2	0,4	0,86	0,86	0,86	0,18	-
15	-	-	1	1	1	-	-
23	0,22	0,29	0,75	0,8	0,8	0,25	0,29
32	0,2	0,33	1	1	1	-	-
34	-	-	1	1	1	0,18	0,18
36	0,4	-	0,67	0,83	1	0,2	0,25
39	0,29	0,27	1	1	1	-	-
40	0,25	0,2	1	1	1	0,3	0,3
43	0,38	0,8	1	1	0,93	0,55	0,2
11	0,29	0,57	1	1	1	0,29	0,22

После проведения RAPD-PCR с референтными культурами микоплазм провели коэффициентную оценку сходства между ними при по парном сравнении полученных паттернов с расчетом индекса подобия. Из полученных данных следует, что референтные культуры можно разделить на две (таб 1 б) основные группы в первую – относятся *M bovigenitalium* и *M bovimastitidis*, а во вторую – *M bovirhinis*, *M alcalescens*, *M mycoides*, *M arginini*.

Таблица 6 Генетический по инморфизму референтных штаммов микоплазм в RAPD-PCR при попарном сравнении

сравнение с <i>M bovigenitalium</i>					
Pr/штамм	<i>M arginini</i>	<i>M bovimast</i>	<i>M bovirhin</i>	<i>M alcalescens</i>	<i>M mycoides</i>
39	0,29	0,53	0,29	0,29	0,29
сравнение с <i>M bovimastitidis</i>					
Pr/штамм	<i>M arginini</i>	<i>M bovigen</i>	<i>M bovirhin</i>	<i>M alcalescens</i>	<i>M mycoides</i>
39	0,27	0,67	0,27	0,27	0,27
сравнение с <i>M arginini</i>					
Pr/штамм	<i>M bovimast</i>	<i>M bovigenit</i>	<i>M bovirhin</i>	<i>M alcalescens</i>	<i>M mycoides</i>
39	0,27	0,29	1,0	1,0	1,0

При генотипировании культур, выделенных из одного и того же хозяйства, но в разные годы, использовали выше названные праймеры. На основании RAPD-спектров методом кластерного анализа установили генетические расстояния между родами микоплазм. На дендрограмме (рис 17) четко

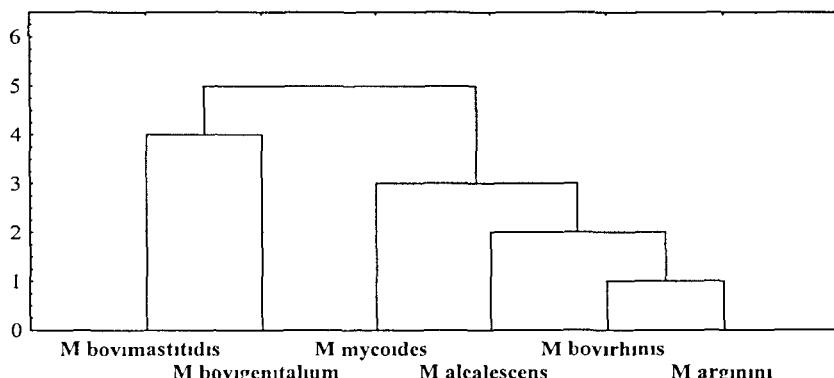


Рис 17 - Дендрограмма генетического сходства штаммов микоплазм в RAPD-анализе с праймером № 39. По вертикали – генетические дистанции, по горизонтали – номера культур

выделяются два кластера один включает *M bovigenitalium* и *M bovimastitidis*, а другой – *M bovirhinis* и *M arginini*. Во втором кластере можно выделить два подкластера, первый из которых включает в себя *M alcalescens*, второй – *M mycoides*. Микоплазмы первого кластера поражают в основном репродуктивные органы животных, а второго – органы дыхания.

Генетические связи штаммов и изолятов микоплазм отражены на дендрограмме (рис 18) на которой выделяются три кластера. Один из них, включающий референтный штамм *M bovigenitalium* и четыре изолята более однороден и степень сходства составляет 0,72 – 0,81. Другой кластер содержит *M bovimastitidis* и два изолята и степень сходства равна 0,54 – 0,63. Третий кластер состоит из *M arginini* и других двух изолятов ГДС степень сходства по отношению к другим изолятам оказалась значительно меньше – 0,27– 0,36.

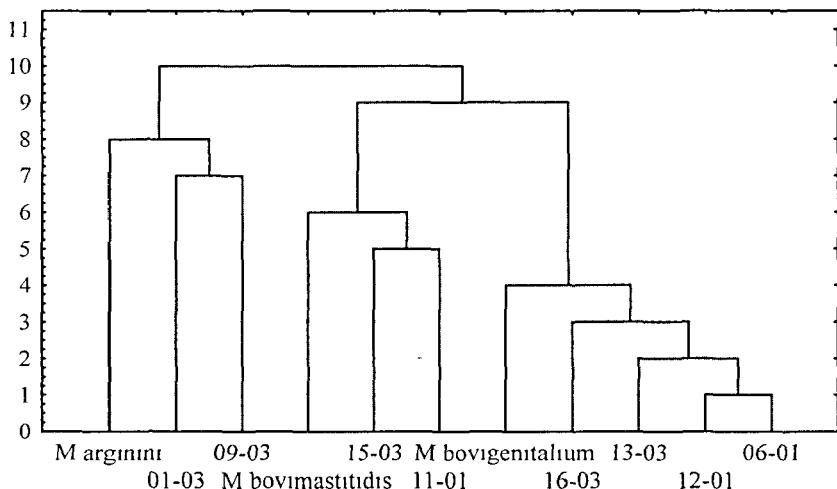


Рис 18 - Дендрограмма генетического сходства референтных штаммов и изолятов микоплазм в RAPD-анализе с праймером № 39. По вертикали – генетические дистанции, по горизонтали – номера культур.

В результате экспериментальных исследований выбраны олигонуклеотидные праймеры №15 и №39, сконструированные на основе анализа ДНК генов *mhp3*, *mpr* (оперон *MgPa*) *M bovigenitalium*. Полученные данные по дифференциации видов микоплазм с помощью RAPD-ПЦР показали возможность их использования в изучении геномного полиморфизма родов микоплазм.

Таким образом, построенные по результатам RAPD-анализа дендрограммы по двум видам микроорганизмов согласуются с результатами биологических исследований и, по нашему мнению, более полно отражают степень схожести родов внутри вида. Исследования геномного полиморфизма возбудителей бактериальных инфекций могут помочь в определении закономерностей появления и циркуляции эпизоотических штаммов в стадах, а также выявлять молекулярную изменчивость микроорганизмов под воздействием различных факторов.

3 ВЫВОДЫ

1 Использование в эпизоотологии молекулярного маркирования генетического материала и оценке его на новой теоретической основе составляет предмет специальной отрасли знания - молекулярная эпизоотология. Основными объектами и точками приложения молекулярной эпизоотологии являются индикация, дифференциация и полиморфизм микроорганизмов. Теоретической базой мРНК и ДНК-маркирования является концепция комплементарности, где основной механизм выявления полиморфности является гибридизация. Применение ДНК-маркеров решает проблему насыщения генома маркерами и позволяет маркировать практически любые участки ДНК, в том числе не кодирующие.

2 Разработанные способы EST-ПЦР мономорфного специфического маркирования последовательностей мРНК вируса классической чумы свиней и вирусной диареи крупного рогатого скота с помощью ОТ-ПЦР позволяют помимо выявления соответствующих вирусов устанавливать циркуляцию вируса вирусной диареи крупного рогатого скота среди свиней и исключать персистенцию вируса классической чумы свиней среди крупного рогатого скота.

3 Разработанный способ STSs-ДНК мономорфного маркирования нуклеотидных последовательностей *Fusobacterium necrophorum* на основе мобильного элемента (транспозона) с помощью гнездовой ПЦР обладает специфичностью и высокой чувствительностью, которая позволяет проводить маркирование в биологических образцах патогенные *Fusobacterium necrophorum*.

4 Диагностическая тест-система гнездовой ПЦР для выявления патогенных *Fusobacterium necrophorum* методом совмещения двух реакций с наружными и внутренними праймерами в одной пробирке позволяет сократить время выделения геномной ДНК с 224 до 54 и снизить стоимость выделения геномной ДНК в 3 раза, сократить время проведения реакции на 2,5 часа и экономить реактивов на 50 реакций ПЦР.

5 Сконструирована система полиморфного маркирования, основанная на тестировании одноклеточных замен (SNPs) с помощью ПДРФ-ПЦР анализа, позволяющая проводить генотипирование изолятов *Fusobacterium necrophorum*, при использовании специфических наружных №11-№12, внутренних №011-№022 праймеров и эндоклетики *MspI*, не прибегая к секвенированию ампликонов.

6 Разработанный способ мономорфного STSs-ДНК маркирования с помощью мультипраймерной ПЦР может быть применен генетической характеристики и дифференциации на подвиды культур *Fusobacterium necrophorum* с помощью одновременно двух или трех пар праймеров к разным генам одной нуклеотидной последовательности ДНК возбудителя болезни. Оптимальный вариант мультиплексной одношаговой ПЦР для генетической характеристики геномной ДНК - это использование трех пар праймеров для выявления белка оболочки, топонизомеразы II, гемагглютинина, или двух пар - белка оболочки и гемагглютинина, где основным дифференцирующим признаком является ген гемагглютинина, присущий только подвиду *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum*.

7 Разработанный способ SNPs-маркирование *Fusobacterium necrophorum* с помощью RAPD-ПЦР и произвольных праймеров, сконструированных на основе нуклеотидных последовательностей лейкотоксина - №38/1 и протеина - №60-№61

Fusobacterium necrophorum позволяет выявлять степень схожести культур из разных регионов. Данные маркеры можно использовать при паспортизации культур *F. necrophorum*, а также в определении закономерностей появления и циркуляции эпизоотических штаммов в стадах, выявлять изменчивость микроорганизмов под воздействием различных факторов.

8 Построенные дендрограммы по данным RAPD-ПЦР анализа более полно отражают степень схожести по сайтам праймирования культур из разных территорий в сравнении с результатами морфологических и биологических исследований. Выявленные высокие уровни полиморфизма внутривидовых генетических дистанций свидетельствуют о генетической неоднородности популяций *Fusobacterium necrophorum* в Сибирском и Приволжском регионах. Степень схожести при использовании праймера №38/1 между основными кластерами находится на уровне 0,42–0,54, а с праймерами №60–61 0,45–0,63%, что ориентирует на значительный полиморфизм между культурами.

9 На основании полученных данных генотипирования изолятов выбраны два наиболее характерных представителя *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* штамма № 8(8TS630501) и штамм № 12 (12TSK630501), принадлежность которых к подвиду *necrophorum* подтверждена установлением нуклеотидной последовательности генов белка оболочки, топоизомеразы II (ДНК-гираза), гемагглютинина и межцепенной вставки (16S-23S лейкотоксина). Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов приведены в GenBank/NCIBI locus DQ417656 [gi|89891991] (ДНК-гираза, топоизомераза II), DQ417657 [gi|89891993] (спайсер), DQ335667[gi|84872488] (белок оболочки) и DQ341278[gi|85002770] (гемагглютинин). Данные штаммы могут быть использованы при разработке диагностических систем и защитных препаратов, а штаммы 12TSK630501 и 8TS630501 *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* предлагаем считать референтными.

10 Разработанные две модифицированные методики по выделению геномной ДНК *Fusobacterium necrophorum* (первая – основная дегротенизация ДНК *Fusobacterium* достигается обработкой протеиназой K (10мкг/мл) при +55°C в течение 18–20 часов, вторая – основная дегротенизация ДНК осуществляется обработкой 10% СТВ при +80°C в течение 1,5 часов. Использование модифицированных методик позволяет получать чистые препараты суммарной ДНК от примеси белков, где соотношение D260/D280 равно 1,74–1,75.

11 Результаты исследования белкового полиморфизма культур *Fusobacterium necrophorum* (несмотря на морфологическое сходство) говорят о высоких показателях внутривидовых дистанций и о значительной белковой неоднородности популяций исследованного вида. Проведенный кластерный анализ более полно отражает степень схожести культур из разных территорий в сравнении с результатами морфологических и биологических исследований. Исследования белкового полиморфизма *Fusobacterium necrophorum* помогут в определении закономерностей появления и циркуляции эпизоотических штаммов в стадах, а также выявлять изменчивость микроорганизмов под воздействием различных факторов.

12 Разработанная система полиморфного SNPs-маркирования культур *Mycoplasma* на основе RAPD-ПЦР с праймерами №15 и №39 сконструированных на основе ДНК генов *mhp3*, *mgp* (оперон *MgPa*) *M. bovigenitalium* может

использоваться в популяционной генетике микоплазм. Получаемые с их помощью данные позволяют разграничивать выделенные культуры микоплазм по видам

13 При проведении диагностических исследований общепринятыми методами, позволяющими устанавливать наряду с *Fusobacterium necrophorum* наличие, как не идентифицированные *Fusobacterium*, так и *Fusobacterium pseudonecrophorum* и другие анаэробы, морфологически схожие с *F. necrophorum* subspecies *necrophorum*, но обладающие несколько большей энергией роста. Доля чистых культур при этом способе составляет около 30% (одной трети от всех выделенных анаэробов)

14 Использование в эпизоотологии молекулярного маркирования генетического материала позволяет на примерах мРНК и ДНК содержащих микроорганизмов применять различные ДНК - маркерные системы для обнаружения, разграничения по видам и подвидам, установления полиморфизма патогенных микроорганизмов. При генетическом маркировании мРНК и ДНК микроорганизмов распространение получили методы, основанные на полимеразной цепной реакции. В экспериментах показана возможность использовать различные типы маркеров, для индикации, дифференциации и изучения генетических признаков микроорганизмов содержащих мРНК (вирусов классической чумы свиней и вирусной диареи крупного рогатого скота) и ДНК (*Fusobacterium necrophorum* и *Mycoplasma*)

4 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Научные разработки и положения диссертационной работы нашли отражение в нормативных документах, освоенных ветеринарной практикой

- инструкции «Тест-система для выявления *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* методом полимеразной цепной реакции с помощью гнездовых праймеров» и ТУ 9388-001-05095732-2006 (Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору РФ Свидетельство о государственной регистрации № ПВР-1-2 6/01846 от 20 февраля 2007 г Учетная серия 35-1-2 6-1495)

- временная инструкция по применению тест-системы для выявления патогенных *Fusobacterium necrophorum* методом совмещенной гнездовой полимеразной цепной реакции (two in one nested PCR, утвержденная директором ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН, 2006,

- временная инструкция по применению тест-системы для генотипирования культур *Fusobacterium necrophorum* методом применения RAPD-ПЦР анализа для молекулярно-генетического картирования культур *Fusobacterium necrophorum*, утвержденная директором ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН, 2006

5 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТМЛ ДИССЕРТАЦИИ

1 Выявление вируса классической чумы свиней с помощью полимеразной цепной реакции / Сави А И Нузырев, С Ф Оренкова, А С Донченко, В М Чекинцев, А А Ильинцев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология М - 1999 - №1 - С 27-30

2 Оigonуклеотидные праймеры в диагностических тест-системах для дифференциации вирусов классической чумы свиней и вирусной диареи крупного

рогатого скота/ Соавт СА Юрик //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2000 - №1-2 - С 99-104

3 Дифференциальная диагностика классической чумы свиней и болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции/ Соавт С А Юрик// Доклады РАСХН М - 2000 - № 1 - С 37-39

4 Полимеразная цепная реакция с гнездовыми праймерами в диагностике *Fusobacterium necrophorum* / Соавт ИВ Некрасова, А А Самоловов, НН Ільинова //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2002 - №3-4 - С 100-105

5 Генотипирование патогенного биотипа АВ *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* / Соавт М А Филипенко И В Некрасова, Е А Храпов А А Самоловов //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2003, №1 - С 86-90

6 ПЦР-генетическое типирование *Fusobacterium necrophorum* с помощью анализа ПЦРФ синтезированного ампликона / Соавт М А Филипенко, И В Некрасова, Е А Храпов, А А Самоловов //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2003 - №3(149) - С 124-127

7 Транспозоны в передаче патогенных свойств *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* биотипа АВ /Соавт А С Доценко, В М Биннов, Д В Сараев А А Самоловов, С В Лопатин //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2003 - №4 - С 84-87

8 Полиморфизм ДНК изолятов возбудителя некробактериоза крупного рогатого скота в Западной Сибири /Соавт СА Юрик, ЮА Горбунов, АА Самоловов, СВ Лопатин, ЕВ Дударева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2005 - №2 - С 98-102

9 Выявление гена гемагглютинина *Fusobacterium necrophorum* с помощью полимеразной цепной реакции /Соавт Д А Хузин, С А Юрик, ХН Макаев, Е В Дударева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2005 - № 3 - С 83-87

10 Разграничение *Fusobacterium necrophorum* на подвиды с помощью дуплексной одношаговой полимеразной цепной реакции /Соавт Е А Храпов, С А Юрик, М А Филипенко, Е В Дударева //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2005 - № 3 - С 87-92

11 Исследование геномного полиморфизма изолятов *Fusobacterium necrophorum* в Приволжском округе/Соавт Д А Хузин, Х Н Макаев С А Юрик Е В Дударева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2005 - № 4 - С 131-135

12 Дифференциация *Fusobacterium necrophorum* на подвиды с помощью дуплексной одношаговой полимеразной цепной реакции /Соавт Е А Храпов, С А Юрик, М А Филипенко //Доклады Российской академии М - 2006 - № 1 - С 51-53

13 Сравнительная индикация *Fusobacterium necrophorum* бактериологическим методом и с помощью гнездовой ПЦР /Соавт Самоловов А А Караваев Ю Д, Лопатин С В, Семенова И Н // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2006, № 2 - С 92-96

14 Использование однопраймерной полимеразной цепной реакции для изучения межвидового геномного полиморфизма у микроплазм /Соавт С А Юрик, М Н Шадрина // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2006 - № 3 - С 86-91

15 Использование RAPD-PCR анализа в исследовании молекулярно генетического полиморфизма культур *Gusobacterium necrophorum* и *Mycoplasma* /Соавт С А Юрик, Д А Хузин //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки Новосибирск - 2007 - №1 - С 76-82

16 Генетический полиморфизм ДНК культур *Gusobacterium necrophorum* по данным RAPD-анализа /Соавт С А Юрик, Д А Хузин //Доклады Россельхозакадемии М - 2007 - №2 - С 52-56

17 Исследование полиморфизма отигомеров культур *Gusobacterium necrophorum*/С А Юрик, Д А Хузин, А В Мокеева и О С Воронова, Е В Дударева//Сибирский вестник сельскохозяйственной науки - 2007 - №3 - С 76-82

18 Патент №2120994 от 27 октября 1998 Способ выявления вируса классической чумы свиней /Соавт А Т Пузырев, А С Донченко, С Ф Орешкова, В М Чекишев, А А Ильинчев // - заявитель и патентообладатель ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и ГНЦ ВВ «Вектор» - заявка №97103934 от 12 03 1997 - Бюл №30

19 Патент №2158306 от 27 октября 2000 г Способ выявления вируса вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота с помощью специфических олигонуклеотидных примеров в полимеразной цепной реакции /Соавт А С Донченко, С Ф Орешкова, В М Чекишев, С А Юрик А А Ильинчев // - заявитель и патентообладатель ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и ГНЦ ВВ «Вектор» - заявка №99101603 от 19 января 1999 - Бюл №30

20 Патент №2203951 от 10 мая 2003 г Способ выявления *Gusobacterium necrophorum* в генезовой ЦПР / Соавт А А Самоловов, С А Юрик, Н Н Блинова Н В Некрасова // заявитель и патентообладатель ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН и ГНЦ ВВ «Вектор» по заявке №2001133577 от 10 12 2001 - Бюл №13

21 Патент №2294374 от 27 февраля 2007 г Способ определения в пробе патогенного подвида *Gusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* с помощью полимеразной цепной реакции /Соавт С А Юрик, Е В Дударева // заявитель и патентообладатель ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН по заявке №2004125139/13 от 03 08 2004 - Бюл №6

22 Получение матричной РНК вируса вирусной диареи крупного рогатого скота для ее после циуциуального клонирования /Соавт , В А Крутияк //III Всесоюзная конференция по эпизоотологии – Новосибирск, 24-26 сент 1991 – Новосибирск – 1991 – С 251-252

23 Выделение РНК вируса классической чумы свиней // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч тр ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН) - Новосибирск - 2000 - С 329-333

24 Диагностика болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота и классической чумы свиней с помощью полимеразной цепной реакции /Соавт А С Донченко В М Чекишев, С Ф Орешкова, С А Юрик //Развитие агропромышленного комплекса в зонах рискованного земледелия материалы VI научно-практической конференции г Новокузнецк – 1999 - С 29-30

25 Выделение и очистка м-RНК вируса вирусной диареи крупного рогатого скота Соавт В А Крутияк //Инфекционные болезни животных Эпизоотология диагностика, профилактика и меры борьбы Сб науч тр - С О РАСХН - ГНУ ИЭВСиДВ - Новосибирск - 1991 - С 103-106

26 Клонирование фрагмента геномной РНК вируса вирусной диареи крупного рогатого скота, кодирующего ген gp48 /Соавт С А Юрик С Ф Орешкова В Н Афонинкин //Проблемы стабилизации и развития сельского хозяйства Казахстана Сибири и Монголии – 3-я Международная науч - практи

конф (Алматы 18-19 июля – 2000)/СО РАСХН – Новосибирск – 2000 – С 195-196

27 Выделение хромосомной ДНК *Escherichia coli* /Соавт А А Самоловов, С В Лопагин //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб научных трудов) Новосибирск – 2000 - С 163-166

28 Применение полимеразной цепной реакции для обнаружения вируса болезни слизистых оболочек парнокопытных животных /Соавт В М Чекишев, С Ф Орешкова, С А Юрик //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч т р) Новосибирск - 2000 - С 130-134

29 Возможность прижизненной диагностики классической чумы свиней и болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота /Соавт С И Прудников, С А Юрик, А А Духовский // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч т р) Новосибирск - 2000 - С 183-186

30 Получение геномной библиотеки в плазмидном векторе хромосомной ДНК *Escherichia coli* /Соавт А А Самоловов, С А Юрик, Н В Некрасова, С Ф Орешкова //Проблемы стабилизации и развития сельского хозяйства Казахстана, Сибири и Монголии Материалы 3-й Международной науч -практик конф (Алматы, 18-19 июня 2000 г)/РАСХН Сиб отд-ние Новосибирск - 2000 - С 195-196

31 Сравнительный анализ специфичности и чувствительности полимеразной цепной реакции с методами индикации вируса классической чумы свиней на культуре клеток /Соавт В М Чекишев, С И Прудников, Т М Глотова, Н Е Панова //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч т р) Новосибирск - 2000 - С 134-139

32 Использование кДНК, специфичных вирусу классической чумы свиней, для дифференциации *Pestivirususes* /Соавт С Ф Орешкова //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч т р) Новосибирск - 2000 - С 143-150

33 Выбор специфических олигонуклеотидных праймеров // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч т р) Новосибирск – 2000 - С 167-173

34 Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения RNA вируса классической чумы свиней /Соавт А Т Нузырев А С Донченко, С Ф Орешкова В М Чекишев, А А Ильинцев //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч т р) Новосибирск - 2000 - С 174-178

35 О возможности эволюционной изменчивости представителей пестивирусов классической чумы свиней и вирусной диареи/Соавт Ю И Вульф, К С Макарова //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве (Сб науч т р) Новосибирск – 2000 - С 179-183

36 Клонирование хромосомной ДНК *Escherichia coli* / Соавт Н В Некрасова //Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и других этиологий и меры борьбы с ними (Материалы научно-практической конф - Иркутск - 2001 - Новосибирск - 2001 - С 111-112

37 Разработка биотипилированного ДНК-зоны на основе кДНК гена gp48 вируса вирусной диареи крупного рогатого скота, клонированного в плазмидный вектор /Соавт В Н Афоньшин //Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и другой этиологий и меры борьбы с ними//Материалы научно-практической конференции (Иркутск, 6-7 сентября 2001) – Иркутск – 2001 – С 36-37

38 Выявление и идентификация *Fusobacterium necrophorum* с помощью полимеразной цепной реакции и гнездовых праймеров /Соавт Н В Некрасова А А Самоловов //Биотехно-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей (Материалы международной научно-практической конф Покров 16-18 апр 2002 г) Покров - 2002 - С 251-252

39 Дифференциальная диагностика вирулентного биотипа АВ *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* с помощью ПЦР и ПДРФ ампликонов /Соавт Н В Некрасова, А А Самоловов //Материалы первого международного конгресса (Алматы 10-11 октября 2002) Алматы - 2002 - Г 4 - С 171-173

40 Дифференциальная диагностика *Fusobacterium necrophorum* у мелкого и крупного рогатого скота с помощью полимеразной цепной реакции /Соавт Н В Некрасова, А А Самоловов //Науч обеспеч АПК Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Башкортостана Матер 5-ой Междунар науч - практ конф (Абакан, 10-12 июня 2002) РАСХН Сиб отделение Новосибирск - 2002 - С 468-471

41 Дифференциация сходных по фенотипу *Fusobacterium necrophorum* subsp *necrophorum* с помощью анализа ПДРФ синтезированного ампликона /Соавт М А Филиппенко, Н В Некрасова, Е А Храпов, А А Самоловов //Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропозов //Труды Международ Научно-практическ конференции посвящ 45-летию института 24-26 сен , 2003 г Ч 1, Покров - 2003 - С 304-308

42 Исследование полиморфизма ДНК изолятов *Fusobacterium necrophorum* /Соавт С А Юрик, Ю А Горбунов //«Материалы международной научно-практической конференции «Современное состояние и актуальные проблемы развития ветеринарной науки и практики», посвященной 100-летию института» 15-16 сентября 2005 г , г Алматы, КазНИВИ, Т 1 Инфекционные болезни С -249-252

43 Дифференциация *Fusobacterium necrophorum* методом ПЦР-анализа /Соавт Е В Дударева //Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых Тр 2-й Междунар конф мол Ученых (20-21 апреля 2006 г , пос Краснообск) /РАСХН Сиб отд-ние - Новосибирск 2006 - 656 с - С 398- 402

44 Идентификация *Fusobacterium necrophorum*//Актуальные проблемы ветеринарного обеспечения животноводства Сибири Сб науч тр /РАСХН Сиб От-ние ГНУ ИЭСиДВ – Новосибирск – 2006 – С 322-327

Подписано в печать 15 05 2007 г Формат 60×84 $\frac{1}{16}$
Печ л 2,0 Тираж 100 экз Заказ № 154

ООО ИПФ «Агрос»
630501, Новосибирская область, пос Краснообск