



Научная статья

УДК 579.62:579.253.4

Сравнительная эффективность двух RAPD-PCR праймеров при генотипировании изолятов *E. coli*, выделенных от индеек

Валентина Ивановна Тыщенко¹, Елена Сергеевна Овчарова¹, Валерий Павлович Терлецкий²,
Елена Васильевна Сыворотко², Лидия Александровна Шинкаренко³

¹Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП»);

²Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина; ³Селекционно-генетический центр «Северо-Кавказская зональная опытная станция по птицеводству» (СГЦ «СКЗОСП») – филиал ФНЦ «ВНИТИП»

Аннотация: Цель работы – провести идентификацию 30 изолятов *E. coli*, выделенных из трех групп индеек (отцовская и материнская линии создаваемого среднего кросса, а также от патологического материала павших особей). Выявление генетических профилей индивидуальных изолятов проводили с помощью генотипирования методом полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (RAPD-PCR) с использованием двух праймеров. Праймер 1254 выявил более полиморфную картину в количестве и распределении амплифицированных фрагментов ДНК в сравнении с праймером OPL-12. В группе особей материнской линии (10 образцов) отмечалось большее межиндивидуальное разнообразие, чем в группе отцовской линии (10 образцов) по обоим использованным праймерам. В ряде случаев отмечается идентичность штаммов, выделенных из клоаки здоровых индеек, прежде всего, отцовской линии, и выделенных из разных органов заболевших особей. Таким образом, метод RAPD-PCR позволил выявить особенности генетических профилей амплифицированных фрагментов ДНК в трех сравниваемых группах индеек.

Ключевые слова: кишечная палочка, индейки, бактериальные изоляты, генотипирование, праймеры.

Для цитирования: Тыщенко, В.И. Сравнительная эффективность двух RAPD-PCR праймеров при генотипировании изолятов *E. coli*, выделенных от индеек / В.И. Тыщенко, Е.С. Овчарова, В.П. Терлецкий, Е.В. Сыворотко, Л.А. Шинкаренко // Птицеводство. – 2023. – №12. – С. 83-87.

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-12-83-87

Введение. Колибактериоз в птицеводстве занимает ведущее место в инфекционной патологии. Особенно актуальной проблема становится в случае ослабленной иммунной системы. Падеж птицы от колибактериоза составляет до 70% от всей птицы, павшей от зарегистрированных заболеваний [1]. Эпизоотологические исследования предполагают регулярное обследование поголовья птиц на наличие возбудителей инфекционных заболеваний [2]. Помимо видовой идентификации, необходимо проводить мониторинг циркулирующих бактериальных и вирусных генотипов на подвидовом

уровне. Такой мониторинг позволяет своевременно выявить штаммы с эпизоотологическим потенциалом. Если один и тот же генотип возбудителя начинает выявляться у разных особей, контактирующих друг с другом, можно сделать вывод о начале эпизоотии и необходимости срочного принятия ветеринарно-профилактических мер на данном сельскохозяйственном предприятии. Наряду с потенциально опасными штаммами, генотипирование часто выявляет эндемичные штаммы, т.е. бактерии, которые колонизируют отдельные особи и не способны к быстрому и широкому распространению

в популяции птиц. Такие штаммы при генотипировании показывают различные генотипы.

Скученное содержание птицы, несбалансированность рационов питания, стресс-факторы приводят к снижению иммунитета, что иногда проявляется в виде заболеваний, вызванных условно-патогенной микрофлорой. Типичным представителем последней является кишечная палочка (*Escherichia coli*), эндогенные штаммы которой при приобретении генов вирулентности могут вызывать у птиц эшерихиозы, проявляющиеся в виде поражения различных внутренних органов [3]. Часто ко-



Таблица 1. Последовательность нуклеотидов праймеров и условия проведения ПЦР

Наименование праймера	Последовательность нуклеотидов	Температура и время отжига	Температура и время элонгации
1254	CCG CAG CCA A	37°C, 15 сек	72°C, 120 сек
OPL-12	GCG CGG TAC T	37°C, 15 сек	72°C, 120 сек

либактериоз является секундарной инфекцией, иногда клиническое течение заболевания осложняется ко-инфекцией [4,5]. Имеются данные, что штаммы *E. coli*, выделенные от клинически здоровых птиц, могут нести гены вирулентности и представлять угрозу как животным, так и человеку [6]. Патогенез колибактериоза до конца не изучен в силу многочисленности факторов вирулентности у *E. coli* [7].

В настоящее время применяется много методов для генотипирования микроорганизмов; тем не менее, продолжается поиск новых, более эффективных методов [8]. Одним из простых и быстрых методов идентификации штаммов *E. coli* является метод с применением ПЦР со случайными праймерами (RAPD-PCR) [9,10].

Цель исследований – генотипировать 30 изолятов *E. coli*, выделенных от индеек, разделенных на три группы, и сравнить их генетические профили методом RAPD-PCR.

Материал и методика исследований. Бактериологические исследования биологического материала проводили в отделе микробиологии ВНИВИП. Из смывов с клоаки 35-дневных индюшат создаваемого среднего кросса (отцовская линия – образцы 1-10, материнская линия – образцы 11-20), а также из различных внутренних органов трех павших индюшат (образцы 21-30) на среде Эндо были получены бактериальные изоляты, которые по морфологическим, тинкториальным, культуральным и ферментативным свойствам соответствовали

E. coli. Объектом исследования служили образцы геномной ДНК, выделенные из чистых культур изолятов *E. coli*, культивированных на мясопептонном бульоне.

Предварительно клетки бульонной культуры *E. coli* осаждали центрифугированием при 3000g в микроцентрифуге, осадок суспендировали в буфере TES (50 мМ Трис-HCL, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl; pH 8,0). Суспензия инкубировалась в течение 30 мин после внесения лизоцима (конечная концентрация 2 мг/мл) при 37°C. Затем клетки лизировали путем добавления в смесь додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. Геномную ДНК *E. coli* выделяли с использованием фенольно-хлороформенного метода. Количество и качество выделяемой ДНК оценивали в спектрофотометре NanoDrop 2000™.

Генотипирование проводили с помощью метода RAPD-PCR с использованием ДНК-полимеразы Hot Start и двух праймеров – 1254 и OPL-12. Последовательности праймеров и условия амплификации представлены в табл. 1. Устанавливали количество циклов – 40, начальная денатурация ДНК и активация полимеразы – 95°C в течение 5 мин, затем на каждом цикле продолжительность денатурации была 15 сек при этой же температуре. Отжиг праймеров проводили также в течение 15 сек. По завершении всех циклов амплификации проводили инкубацию при температуре 72°C в течение 3 мин.

После проведения амплификации продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромидом этидия в буфере 1ХТАЕ. Устанавливали напряжение в 120 В, разделение фрагментов ДНК проводили в течение 2 ч. По окончании электрофореза гель помещали в систему гель-документации и производили фиксацию результатов.

Результаты исследований и их обсуждение. Генотипирование изолятов *E. coli* методом RAPD-PCR привело к формированию четко различимых фрагментов ДНК, число и распределение которых является характеристикой бактериальных штаммов (рис. 1). Праймер 1254 приводил к появлению большего числа фрагментов ДНК; кроме того, этот праймер выявил большее число полиморфизмов.

При анализе картины распределения фрагментов ДНК в группе изолятов, выделенных из клоаки здоровых индеек отцовской линии (дорожки 1-10), обращает на себя внимание идентичность профилей, за исключением изолятов №№3 и 10, которые заметно отличались как друг от друга, так и от остальных 8 идентичных изолятов (праймер 1254). Из этого можно сделать вывод, что у птиц отцовской линии доминирует один эндогенный штамм, присутствующий в желудочно-кишечном тракте и выделяемый с пометом. Использование праймера OPL-12 дает отличающуюся картину для изолятов №№4 и 10, в то время

как остальные 8 были одинаковыми.

Несколько другая картина наблюдалась у материнской линии, где у бактерий четко прослеживается более выраженное генетическое разнообразие. Например, одинаковыми были пары изолятов №№2 и 3, 11 и 18, 14 и 16. Остальные изоляты были уникальными, т.е. отличались по распределению амплифицированных фрагментов ДНК (праймер 1254). Праймер OPL-12 снова дал менее полиморфную картину, наиболее отличался от всех остальных изолятов №17, что также было характерным для этой бактерии и при использовании праймера 1254.

В группе изолятов, выделенных из биоматериала павших индеек (дорожки 21-30), обращает на себя внимание четкая кластеризация, проявляющаяся в виде небольших групп идентичных штаммов. Например, один кластер включал изоляты в дорожках №№23 и 24, другой – 25, 26 и 27, третий – 28 и 30. Выявились также и уникальные штаммы – №№21, 22 и 29.

Интересно, что из почки и легких одной и той же больной индейки выделялись разные штаммы кишечной палочки (дорожки №№21 и 22), а штаммы из сердца и печени этой особи (№№23 и 24) были идентичными, что свидетельствует о частичной генерализации инфекционного процесса. В случае другой особи из почки, легких и сердца (№№25, 26 и 27 соответственно) выделялся один бактериальный штамм (генерализация), в то время как крас-

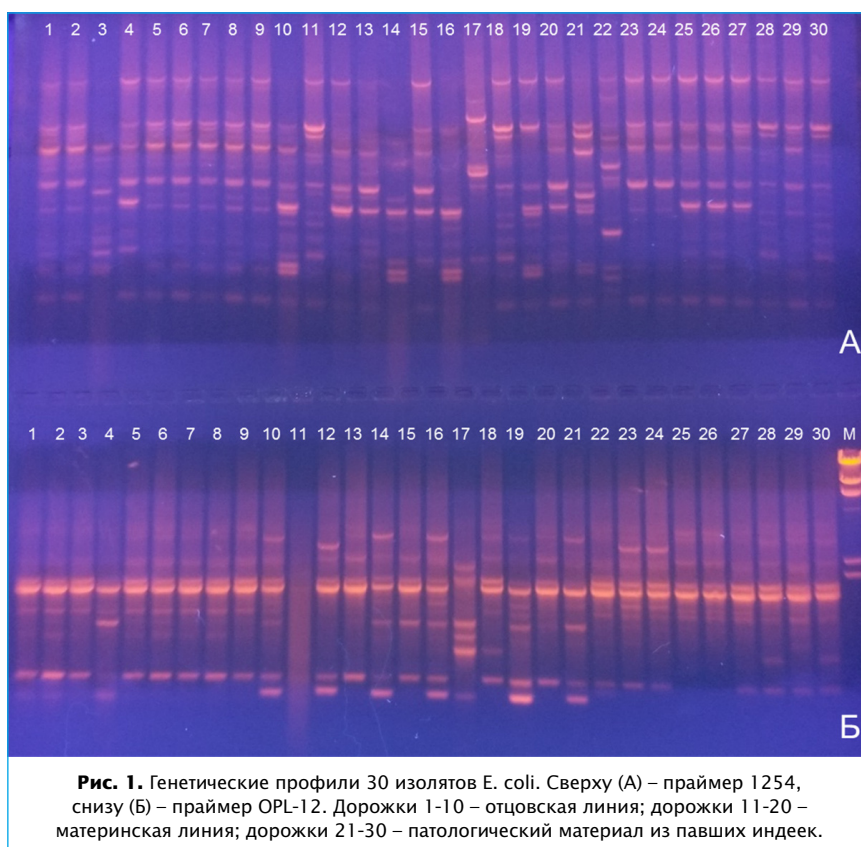


Рис. 1. Генетические профили 30 изолятов *E. coli*. Сверху (А) – праймер 1254, снизу (Б) – праймер OPL-12. Дорожки 1-10 – отцовская линия; дорожки 11-20 – материнская линия; дорожки 21-30 – патологический материал из павших индеек.

ный костный мозг этой особи был колонизирован другим уникальным штаммом (№28). Идентичность штаммов №№28 и 30, выделенных от разных индеек, свидетельствует о возможной передаче возбудителя от одной особи другой.

В ряде случаев отмечается идентичность штаммов, выделенных из клоаки здоровых индеек (дорожки 1-20) и органов заболевших особей (дорожки 21-30). Особенно наглядно это видно на примере группы идентичных штаммов из клоаки индеек отцовской линии (все кроме №№3 и 10, праймер 1254) и штаммов в дорожках №№23 и 24 (из сердца и печени заболевшей индейки).

Заключение. Таким образом, если изученные штаммы были причиной колибактериоза у индеек, то можно сделать вывод, что заболевание определяется разными штаммами, и перезаражения между особями носят единичный характер, т.е. эпизоотический процесс не наблюдается. Случаи заболевания колибактериозом, в основном, определяются эндогенными штаммами бактерий. У заболевших индеек в разных органах могут присутствовать отличающиеся бактериальные штаммы.

Работа поддержана бюджетным финансированием, номер госрегистрации 121021600202-7.

Литература / References

1. Нуралиев, Е.Р. Лечебно-профилактические мероприятия при колибактериозе в промышленном птицеводстве / Е.Р. Нуралиев, К.Ж. Кушалиев // Известия Самарской ГСХА. - 2021. - №2. - С. 51-57.
2. Новикова, О.Б. Контроль бактериальных болезней на индейководческих предприятиях / О.Б. Новикова, М.А. Павлова // Птица и птицепродукты. - 2017. - №6. - С. 22-24.





3. Лаишевцев, А.И. Клиническое исследование комбинированного коли-сальмонеллезного бактериофага на индейках / А.И. Лаишевцев, П.Н. Шагин, Э.Р. Зилькарнеев, В.А. Савинов, А.В. Хабарова, А.В. Капустин // Ветеринария и кормление. - 2022. - №6. - С. 51-54. doi: 10.30917/АТТ-ВК-1814-9588-2022-6-13
4. Рузина, А.В. Ассоциированное течение сальмонеллеза и колибактериоза у птицы в условиях промышленного выращивания / А.В. Рузина, Н.В. Васюков, Т.Н. Рождественская, С.В. Панкратов // Птица и птицепродукты. - 2023. - №1. - С. 49-52. doi: 10.30975/2073-4999-2023-25-1-49-52
5. Шестаков, В.А. Патоморфология печени кур при сочетанном течении эшерихиоза и сальмонеллтоза / В.А. Шестаков // Вет. врач. - 2016. - №5. - С. 13-16.
6. Stromberg, Z.R. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health / Z.R. Stromberg, J.R. Johnson, J.M. Fairbrother, J. Kilbourne, A. Van Goor, R. Curtiss Rd, M. Mellata // PLoS One. - 2017. - V. 12. - No 7. - P. e0180599. doi: 10.1371/journal.pone.0180599
7. Guabiraba, R. Avian colibacillosis: still many black holes / R. Guabiraba, C. Schouler // FEMS Microbiol. Lett. - 2015. - V. 362. - No 15. - P. fmv118. doi: 10.1093/femsle/fmv118
8. Kotłowski, R. New approaches for *Escherichia coli* genotyping / R. Kotłowski, K. Grecka, B. Kot, P. Szweda // Pathogens. - 2020. - V. 9. - No 2. - P. 73. doi: 10.3390/pathogens9020073
9. Chansiripornchai, N. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis / N. Chansiripornchai, P. Ramasoota, J. Sasipreeyajan, S.B. Svenson // Vet. Microbiol. - 2001. - V. 80. - No 1. - P. 75-83. doi: 10.1016/s0378-1135(00)00380-1
10. Ndegwa, E. Shiga toxin subtypes, serogroups, phylogroups, RAPD genotypic diversity, and select virulence markers of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains from goats in Mid-Atlantic US / E. Ndegwa, D. O'Brien, K. Matthew, Z. Wang, J. Kim // Microorganisms. - 2022. - V. 10. - No 9. - P. 1842. doi: 10.3390/microorganisms10091842

Сведения об авторах:

Тыщенко В.И.: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; tinatvi@mail.ru. **Овcharова Е.С.:** кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник – зав. отделом микробиологии; ovcharova_el@bk.ru. **Терлецкий В.П.:** доктор биологических наук, профессор каф. естествознания и географии; valeriter@mail.ru. **Сыворотко Е.В.:** младший научный сотрудник; lena_gvl@mail.ru. **Шинкаренко Л.А.:** кандидат сельскохозяйственных наук, зам. директора по науке; skzospzooteh@yandex.ru. Статья поступила в редакцию 12.10.2023; одобрена после рецензирования 13.11.2023; принята к публикации 21.11.2023.

Research article

Comparative Efficiency of Two RAPD-PCR Primers in Genotyping of *Escherichia coli* Isolates Obtained from Turkeys

Valentina I. Tyshchenko¹, Elena S. Ovcharova¹, Valery P. Terletsky², Elena V. Syvorotko¹, Lidia A. Shinkarenko³

¹All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science - branch of the Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry"; ²Pushkin Leningrad State University;

³Center for Genetics and Breeding "North Caucasian Zonal Poultry Experimental Station" - branch of the Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry"

Abstract. The aim of the work was to identify 30 *E. coli* strains isolates obtained from three groups of turkeys (from paternal and maternal lines of the newly created middleweight cross, and from pathological materials of 3 dead individuals). The identification of genetic profiles of individual isolates was performed by RAPD-PCR genotyping method with the use of two primers. Primer 1254 revealed a more polymorphic pattern in the number and distribution of amplified DNA fragments as compared to primer OPL-12. In the group of individuals of the maternal line (10 isolates) the greater interindividual diversity of the pathogen was found as compared to

the group of the individuals from paternal line (10 isolates) with both primers used. In some cases the identity of strains isolated from the cloaca of healthy turkeys, primarily of the paternal line, and from different organs of dead individuals was noted. It was concluded that the RAPD-PCR method allows for the identification of the specific features of the genetic profiles of the amplified DNA fragments in three compared groups of turkeys.

Keywords: *Escherichia coli, turkeys, bacterial isolates, genotyping, primers.*

For Citation: Tyshchenko V.I., Ovcharova E.S., Terletsky V.P., Syvorotko E.V., Shinkarenko L.A. (2023) Comparative efficiency of two RAPD-PCR primers in genotyping of *Escherichia coli* isolates obtained from turkeys. *Ptitsevodstvo*, 72(12): 83-87. (in Russ.)

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-12-83-87

(For references see above)

Authors:

Tyshchenko V.I.: Cand. of Biol. Sci., Senior Research Officer; tinatvi@mail.ru. **Ovcharova E.S.:** Cand. of Vet. Sci., Lead Research Officer, Head of Dept. of Microbiology; ovcharova_el@bk.ru. **Terletsky V.P.:** Dr. of Biol. Sci., Prof. of Dept. of Natural History and Geography; valeriter@mail.ru. **Syvorotko E.V.:** Junior Research Officer; lena_gvl@mail.ru. **Shinkarenko L.A.:** Cand. of Agric. Sci., Deputy Director for Science; skzospzooteh@yandex.ru. Submitted 12.10.2023; revised 13.11.2023; accepted 21.11.2023.

© Тыщенко В.И., Овчарова Е.С., Терлецкий В.П., Сыворотко Е.В., Шинкаренко Л.А., 2023

