

Сельскохозяйственный журнал. 2022. №4 (15). С.136-147
Agriculturaljournal. 2022; 15 (4). P.136-147

Зоотехния и ветеринария

Научная статья

УДК 636.592/082.25

DOI: 10.25930/2687-1254/015.4.15.2022

МЕТОД RAPD-PCR ПРИ ГЕНОТИПИРОВАНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ ИНДЕЕК

Алексей Витальевич Шепляков¹, Лидия Александровна Шинкаренко¹,
Юрий Васильевич Титов¹, Валерий Павлович Терлецкий²,
Валентина Ивановна Тыщенко², Елена Сергеевна Овчарова³

¹СГЦ «СКЗОСП» - филиал ФГБНУ ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Россия, Обильное,
e-mail: skzosp@yandex.ru

²Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных. Россия, Санкт-Петербург, e-mail: vaieriter@mail.ru

³Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал ФНЦ ВНИТИП РАН. Россия, Санкт-Петербург, e-mail: ovcharova__el@bk.ru

Аннотация. Постановление Правительства Российской Федерации от 25 августа 2017 г. № 996 «Об утверждении Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 годы» обуславливает проведение научно-исследовательской работы СГЦ «СКЗОСП», направленной на профилактику и борьбу с инфекционными бактериальными заболеваниями птиц, наносящими огромный экономический ущерб отрасли. Эта работа соответствует поставленным задачам комплексной целевой программы Российской Федерации по приоритетному направлению «Птицеводство». Создание отечественных конкурентоспособных линий и кроссов индеек предполагает надежную систему защиты поголовья, которая может быть основана на применении современных молекулярно-генетических методов, включающих генотипирование и ПЦР-тесты на антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов. Исследования основаны на использовании метода генотипирования патогенных микроорганизмов в области бактериологии, использующего ПЦР для выявления наличия генов, определяющих антибиотикорезистентность у микроорганизмов. Применение современных методов генотипирования позволяет решить вопросы эпизоотологического плана. На производственной базе СГЦ «СКЗОСП» в 2022 году были отобраны пробы из падежа индеек для RAPD-PCR генотипирования – быстрого метода, основанного на использовании случайных коротких праймеров ERIC1, 2 и M13. Получены культуры бактериальных изолятов в дифференциально-диагностических средах для подтверждения видовой принадлежности. Выделена геномная ДНК от бактерий вида *Escherichiacoli*. Проведен поиск генов антибиотикорезистентности у данного вида патогенов индеек. Установлен факт широкого распространения антибиотикорезистентности в изучаемой группе бактериальных изолятов. Данный метод позволил скорректировать схему ветеринарной профилактики для индеек и рекомендован к использованию в индейководческих хозяйствах.

Ключевые слова: индейки, пробы и бактериальные изоляты, метод RAPD-PCR,

праймеры, ветсхема

Для цитирования. Метод RAPD-PCR при генотипировании бактериальных изолятов индеек / А.В. Шепляков, Л.А. Шинкаренко, Ю.В. Титов, В.П. Терлецкий, В.И.Тыщенко, Е.С. Овcharова // Сельскохозяйственный журнал. 2022. № 4 (15). С.136-147. DOI: 10.25930/2687-1254/015.4.15.2022

Zootechny and veterinary science

Originalarticle

RAPD-PCR TECHNIQUE FOR GENOTYPING OF TURKEY BACTERIAL ISOLATES

Aleksei V. Shepliakov¹, Lidiia A. Shinkarenko¹, Yurii V. Titov¹, Valerii P. Terletskii², Valentina I. Tyshchenko², Elena S. Ovcharova³

¹SGC “North Caucasus ZESP” – branch of the FSBSI Federal Scientific Center “ARRTPI” RAS, Russia, Obilnoe, e-mail: skzosp@yandex.ru

² Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding. Russia, St. Petersburg, e-mail: vaieriter@mail.ru

³All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science – branch of the Federal Scientific Center “ARRTPI” RAS. Russia, St. Petersburg, e-mail: ovcharova__el@bK.ru

Abstract. Decree of the Government of the Russian Federation dated 25 August, 2017 No. 996 “On approval of the Federal scientific and technical program for the development of agriculture for 2017-2025” determines the research of the SGC “North Caucasus ZESP”, which was aimed at preventing and control of infectious bacterial diseases of birds, which cause huge economic damage to the industry. This study corresponds to the tasks, which were set by the Integrated Target Program of the Russian Federation in the priority area “Poultry farming”. The creation of domestic competitive lines and crosses of turkeys requires a reliable system of livestock protection, which can be based on the use of modern molecular and genetic techniques, including genotyping and PCR tests for antibiotic resistance of pathogenic microorganisms. The studies are based on the use of the genotyping method of pathogenic microorganisms in bacteriology, using PCR to detect the presence of genes that determine antibiotic resistance in microorganisms. The use of modern techniques of genotyping makes it possible to solve epizootological issues. In 2022, at the production base of the SGC “North Caucasus ZESP”, samples were taken from the mortality of turkeys for RAPD-PCR genotyping – a fast technique based on the use of random short primers ERIC 1, 2 and M13. Cultures of bacterial isolates were obtained in differential diagnostic media to confirm the species identity. Genomic DNA was isolated from bacteria of the species *Escherichia coli*. A search for antibiotic resistance genes in this type of turkey pathogen was carried out. The fact of widespread antibiotic resistance in the studied group of bacterial isolates was established. This technique made it possible to correct the scheme of veterinary preventive measures for turkeys and is recommended for use in turkey farms.

Key words: turkeys, samples and bacterial isolates, RAPD-PCR technique, primers, vet scheme

For citation: RAPD-PCR technique for genotyping of turkey bacterial isolates / A.V. Shepliakov, L.A. Shinkarenko, Y.V. Titov, V.P. Terletskii, V.I. Tyshchenko, E.S. Ovcharova // Agricultural journal. 2022; 15 (4). P.136-147.

DOI: 10.25930/2687-1254/015.4.15.2022

Введение. Актуальность исследований определяется необходимостью быстро выявлять источники инфекции [1, 2] и идентифицировать штаммы микроорганизмов-патогенов индеек. В птицеводстве инфекционные заболевания, прежде всего колибактериоз, несут особую угрозу. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов наиболее актуальна для отрасли птицеводства. Снижение данной проблемы достигалось как контролируемым применением антибиотиков, так и использованием генотипирования в профилактических целях [3, 4, 5]. Необходимы систематический мониторинг за антимикробной резистентностью и регулярное проведение генотипирования циркулирующих в индейководстве микроорганизмов. Одним из путей решения данной проблемы является разработка системы контроля бактериальных болезней в условиях сельскохозяйственного производства с использованием быстрой диагностической процедуры на основе RAPD-PCR.

Тестирование микроорганизмов на чувствительность к антибиотикам как традиционным методом индикаторных дисков, так и с использованием ПЦР-тестирования позволяет получить достоверные данные не только по наличию факторов резистентности микроорганизмов, но и по ее генетической природе [6, 7, 8, 9].

Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам занимает 5-6 суток, начиная от первичного посева биоматериала, заканчивая получением результатов исследований – информации о том, к каким антибактериальным препаратам чувствителен данный микроорганизм/ассоциация микроорганизмов. При возникновении эпизоотической вспышки очень важно как можно быстрее определить, какие препараты будут терапевтически и экономически эффективны в каждом конкретном случае. Поэтому разработка экспресс-метода определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам – одна из первоочередных задач не только в индейководстве, но и в других отраслях птицеводства.

Использование современных методов генотипирования позволяет ответить на вопросы эпизоотологического плана. Эти сведения необходимы для предотвращения новых вспышек заболевания и считаются важной частью системы ветеринарно-санитарных мероприятий.

Цель и задачи исследований. Определение антибиотикорезистентности патогена *E.coli*, выделяемой у индеек стада СГЦ «СКЗОСП», с помощью полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами с выявлением генетических детерминант устойчивости и составление схем ветпрофилактики и биозащиты, подбор условий для выявления методом RAPD-PCR генетических вариантов патогенных штаммов *E.coli*– актуального патогена птиц промышленных пород. В рамках достижения цели было выделение геномной ДНК микроорганизмов из биоматериала, полученного от индеек. Также впервые апробирован новый метод на группах бактериальных изолятов. Проведено определение резистентности с использованием индикаторных дисков, созданы схемы ветеринарной профилактики и биозащиты для индеек двух племенных статусов СГЦ «СКЗОСП» – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН.

Материал и методы исследований. Исследования проводились в 2022 году на производственной базе СГЦ «СКЗОСП» – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН. Совместно с исполнителями темы от ВНИВИП – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН проведено клиническое обследование всего птицепоголовья индеек, проанализированы меры биобезопасности в хозяйстве, исследована схема профилактических и противозооотических мероприятий на 2022 год, осуществлено патологоанатомическое вскрытие трупов ин-

дуют 31-дневного возраста, отобран патологический материал для дальнейшего бактериологического исследования. Для бактериологических исследований были взяты пробы внутренних органов в транспортную среду Кэри-Блэйра: печени, почки, легкого, селезенки, тонкого кишечника, слепых отростков толстого отдела кишечника.

После транспортировки все пробы были пересеяны на питательную среду для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – мясопептонный бульон для дальнейшего термостатирования при температуре 37,0 °С.

Через 24 часа сделали пересевы на дифференциально-диагностические среды. Выделенные на дифференциально-диагностических средах культуры в дальнейшем подвергались культурально-биохимическим исследованиям и определению чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона. Объектом исследования являлись изоляты бактерии *Escherichiacoli*, выделенные из органов индеек. Далее в рамках выполнения темы госзадания в 2022 году были изучены генетические варианты кишечной палочки из различных органов индеек стада СГЦ «СКЗОСП». Постоянно проводится работа по разработке методов генотипирования на основе использования полимеразной цепной реакции. К числу таких быстрых методов генотипирования относят RAPD-PCR, основанный на использовании случайных коротких праймеров.

Новизна исследований, проведенных в 2022 году, определялась постановкой актуальной задачи в современной превентивной ветеринарии, а именно: подобрать наиболее информативные праймеры для RAPD-PCR, которые разрешат эффективно проводить генотипирование штаммов кишечной палочки. Исследования позволили проводить генотипирование микроорганизмов без использования дорогостоящих технологий секвенирования геномов и проведения ПЦР в реальном времени. Был проведен литературный поиск оптимальных праймеров, проанализированы данные генотипирования, дискриминационная способность, количество и качество амплифицируемых фрагментов ДНК. В результате поиска определены прямой и обратный праймеры ERIC, использующиеся для амплификации консервативного участка генома энтеробактерий разных видов (ERIC1 и ERIC2), а также праймер M13, выявляющий минисателлитную ДНК у бактерий и животных.

Механизм обнаружения вариабельности геномной ДНК методом ПЦР с ERIC-праймерами заключался в амплификации участка ДНК, имевшего разную длину у отдельных штаммов бактерий. RAPD-праймеры раскрывали различия в ДНК на уровне видов, иногда штаммов лактобактерий. Механизм детекции различий заключался в разных местах связывания праймеров у разных видов и штаммов, что приводило к амплификации фрагментов ДНК разной длины. Такой же механизм имелся и в работе универсального праймера M13.

Все отобранные праймеры были протестированы, чтобы исключить ошибки в последовательности нуклеотидов, затем проверены по базе данных NCBI для подтверждения их специфичности в отношении штаммов кишечной палочки и дополнительного контроля последовательности нуклеотидов.

Условия ПЦР для праймеров ERIC и M13: 95°C – 3 мин, потом 45 циклов: 95°C – 15 сек., 37°C – 15 сек., 72°C – 60 сек., в конце 72°C – 3 мин.

После завершения ПЦР образцы переносили в лунки 1,5%-ногоагарозного геля и проводили электрофорез в течение 3 часов при напряжении 100 В (примерно 5 В/см). В гель предварительно вносили бромид этидия для визуализации полос свечения ДНК. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали GeneRuler (ThermoFisher™).

В процессе выполнения исследования нами учитывались следующие показатели: число выращенных бактериальных культур (изолятов), число выявленных видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, выявление генетических детерминант устойчивости микрофлоры индеек с использованием праймеров. Оценивалось распространённость антибиотикорезистентных штаммов, созданы ветеринарно-профилактические и противозооотические схемы для индеек двух племенных статусов СГЦ «СКЗОСП» – филиала ФНЦ «ВНИТИП» РАН.

Результаты исследований и их обсуждение. В образцах из печени, почки, легкого, селезенки, кишечника были выделены культуры *E.coli* (фото 1, 2).

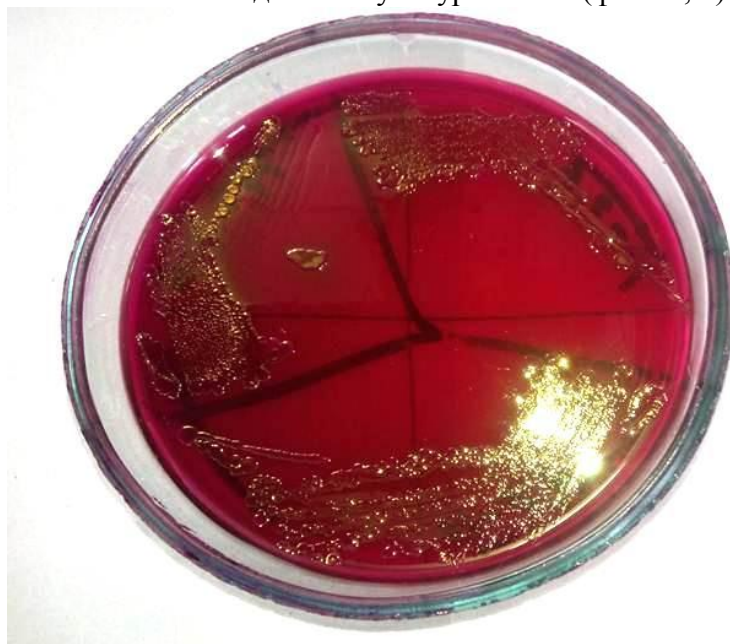


Фото 1. Рост культур *Escherichia coli* на агаре Эндо с выраженным металлическим блеском

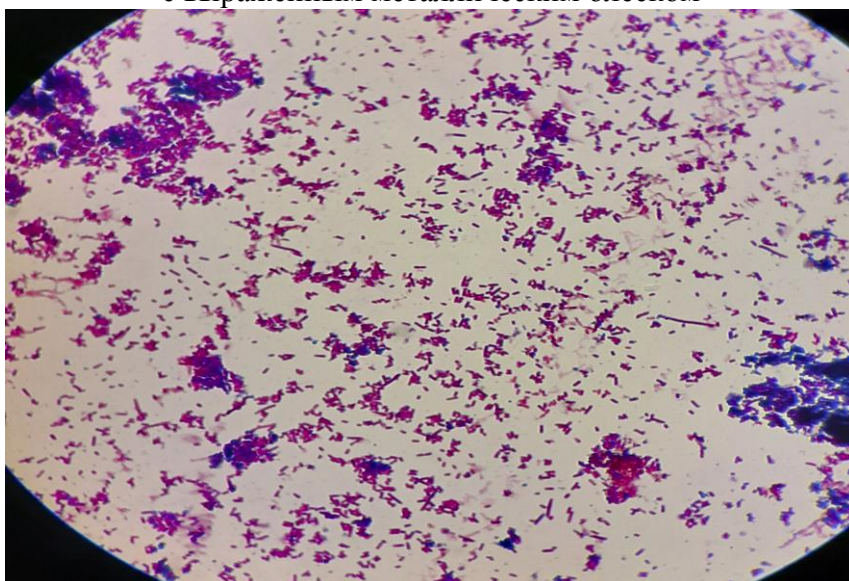


Фото 2. Микроскопия мазка. Культура *Escherichia coli*, выделенная из печени индейки

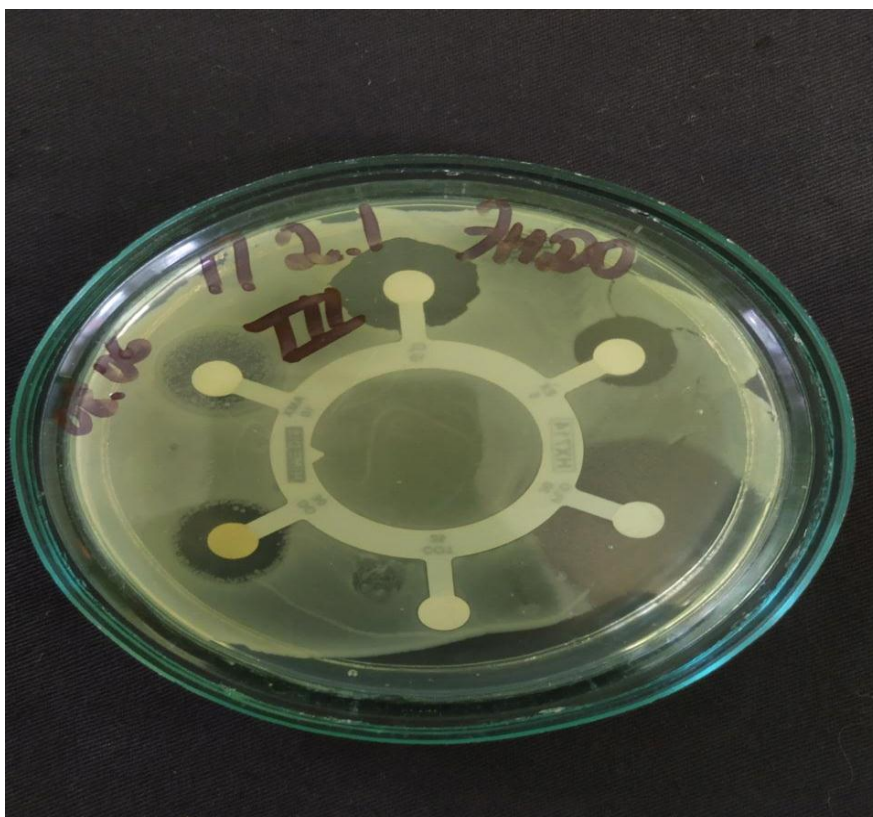


Фото 3. Определение чувствительности культуры *E.coli* методом дисков на среде Мюллера-Хинтона (флорфеникол, энрофлоксацин, амоксициллин, колистин, котримоксазол, доксициклин гидрохлорид)

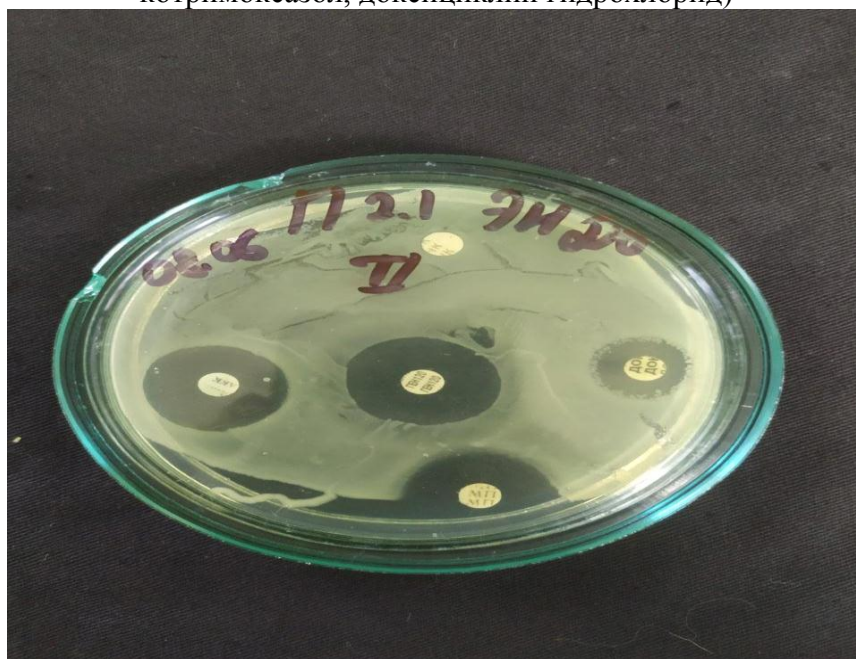


Фото 4. Определение чувствительности культуры *E.coli* методом дисков на среде Мюллера-Хинтона (гентамицин, доксициклин, меропенем, амоксициллин/клавулановая кислота, нолидиксовая кислота)

Все выделенные культуры *E.coli* в количестве 10 парных образцов были переданы для дальнейшего генотипирования в лабораторию молекулярной генетики (таблица 1).

Таблица 1

Бактериальные изоляты и органы индеек,
от которых были выращены культуры *E.coli*

№ п/п	№ индейки	Орган	Патоген
1	1	печень	<i>E.coli</i>
2	1	почка	<i>E.coli</i>
3	1	легкое	<i>E.coli</i>
4	1	селезенка	<i>E.coli</i>
5	1	кишечник	<i>E.coli</i>
6	2	печень	<i>E.coli</i>
7	2	почка	<i>E.coli</i>
8	2	легкое	<i>E.coli</i>
9	2	селезенка	<i>E.coli</i>
10	2	кишечник	<i>E.coli</i>

Результаты исследований по определению чувствительности выделенных культур *E.coli* из различных органов индеек к антибактериальным препаратам показали, что культуры чувствительны к колистину, флорфениколу, доксицилину, амоксициллин/клавулановой кислоте, гентамицину, меропенему, фосфомицину; резистентны к котримазолу, налидиксовой кислоте, тетрациклину, пefлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину; пограничны к энрофлоксацину, амоксициллину.

Были испытаны шесть праймеров RAPD-PCR на предмет пригодности для выявления полиморфизма по числу и распределению амплифицированной ДНК. Отдельные праймеры не приводили к амплификации, другие амплифицированные фрагменты не отличались между бактериальными изолятами, то есть генетический полиморфизм между штаммами отсутствовал. Только праймеры (прямой и обратный) для выявления полиморфизма в участке ERIC1, 2 показали выраженный полиморфизм. Кроме этого, универсальный праймер M13 также приводил к формированию полиморфных генетических профилей в геномах кишечной палочки. При рекомендованной в литературе температуре отжига праймеров – 52°C– накопления амплификата не происходило, и это потребовало снижения температуры до 37°C. Оптимизированные условия проведения реакции представлены в таблице 2. До первого цикла ПЦР проводили продолжительную первичную денатурацию при 95°C 3 мин., а после амплификации продолжительный этап элонгации – при 72°C – 3 мин.

Таблица 2

Праймеры и условия проведения ПЦР-генотипирования

Наименование праймера	Последовательность нуклеотидов	T денатурации, °C	T отжига, °C	T элонгации, °C
ERIC1	ATGTAAGCTCCTGGG GATTCAC	95°C–15 сек.	37°C – 15 сек.	72°C – 60 сек.
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGG GTGAGCG	95°C – 15 сек	37°C – 15 сек.	72°C – 60 сек.
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	95°C –15 сек.	37°C – 15 сек.	72°C – 60 сек.

Было изучено 10 парных изолятов *E.coli*, выделенных от павших индеек. На рисунках 1 и 2 показаны результаты генотипирования этих изолятов, проявивших полиморфизм с праймерами ERIC1, 2 (дорожки 1–10 вверху, рисунок 1) и праймером M13 (дорожки 1–10 внизу, рисунок 1). Размер амплифицированных фрагментов ДНК варьировал от 100 до 1500 пар оснований ДНК. Дорожки 1–5 содержали изоляты индейки №1. Генотипы *E.coli* из печени №1 и почки №2 существенно отличались друг от друга. Генетические варианты патогена, выделенные из легкого и селезенки индейки №1, были идентичны по обоим праймерам ERIC и M13 (электрофоретические дорожки 3 и 4), что свидетельствовало о циркулировании одного штамма в пределах одной особи.

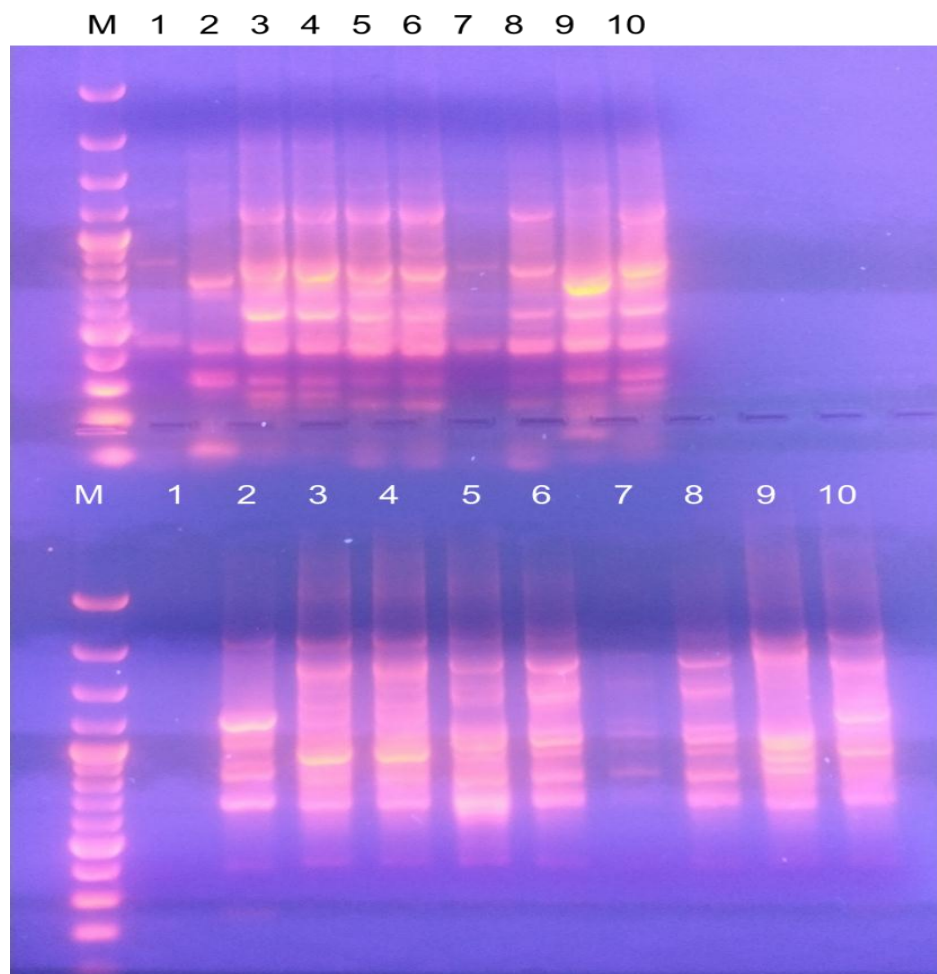


Рисунок 1. Результаты генотипирования 10 изолятов *E.coli* методом RAPD-PCR с праймерами ERIC (вверху) и M13 (внизу)

Распределение фрагментов ДНК в дорожке 5 кишечника индейки №1 незначительно отличалось от профиля в дорожках 3 и 4. Интересно, что генотип патогена в дорожке 5 был идентичен генотипу в дорожке 6, фрагменты ДНК в которой формировались из образца от индейки №2. Данное наблюдение подтвердилось и с использованием праймера M13, что означало передачу инфекции между этими двумя особями. Нужно отметить, что генетические профили в дорожках 7, 8, 9 и 10 существенно отличались друг от друга, несмотря на то, что изоляты происходили от одной особи – индейки №2.

Результаты генотипирования методом RAPD проводились дважды, и в обоих случаях результаты оказались одинаковыми, что говорит о воспроизводимости подобранных условий проведения реакции амплификации фрагментов ДНК.

Осуществление генотипирования с помощью универсального праймера M13 не привело к формированию различных фрагментов, поэтому реакция с остальными изолятами не проводилась.

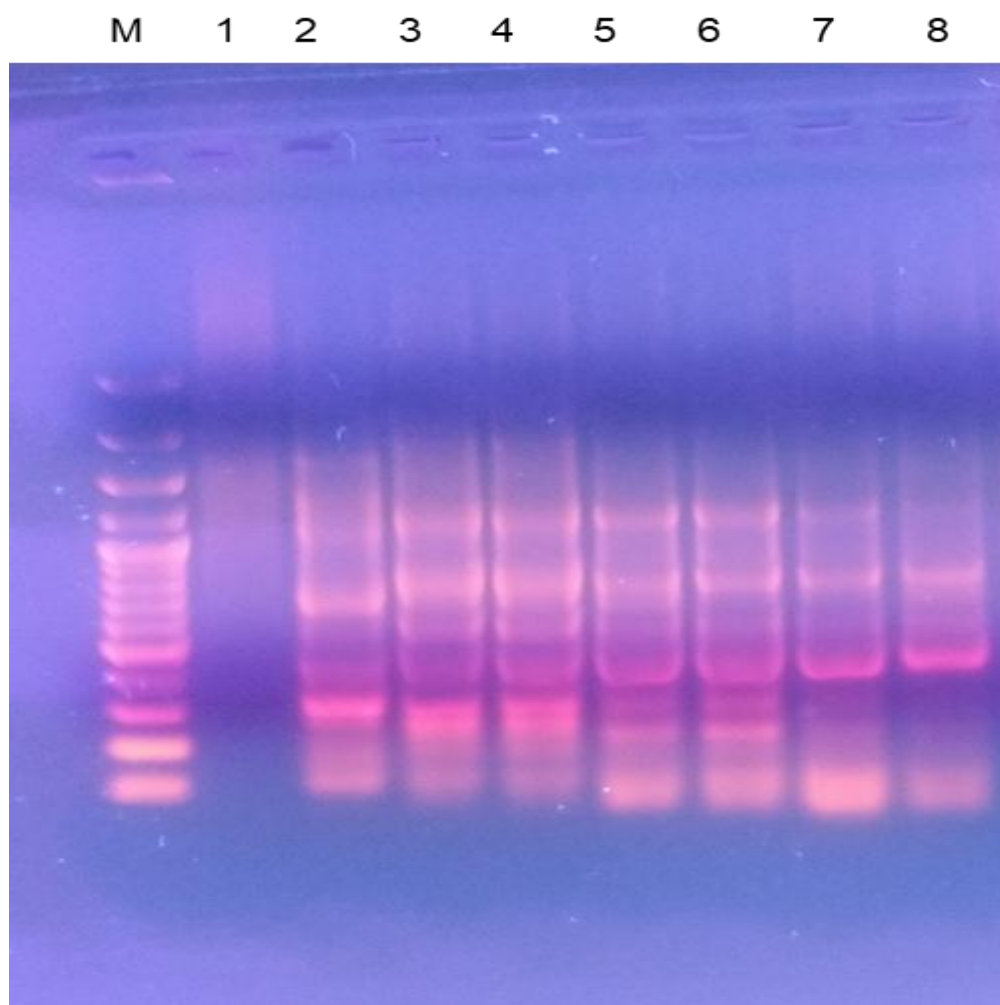


Рисунок 2. Результаты повторного генотипирования 8 изолятов *E.coli* методом RAPD-PCR с праймерами ERIC

Заключение. В 2022 году была продолжена работа по генотипированию изолятов *E.coli*, выделенных из разных органов индеек новым методом RAPD-PCR генотипирования с использованием праймеров ERIC1, 2 и M13. Метод можно эффективно использовать для нахождения инфекции. В случае совпадения всех фрагментов в геле возможно утверждать о циркуляции возбудителя в группе индеек либо о взятии биоматериала из разных органов одной особи. Данный метод вправе рекомендовать для практического применения и для локализации источника патогенов бактериальной природы. По итогам выполнения НИР была проведена апробация RAPD-PCR метода, предложенного для практического использования как молекулярно-генетический метода выявления генов, определяющих антибиотикорезистентность, основанного на исполь-

зовании специфических праймеров в ПЦР. По итогам работы над образцами от индеек созданы ветеринарно-профилактические и противоэпизоотические схемы для отечественных индеек по двум племенным статусам. Результаты работы, показавшие распространение антибиотикорезистентности у промышленно используемых и генофондных индеек ЦКП БРК, опубликованы в двух журналах, индексируемых в базах данных РИНЦ и Skopus [10, 11, 12].

Благодарности. Работа поддержана бюджетным финансированием по теме под номером госрегистрации 121021600202-7.

Список источников

1. Van Belkum. Guidelines for the validation and application of typing methods for the use in bacterial epidemiology // Clin. Microbial. Infect. 2007. V/13. P.1-46.
2. Жебрун А.Б., Мукомолов С.Л., Нарвская О.В. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. №4. С. 28–36.
3. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций / О.С. Бондарева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, А.И. Абуева, Ю.О. Муратова, В.А. Антонов // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. №1. С.34–44.
4. Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of Salmonella Kentucky isolates in Tunisia / Y. Turki, I. Mehri, I. Fhoula, A. Hassen, H. Ouzari // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V.30. No1. P. 87-98.
5. Wang K., Petersen M., Wang S., Lu X. Detection and characterization of antibiotic-resistant bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy // Nanomaterials (Basel). 2018. V.8. No10. pii: E762.
6. Давидович Н.В., Кукалевская Н.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65. №6. С.387–393.
7. Щепеткина С.В. Биобезопасность – залог здоровья птицы // Животноводство России. – 2015. № 2. С. 25.
8. Генотипирование патогенных бактерий – инструмент контроля эпизоотической ситуации. / В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко, О.Б. Новикова, Л.А. Шинкаренко. //Аграрная Россия, 2020. №8. С. 3–7.
9. Фисинин В.И. Стратегические тренды развития мирового и отечественного птицеводства. Ветеринария и биобезопасность в птицеводстве. // Zootechnica international. Том 15. № 92, июль/август. 2021. С. 34.
10. Применение ПЦР-генотипирования бактериальных изолятов в индейководстве. / А.В. Шепляков, Л.А. Шинкаренко, Ю.В. Титов, В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко, О.Б. Новикова // Сельскохозяйственный журнал, 2022. № 1(15). С. 85–94.
11. Terletskiy V., Tyshchenko V., Novikova O., Shinkarenko L. Application of the double digests selective label typing technique for bacteria genotyping. Lecture notes in networks and sys-

tems ISSN: 2367-3370eISSN: 2367-3389Том: 354 LNNS Год: 2022. С.964-972.

12. Продуктивные и популяционно-генетические показатели индеек генофонда / В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко, В.А. Погодаев, И.В. Романенко, А.В. Шепляков, Л.А. Шинкаренко // Сельскохозяйственный журнал. 2022 № 1(15). С.69–77. DOI 10.25930/2687-1254/009.1.15.2022.

References

1. Van Belkum. Guidelines for the validation and application of typing methods for the use in bacterial epidemiology / Van Belkum // Clin. microbial. Infect.-2007.V/13.P.1-46.
2. Zhebrun A.B., Mukomolov S.L., Narvskaya O.V. Genotyping and molecular marking of bacteria and viruses in the epidemiological surveillance of priority infections / Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2011. No. 4. pp. 28–36.
3. Bondareva O.S. Modern approaches to genotyping of pathogens of especially dangerous infections / O.S. Bondareva, S.S. Savchenko, G.A. Tkachenko, A.I. Abueva, Y.O. Muratova, V.A. Antonov // Epidemiology and infectious diseases. 2014. No. 1. pp.34–44.
4. Turki, Y. Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of Salmonella Kentucky isolates in Tunisia / Y. Turki, I. Mehri, I. Fhoula, A. Hassen, H..Ouzari // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V.30. No1. P. 87-98.
5. Wang, K. Detection and characterization of antibiotic-resistant bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy / K. Wang , S. Li, M. Petersen, S. Wang, X. Lu // Nanomaterials (Basel).2018 . V.8. No10. pii: E762.
6. Davidovich N.V., Kukalevskaya N.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A. Basic principles of the evolution of antibiotic resistance in bacteria (literature review) // Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2020. V. 65. No. 6. pp.387–393.
7. Shchepetkina, S.V. Biosafety is a guarantee of bird health // Animal Husbandry of Russia. – 2015. No. 2. P. 25.
8. Terletskii V.P., Tyshchenko V.I., Novikova O.B., Shinkarenko L.A. Genotyping of pathogenic bacteria is a tool for controlling the epizootic situation. Agrarian Russia, 2020. No. 8. pp. 3–7.
9. Fisinin V.I. Strategic trends in the development of global and domestic poultry farming. Veterinary medicine and biosafety in poultry farming. Zootechnica international, Vol. 15, No. 92, July/August 2021. p. 34.
10. Application of PCR genotyping of bacterial isolates in turkey breeding. / A.V. Sheplyakov, L.A. Shinkarenko, Y.V. Titov, V.P. Terletskii, V.I. Tyshchenko, O.B. Novikova // Agricultural Journal, 2022. No. 1(15). pp. 85–94.
11. Terletskiy V., Tyshchenko V., Novikova O., Shinkarenko L. Application of the double digests selective label typing technique for bacteria genotyping. Lecture notes in networks and systems ISSN: 2367-3370eISSN: 2367-3389Volume: 354 LNNS Year: 2022. P.964-972.

12. Productive and population-genetic indicators of turkeys of new gene pool / V.P. Terletskii, V.I. Tyshchenko, V.A. Pogodaev, I.V. Romanenko, A.V. Sheplyakov, L.A. Shinkarenko // Agricultural Journal. 2022 No. 1(15). pp.69–77. DOI 10.25930/2687-1254/009.1.15.2022.

Информация об авторах

А.В. Шепляков – директор. Тел.: 8-918-792-01-97, e-mail: skzosp@yandex.ru
Л.А. Шинкаренко – кандидат сельскохозяйственных наук, заместитель директора по научной работе. Тел.: 8-928-343-97-71, e-mail: skzospzooteh@yandex.ru
Ю.В. Титов – научный сотрудник отдела ветеринарии. Тел.: 8-928-343-97-71, e-mail: skzosplab@yandex.ru
В.П. Терлецкий – доктор биологических наук, профессор. Тел.: 8-921-558-79-57, e-mail: valeriter@mail.ru
В.И. Тыщенко – кандидат биологических наук. Тел.: 8-921-558-79-57, e-mail: tinatvi@mail.ru
Е. С. Овчарова – кандидат ветеринарных наук. Тел.: 8-911-269-99-90, e-mail: ovcharova__el@bK.ru

Information about the authors

A.V. Shepliakov – Director. Tel.: 8-918-792-01-97, e-mail: skzosp@yandex.ru
L.A. Shinkarenko – Candidate of Agricultural Sciences, Deputy Director for Science. Tel: 8-928-343-97-71, e-mail: skzospzooteh@yandex.ru
Y.V. Titov – Researcher, Veterinary Department. Tel.: 8-928-343-97-71, e-mail: skzosplab@yandex.ru
V.P. Terletskii – Doctor of Biological Sciences, Professor. Tel.: 8-921-558-79-57, e-mail: valeriter@mail.ru
V.I. Tyshchenko – Candidate of Biological Sciences. Tel.: 8-921-558-79-57, e-mail: tinatvi@mail.ru
E. S. Ovcharova – Candidate of Veterinary Sciences. Tel.: 8-911-269-99-90, e-mail: ovcharova__el@bK.ru

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Authors contribution: All authors have made an equivalent contribution to the preparation of the publication. The authors declare that there is no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 02.11.2022; одобрена после рецензирования 29.11.2022; принята к публикации 17.12.2022.

The article was submitted 02.11.2022; approved after reviewing 29.11.2022; accepted for publication 17.12.2022.