

ХАММАДОВ НАИЛЬ ИЛЬДАРОВИЧ

**ОМИКСНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
СРЕДСТВ ВЕТЕРИНАРНОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора ветеринарных наук

Работа выполнена в отделении биохимии и генетического анализа федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

Научный консультант – **Ефимова Марина Анатольевна**,
доктор биологических наук.

Официальные оппоненты: **Агольцов Валерий Александрович**,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет
генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»,
кафедра болезни животных и ветеринарно-санитарная
экспертиза, профессор;

Белоусов Василий Иванович,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»,
отдел координации научно-исследовательских работ, главный
научный сотрудник;

Плешакова Валентина Ивановна,
доктор ветеринарных наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет
имени П.А. Столыпина», кафедра ветеринарной
микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней,
профессор.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина).

Защита состоится «17» сентября 2026 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, тел. 8 (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО СПбГУВМ по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5, и на официальном сайте <http://spbguvm.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Кузнецова Надежда Викторовна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из важнейших отраслей является «агропромышленный комплекс» (АПК), отвечающий за продовольственную безопасность страны. Структурно в АПК можно выделить два основных звена – растениеводство и животноводство. Животноводство в Российской Федерации включает в себя скотоводство, свиноводство, птицеводство, овцеводство и другие направления, каждое из которых нуждается в ветеринарной помощи: профилактической, лечебной, особенно в противодействии инфекционной патологии животных. В ряде случаев инфекционные болезни животных, возникшие на ограниченной местности, могут и без вмешательства человека перестать угрожать восприимчивым животным (Беляков В.Д. и др. 1987). Чаще возникшая эпизоотия, благодаря совокупности факторов (причинно-следственные связи, описанные академиком Давыдовским А. В. в 1962) без вмешательства ветеринарных специалистов не может прекратиться самостоятельно (Муханкин А. И. 2024). Определение возможного неблагополучия по инфекционным заболеваниям основывается на совокупности различных подходов к выявлению проявления инфекционного заболевания и определению возбудителя инфекционного заболевания, в том числе применение комплексного эпизоотологического метода (Сидорчук А. А. и др. 2002). Диагностика патогенных микроорганизмов различного происхождения на современном этапе научного развития обязательно включает в себя всесторонний анализ определяемых биомаркеров. В молекулярной биологии это биоинформационный анализ, как геномный (геномика), так и протеомный (протеомика), которые в совокупности с транскриптомикой и метаболомикой представляют омиксные исследования (Черных О. Ю. и др., 2025; Чельшев Ю. А. и др., 2023; Гулюкин М. И. и др., 2019; Хаертынов К. С. и др., 2019).

Каждый живой организм имеет уникальный генетический код, определяющий его вид и основные свойства. Так у сельскохозяйственных животных по нуклеотидному составу генома можно определить различные хозяйственно полезные признаки и возможное присутствие так называемых «летальных генов». Относительно микроорганизмов, анализ их генетического кода является самым эффективным методом идентификации их принадлежности к таксономическому положению (род, вид и даже штамм). А характеристика генетического кода микроорганизмов является своего рода их «генетическим паспортом». Кроме индикации генетического материала искомого микроорганизма по консервативным локусам, свойственным для данного вида или рода, зачастую используется техника поиска сопутствующих биомаркеров (например, при индикации лейкоза крупного рогатого скота – определение ДНК коровы) для контроля правильности выделения нуклеиновых кислот.

Индикация нуклеиновых кислот различных патогенных микроорганизмов (от небольших вирусов с геномом 9000 п.о. до микроскопических грибов с множеством хромосом, ДНК каждой насчитывает миллионы п.о.) позволяет обнаружить их минимальные

концентрации, а в некоторых случаях (касается бактерий) может дать ответ об их жизнеспособности (Доронин М. И. и др., 2025; Глотов А. Г. и др., 2024; Агольцов В. А. и др., 2024; Равилов Р. Х. и др., 2024).

Другим диагностическим подходом является определение иммунологического ответа организма на антигены возбудителей инфекционных заболеваний. На сегодняшний день одной из наиболее удобных в исполнении, специфичных и чувствительных серологических реакций является иммуноферментный анализ (ИФА). Анализируя наличие в крови животных антител, можно определить не только явно текущий инфекционный процесс, но и выявить хронические, латентные инфекции (Пименов Н. В. и др., 2024; Михалишин Д. В. и др., 2024; Спиридонов Г. Н. и др., 2024; Шевченко А. А. и др., 2023; Мищенко В. А. и др., 2022).

Актуальность представленного исследования обусловлена реализацией приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации в соответствии с пунктом 20 подпунктом «г» (переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработку и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективную переработку сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания). Анализ генома и аминокислотных последовательностей антигенов патогенных микроорганизмов является основой для разработки специфичных способов генетической и серологической диагностики инфекционных заболеваний.

Степень разработанности темы. Разведение сельскохозяйственных животных связано с проблемами инфекционного характера. Предпосылками для возникновения такого рода сложностей являются высокая численность поголовья и снижение иммунитета, что зачастую обусловлено низким уровнем двигательной активности, низким качеством кормов и климатическими особенностями.

На сегодняшний день кроме анализа клинической картины инфекционных заболеваний существует множество методов выявления как самих патогенных микроорганизмов, так и антител против них (Белоусов В. И. и др., 2022; Кузьмин В. А. и др., 2021; Алипер Т. И. и др., 2021; Кисиль А. С. и др., 2018). Среди всего разнообразия методов индикации микроорганизмов одни используются в повседневной лабораторной практике (световая микроскопия, посеы бактерий на питательные среды, изучение цитопатогенного действия вирусов при их культивировании на культурах клеток, серологические реакции, разновидности полимеразной цепной реакции (ПЦР) и другие), другие нашли своё применение лишь в научных исследованиях (секвенирование ДНК, электронная микроскопия, хромато-масс спектрометрия). Причиной такого распределения средств индикации патогенных микроорганизмов является, с одной стороны, экономическая целесообразность применения того или иного метода, с другой стороны, сложность выполнения некоторых из них.

Как генетическая, так и серологическая диагностика инфекционных заболеваний широко применяется в ветеринарных диагностических лабораториях и эффективно выявляет большинство случаев инфекционных заболеваний животных. Однако определённые недостатки есть и в серологической, и в генетической диагностике. В начале инфекционного процесса ранее не инфицированный таким же патогеном организм не вырабатывает специфические антитела, соответственно серологические методы в таком случае не позволяют выявить инфицированное животное. Кроме того, антитела против многих инфекционных заболеваний сохраняются в организме животного и после его выздоровления. Выявление нуклеиновых кислот напрямую зависит от количества маркерной НК в анализируемой пробе. Так же снижению результативности ПЦР способствует, в некоторых случаях, неправильный выбор метода выделения нуклеиновых кислот (они либо остаются не выделенными, либо в них присутствует множество ингибиторов реакции). Даже правильное выделение и хорошая очистка нуклеиновых кислот может дать отрицательный результат ПЦР, так как одним из ингибиторов реакции, как не странно, является ДНК, а точнее высокая её концентрация. Стоит отметить, что все указанные выше возможные ошибки амплификации нуклеиновых кислот можно избежать, а проверить правильность постановки реакции можно, используя: положительный контроль (проверка правильности составления реакционной смеси и режимов амплификации), отрицательный контроль (проверка наличия контаминации) и внутренний контроль (проверка правильности выделения нуклеиновых кислот). Максимальная эффективность диагностики инфекционных заболеваний достигается при сочетании генетических и серологических исследований (Донник И. М. и др., 2023; Петропавловский М. В., 2022; Сухинин А. А. и др., 2022; Коваленко А. М. и др., 2021).

Различные инфекционные болезни характеризуются актуальностью из изучения и разработки средств индикации исходя из различных обстоятельств. Так лейкоз крупного рогатого скота, бруцеллёз, инфекционный ринотрахеит характеризуются массовостью распространения – за 2022 года официально Россельхознадзором зарегистрировано 13618, 8206 и 721 случаев заболевания крупного рогатого скота, соответственно. Некоторые инфекционные болезни наносят значительный экономический ущерб либо представляют угрозу здоровью человека (лейкоз крупного рогатого скота, ящур, туберкулёз, бруцеллёз, сибирская язва, бешенство, клещевой энцефалит, боррелиоз, классическая чума свиней, болезнь Ауески и другие). Ряд заболеваний не регистрируется на территории нашей страны, но относительно них осуществляются постоянные мониторинговые исследования. В связи с указанной актуальностью исследований и различиями в подходах к анализу генома и антигенов были определены указанные в работе возбудители инфекционных заболеваний.

Для выявления большинства указанных патогенных микроорганизмов существуют коммерческие диагностические тесты, как для ПЦР диагностики, так и для выявления антител методом иммуноферментного анализа. Однако у коммерческих тестов есть два основных

недостатка, а именно высокая стоимость наборов (примерно в 2-4 раза выше себестоимости) и отсутствие возможности (до покупки) определить эффективность работы (специфичность) диагностического теста.

В научной литературе описано множество случаев серологической и генетической индикации всех актуальных патогенных микроорганизмов. В некоторых публикациях указаны соответствующие аминокислотные и нуклеотидные последовательности, применяемые в исследованиях, и очень редко встречаются работы, в которых описан алгоритм действий для определения маркерной последовательности и последующего дизайна олигонуклеотидных праймеров, либо аминокислотных последовательностей антигенов.

Так в научных публикациях множество авторов описывают различные способы индикации респираторных вирусных инфекций (Пчельников А. В. И др., 2025; Госманов Р. Г. и др., 2022; Юров К. П. и др., 2021; Гаффаров Х. З. и др., 2021), в которых указаны результаты выявления нуклеиновых кислот соответствующих вирусов и антител против них. Особенно много публикаций (описывающих случаи генетической и серологической диагностики) встречается относительно заболеваний животных, которыми может болеть и человек, в том числе с летальным исходом (Галиуллин А. К. и др., 2025; Халиков А. А. и др., 2025; Фогель Л. С. и др., 2021; Полякова О. Р. и др., 2020; Мингалеев Д. Н. и др., 2016), к которым относятся туберкулёз, бруцеллёз, боррелиоз, сибирская язва, болезнь Ауески, клещевой энцефалит, бешенство.

Следует отметить, что указанные публикации не раскрывают особенностей биоинформационного анализа, позволяющего выполнить дизайн олигонуклеотидных праймеров для специфичной амплификации маркерных нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний животных.

Основой для разработки серологических и генетических способов индикации патогенных микроорганизмов является применение методов биоинформатики, что и явилось приоритетным направлением диссертационного исследования и послужило основанием для постановки цели и формирования задач данной работы.

Цель исследования: разработка и оптимизация комплексных омиксных молекулярно-биологических подходов для выявления специфических генетических и протеомных маркеров возбудителей инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и создания на их основе высокоэффективных средств диагностики инфекционных болезней животных.

Задачи исследования:

1. Определить специфические генетические маркеры особо опасных, социально значимых и трансмиссивных инфекционных болезней животных – туберкулёза, бруцеллёза, боррелиоза, сибирской язвы, вирусов клещевого энцефалита, ящура, инфекционного ринотрахеита, вирусной диарей, парагриппа-3, классической чумы свиней, болезни Ауески, с использованием методов биоинформационного анализа.

2. Разработать способ индикации нуклеиновых кислот инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, с амплификацией в мультиплексном формате ПЦР-РВ для диагностики респираторных заболеваний крупного рогатого скота.

3. Разработать способы индикации нуклеиновых кислот возбудителей особо опасных, социально значимых и трансмиссивных инфекционных болезней животных (ящура, туберкулёза, бруцеллёза, сибирской язвы, классической чумы свиней, болезни Ауески, клещевого боррелиоза и клещевого энцефалита).

4. Изыскать протеомные маркеры возбудителей бруцеллёза, туберкулеза и артрита-энцефалита коз для серологической диагностики этих инфекционных болезней.

5. Выполнить дизайн аминокислотной последовательности для получения синтетического пептида, способного выявлять иммунный ответ на присутствие антигенов возбудителей бруцеллёза в сыворотке крови восприимчивых животных.

6. Выполнить дизайн нуклеотидной вставки в плазмидный вектор для получения рекомбинантных антигенов, способных выявлять иммунный ответ на присутствие антигенов инфекционных заболеваний (на примере вируса артрита-энцефалита коз и возбудителей бруцеллёза) в организме восприимчивых животных.

7. Определить и получить нативные антигены *Mycobacterium bovis* для выявления иммунного ответа на присутствие возбудителя туберкулёза в организме крупного рогатого скота.

8. Описать алгоритм омиксных исследований для разработки средств диагностики инфекционной патологии сельскохозяйственных животных.

Научная новизна работы. Исходя из особенностей нуклеотидных последовательностей: вирусов – клещевого энцефалита, ящура, парагриппа-3, вирусной диарей, инфекционного ринотрахеита; бактерий родов – *Mycobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Borrelia*; цитокинов свиней – интерферона гамма и фактора некроза опухоли и организмов с частичной гомологией генома (по результатам Blast-анализа) определены специфичные для искомым организмов нуклеотидные последовательности.

Основываясь на полиморфизме геномов искомым и близких по нуклеотидному составу организмов (в каждом случае индивидуально для каждого генетического маркера) выполнен дизайн олигонуклеотидных затравок для амплификации генетических маркеров.

Отработаны способы получения нативных антигенов из бактерий вида *Mycobacterium bovis*, штамм *Bovinus* – 88 для применения при индикации противотуберкулёзных антител методом ИФА.

Определены иммунодоминантные антигены и иммуногенные эпитопы возбудителей бруцеллёза, вируса артрита-энцефалита коз и туберкулёза, на основе которых получены антигены для выявления антител против данных микроорганизмов.

Разработан алгоритм омиксных исследований для создания описанных средств диагностики инфекционной патологии сельскохозяйственных животных, позволяющий в ходе поиска генетических и серологических маркеров выбрать наиболее результативный порядок действий выполняемого анализа.

Теоретическая и практическая значимость исследований. Предлагаемый алгоритм омиксных исследований способствует упрощенному пониманию процесса анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, что позволит самостоятельно анализировать состоятельность представленных в научных публикациях генетических маркеров, а также выполнять поиск и дизайн олигонуклеотидных праймеров и последовательностей для экспрессии желаемого белка в про- и эукариотических системах экспрессии.

Практическая значимость работы подтверждена методическими рекомендациями, нормативно технической документацией, отчётами о НИР (по тематическим заданиям МСХ РФ).

Результаты исследований оформлены в виде следующих методических рекомендаций: «Индикация и дифференциация нуклеиновых кислот возбудителей респираторных заболеваний (ИРТ, РСИ, ПГ-3 и ВД) крупного рогатого скота», «Идентификация и дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* молекулярно-генетическими методами».

По результатам исследований составлена нормативно техническая документация: Технические условия «Тест-система «Туберкулёз ИХА», предназначенная для серологической индикации антител методом иммунохроматографического анализа (ИХА) к возбудителю туберкулёза в сыворотке или плазме крови крупного рогатого скота (ТУ 21.10.60-003-00492374-2023); Технические условия «Тест-система «ТУБЕРКУЛЁЗ КРС ИФА» для серологической индикации антител животных против туберкулеза» (ТУ 21.10.60-007-00492374-2020); Технические условия «Тест-система «КЧС, АУЕСКИ ОТ-ПЦР-РВ» для индикации возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески» (ТУ 21.10.60-004-00492374-2025).

Часть исследований выполнялась по заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации - Департамент образования, научно-технологической политики и рыбохозяйственного комплекса. По результатам исследований составлены и утверждены следующие отчёты о НИР: «Биологическая безопасность» (ЕГИСУ НИОКТР № АААА-Б20-220020590202-6); «Лабораторные и производственные испытания мультиплексных тест-систем для индикации и идентификации различных видов микроорганизмов» (ЕГИСУ НИОКТР № 121020400123-0); «Разработка мультипробирочной ПЦР тест-системы для

диагностики инфекционных болезней животных» (ЕГИСУ НИОКТР № 121020400115-5); «Лабораторные и межлабораторные испытания серологической тест-системы для диагностики туберкулеза животных» (ЕГИСУ НИОКТР № 221031200190-9); «Разработка ИХА – теста для выявления специфических антител к *Mycobacterium bovis* в сыворотке крови животных» (ЕГИСУ НИОКТР №222012800114-7); «Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для диагностики классической чумы свиней и болезни Ауески» (ЕГИСУ НИОКТР 1022070500033-3).

Практическая значимость исследований выражается как в раскрытии особенностей биоинформационного анализа, что делает эту важную, при разработке средств генетической и серологической диагностики, область знаний более доступной широкому кругу научных исследователей, так и в представлении созданных в ходе исследования средств индикации генетических и протеомных маркеров инфекционных заболеваний.

Значимость исследований подтверждена 3 патентами РФ: патент на способ получения антигена из *Mycobacterium bovis Bovinus-8* штамм 700201 молекулярной массой 24 кДа для изучения гуморального иммунного ответа № 2023110770, зарегистрирован Государственным реестром РФ 10 января 2024 г.; патент на набор высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для детекции и дифференциации нетуберкулезных микобактерий № 2021111909, зарегистрирован Государственным реестром РФ 3 февраля 2022 г; патент на способ проведения аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам АА, КК и АК гена фермента диацетил-глицерин о-ацетил трансферазы для определения наследуемости жирномолочности № 2668829, зарегистрирован в Государственном реестре РФ 10 сентября 2013 г.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на геномных и протеомных особенностях исследуемых патогенных микроорганизмов. При выборе методов исследования ориентировались на специфику поставленных задач.

Для проведения исследований применяли следующие методы:

- методы биоинформатики – выбор и загрузка нуклеотидных последовательностей (из ресурса национального центра биотехнической информатизации, США) для последующего их анализа, определение таксономической принадлежности исследуемых патогенных микроорганизмов и выявление наиболее близких им в таксономическом отношении микроорганизмов, метаанализ потенциальных генетических маркеров (nBLAST), выравнивание нуклеотидных последовательностей схожих по нуклеотидному составу микроорганизмов, дизайн олигонуклеотидных затравок, дизайн контрольных последовательностей, в том числе с комбинированием нескольких маркерных нуклеотидных последовательностей, анализ белкового состава микроорганизмов, определение возможных гомологий аминокислотных последовательностей у гетерологичных организмов (pBLAST), анализ иммуногенных эпитопов у выбранных белков, пептидная калькуляция, анализ наличия

трансмембранных доменов, анализ наличия сигнального пептида, индикация сайтов N- и O-гликозилирования, анализ вариабильности аминокислотных последовательностей, анализ консервативности эпитопов и дизайн плазмид и синтетических пептидов;

- методы доказательной эпизоотологии – систематический обзор и метаанализ, тотальный информационный поиск, анализ эпизоотической ситуации, методы оценки границ эпизоотического процесса (применение современных методов лабораторной диагностики);

- геномные – выделение нуклеиновых кислот (коммерческие наборы - сорбентные и преципитирующие), обратная транскрипция (в том числе совместно с амплификацией), амплификация ДНК (ПЦР-РВ по технологии TaqMan и с применением интеркалирующих красителей, ПЦР-ПДРФ), электрофоретическое разделение продуктов амплификации и рестрикции (в агарозном и полиакриламидном гелях), дополнительно при работе с РНК использовали фиксатор РНК, ингибитор РНКаз, ферменты – ДНКазу и ривертазу;

- генно-инженерные – генетическая трансформация бактерий и трансфекция культур клеток, культивирование и селекция микроорганизмов, несущих целевые гены, выделение и очистка продуктов экспрессии целевых антигенов;

- протеомные – выделение антигенов из клеток микобактерий производили из бактериальных колоний, выросших на средах Левенштейна-Йенсена и Сотона, предварительное разрушение клеток микобактерий выполняли механически (трехкратно, по 60 секунд), используя гомогенизатор «FastPrep 24» и пробирки BlueLisingMatrix, осветление, диализ, фильтрация, жидкостная хроматография низкого давления, электрофорез в ПААГ (нативный и денатурирующий);

- серологические – твердофазный «сендвич» иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, реакция иммунодиффузии, иммуноблоттинг;

- статистические – обработка количественных показателей в выборках с пересекающимися числовыми показателями с применением соответствующих параметрических и непараметрических тестов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Нуклеотидные последовательности генов «*gp1*» (вирус ящура), «*RvD2*» (туберкулёз), «*BSCP31*», «*BAW_20982*», «*COR52_12390*» (бруцеллёз), «*pXO2-AT*», «*lef*», «межгенный участок хромосомы» (сибирская язва), «полипротеин» (КЧС), «*glycoprotein C*» (болезнь Ауески), позволяют специфично идентифицировать их нуклеиновые кислоты, что способствуем совершенствованию диагностики особо опасных, социально значимых и трансмиссивных инфекционных болезней животных.

2. Совершенствование эпизоотологического контроля протективных свойств вакцин против бешенства животных путем анализа полиморфизма гена G вируса бешенства.

3. Совершенствование иммунологической диагностики вируса артрит-энцефалита коз, путём использования рекомбинантного белка, состоящего из иммуногенных эпитопов вируса артрита-энцефалита коз, кодируемых генами *gag* и *env*.

4. Совершенствование иммунологической диагностики бруцеллёза, путём использования синтетического пептида и рекомбинантных антигенов, проявляют выраженную аффинность к антителам крупного рогатого скота, образованным при его инфицировании S-формами либо S- и R-формами *Brucella abortus*.

5. Совершенствование иммунологической диагностики туберкулёза, путём изучения серологической активности нативных антигенов *M. bovis*, что позволило определить оптимальные условия получения антигена с молекулярной массой 24 кДа, который был использован при разработке диагностического теста для выявления антител против возбудителей туберкулёза крупного рогатого скота методом иммунохроматографического анализа.

Степень достоверности и апробация результатов. Для выполнения поставленных задач использованы общедоступные ресурсы национального центра биотехнической информатизации (США), база иммуногенных эпитопов. Биоинформационный анализ выполнялся с использованием специализированного программного обеспечения. Все геномные, протеомные и серологические исследования выполнены с применением современных методов и на современном оборудовании (проходящем ежегодную поверку). Достоверность исследования определяется тем, что полученные методами биоинформатики данные подтверждаются практическими исследованиями, достаточным объёмом выборки анализируемого материала и статистической обработкой результатов с количественными показателями. Научные положения документированы рисунками и таблицами. Выводы обоснованы и вытекают из результатов исследования.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на ежегодных отчётах о НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (2012 – 2024 гг. Казань, Россия). Основные результаты диссертационной работы доложены на научных конференциях: Proceedings of the VI International *M. bovis* Conference – 2014 (Wales, Ireland); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, Россия); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, Белорусия); Международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» – 2018 (Казань, Россия); Республиканской конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения В. А. Бандарина «Физико-химическая биология как основа современной медицины» – 2019 (Минск, Белорусия); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием

«Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (Москва, Россия); X юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика» – 2021 (Москва, Россия); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности» – 2023 (Казань, Россия); XXIII Международной научно-практической конференции «Современные научно-практические достижения в ветеринарии» – 2024 (Киров, Россия); Конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2024» (Москва, Россия); XVIII Международной научно-практической конференции «Научные основы повышения продуктивности, здоровья животных и продовольственной безопасности», посвященной 55-летию ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии» – 2024 (Краснодар, Россия).

Личный вклад автора состоит в планировании исследования, отборе проб, проведении биоинформационных и диагностических исследований. Автор самостоятельно выполнил все части биоинформационных исследований, лабораторных анализов, участвовал в написании научных статей, патентов, подготовке докладов и выступлениях на конференциях, а также участвовал в проведении лабораторных испытаний и разработке нормативно-технической документации для производства диагностических наборов. Часть исследований проведена и опубликована в соавторстве. Соавторы не имеют возражений против использования в диссертационной работе совместно полученных данных, что подтверждается соответствующими данными об отсутствии конфликта интересов в научных публикациях.

Публикации. Материалы диссертационного исследования стали основой для написания 39 научных работ, 13 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России в перечне российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные результаты научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата или доктора наук, 9 статьи – в журналах из международной базы научных цитирований Web of Science Core Collection и (или) Scopus, а также 3 патента.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности. Диссертация соответствует паспорту научной деятельности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных: 4, 7, 11, 13, 15, 16 и 19-му пунктам направления исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 392 страницах компьютерного текста, включает в себя введение, обзор литературы, основную часть, заключение, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов, список использованных источников, список иллюстративного материала и приложения, иллюстрирована 91 рисунками, 38 таблицами. Список использованной литературы включает 519 источников, из них 121 на иностранных языках.

2.СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

2.1.1 Методические подходы и материалы, применённые при разработке способов индикации нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов и дифференциации их штаммов

Объектом исследования являлись нуклеотидные последовательности патогенов вирусной и бактериальной природы.

Программное обеспечение и ресурсы для анализа нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности искомым патогенов определены путем поисковых запросов баз данных ресурсов NCBI (National Center for Biotechnology Information, доступ по адресу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Определение встречаемости исследуемых нуклеотидных последовательностей в генетическом материале других организмов выполняли в программной утилите nBLAST. Множественное выравнивание проводили в программном алгоритме AlignX, входящего в состав программы VectorNTI 9.1 (Invitrogen Corporation). Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов осуществляли в программе VectorNTI 9.1, на основании данных о степени полиморфизма полногеномных нуклеотидных последовательностей, единичных нуклеотидных заменах в области гибридизации локусов-кандидатов. Полученные (предварительные) олигонуклеотиды так же подвергали BLAST-анализу (доступ по адресу https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Применяемые для амплификации контрольные нуклеотидные последовательности. Для практического определения эффективности амплификации генетических маркеров использовали плазмидные ДНК, содержащие нуклеотидные последовательности идентифицируемых генетических маркеров. Внутренним контролем амплификации служил геном восприимчивого организма или переносчика патогенного микроорганизма, соответствующего биологическому виду из материала которого выделяли нуклеиновые кислоты.

Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидов, вставок последовательностей ДНК в плазмидные вектора для контроля амплификации, и условия амплификации указаны в соответствующих разделах результатов собственных исследований.

Выделение нуклеиновых кислот и манипуляции с ними. Для выделения ДНК применяли набор ДНК-сорб В (Ампли Прайм, Россия), РИБО-сорб (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), РИБО-преп (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), МАГНО-сорб (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), М-сорб-ООМ (ЗАО Синтол, Россия), согласно инструкции производителя. Амплификацию и рестрикцию анализируемых образцов ДНК-матрицы осуществляли на амплификаторе С1000 с оптическим блоком CFX 96 (Bio-Rad, США) согласно ГОСТ ИСО 21570-2009 с

соответствующими модификациями, указанными в результатах исследования. В случае применения электрофоретического анализа продуктов амплификации и рестрикции, разделение фрагментов ДНК осуществляли в агарозном геле (Полиданов М. А. и др., 2020) с применением бромида этидия в качестве красителя, подробнее условия электрофореза и описание фрагментов ДНК указаны в соответствующих разделах диссертационного исследования.

Секвенирование продуктов амплификации (по Сэнгеру) выполняли в ЗАО «Евроген» (Россия) на коммерческой основе.

Для практического определения эффективности амплификации генетических маркеров использовали и образцы клинических и патологических материалов, образцы культуры клеток, инфицированной искомыми вирусами и инактивированные бактериальные культуры, выращенные в государственной коллекции штаммов микроорганизмов нашего центра сотрудниками соответствующей лаборатории.

Работа с биологическим материалом. Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала, так же, как и работу с ПБА осуществляли в строгом соответствии с требованиями СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводили с использованием стерильных ступок, пестиков, инструментов (ножниц, пинцетов, скальпелей), пипеточных дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и 10,0 мл и наконечников с аэрозольным барьером.

2.1.2 Методические подходы и материалы, применённые при разработке способов индикации иммунного ответа при инфицировании животного

В работе использовали различные ресурсы биоинформатики (детальное описание ресурсов и методических подходов указано в соответствующих разделах диссертационного исследования), синтетические, рекомбинантные и нативные антигены, продукты экспрессии патогенных микобактерий (не содержащие ПБА), инактивированные клетки микобактерий, культуры продуцентов рекомбинантных антигенов, лабораторных животных (кролики и овцы) и различные материалы, и реактивы для выделения и очистки антигенов, антител и выполнения серологических реакций.

Программное обеспечение и ресурсы для анализа аминокислотных последовательностей. Прогнозирование эффективности работы, и создание конструкций для получения синтетических и рекомбинантных антигенов выполняли используя следующие ресурсы: структурного анализа антигенов с применение алгоритмов ресурса swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), базы иммуногенных эпитопов (<https://www.iedb.org>), пептидной калькуляции (<https://pepcalc.com>), BLAST-анализа, анализа наличия трансмембранных доменов (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>),

сигнальных пептидов (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>), сайтов гликозилирования (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0>, <https://services.healthtech.dtu.dk/services/DictyOGlyc1.1>). Применение которых детально описано в соответствующих разделах диссертационного исследования. Доступ к некоторым программным ресурсам осуществляется по средствам работы через виртуальную частную сеть.

Получение использованных в работе антигенов. Получение антигенов в культуре прокариот заключалась в подготовке компетентных клеток *E. coli*, их трансформации, заключающейся во внедрении применяемых в процедуре плазмидных векторов, содержащих целевую и регуляторные нуклеотидные последовательности, селекцию по генам устойчивости к антибиотикам и индукции трансформированных клеток *E. coli*, с последующей очисткой целевых антигенов (Николаева Ю. А. и др., 2025).

Для получения антигенов с применением вирусных векторов и получения целевых продуктов в клетках эукариот применяли культуру клеток НЕК 293. В качестве вектора, несущего нуклеотидную последовательность целевого антигена применяли плазмидную ДНК pVax1, обладающую всеми регуляторными элементами для синтеза целевого антигена (Galeeva A. G. et al., 2025).

Получение нативных антигенов из культур микобактерий (работу с живыми возбудителями туберкулёза выполняли сотрудники лаборатории №18 (государственной коллекции штаммов микроорганизмов)) осуществляли в направлении выделения антигенов (продуктов экспрессии *Mycobacterium bovis*) из питательной среды и непосредственно из клеток *M. bovis*. Методические подходы к выделению антигенов описаны в соответствующем разделе результатов диссертационного исследования.

Получение использованных в работе антител. В рамках изучения нативных антигенов *M. bovis* и изготовления конъюгатов антивидовых антител выполнена иммунизация лабораторных животных (кроликов и овец), аналогично схеме гипериммунизации описанной Мухамеджановой А. Г. и соавторами (Мухамеджанова А. Г. и др., 2020). Очистка целевых иммуноглобулинов проводилась в условиях жидкостной хроматографии, с применением ДЭАЭ-целлюлозы в качестве ионообменного сорбента.

Серологические реакции. Специфическое взаимодействие антигенов и антител проверяли в следующих серологических реакциях: РИД (выполнили реакцию аналогично инструкции для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота), иммуноблоттинг (Красочко П. А. и др., 2005), ИФА (Насыров Ш. М. и др., 2024), ИХА (Галеева А. Г. и др., 2023). Детали постановки анализа и его результаты описаны в соответствующих разделах диссертационного исследования.

2.2 Результаты и обсуждения собственных исследований

2.2.1 Разработка способов индикации нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов

2.2.1.1 Разработка способов индикации нуклеиновых кислот возбудителей заболеваний, представляющих экономическую и социальную угрозу

2.2.1.1.1 Разработка способа индикации нуклеиновых кислот вируса ящура

Вирус ящура представляет собой РНК-содержащий вирус, принадлежащий роду *Aphthovirus*, семейству *Picornaviridae*. Вирус ящура включает серотипы: *A*, *Азия-1*, *C*, *O* и *SAT (1, 2 и 3)*.

При дизайне олигонуклеотидных затравок учитывали возможность амплификации целевых генетических маркеров (для индикации вируса ящура) и ДНК-маркеров внутреннего контроля амплификации (ДНК восприимчивого животного) в одной реакции. Ниже приведен анализ вариабельности нуклеотидных последовательностей различных изолятов по каждому из серотипов вируса.

Анализ генетического полиморфизма направлен на выявление гомологий среди изолятов наиболее многочисленного серотипа вируса, а именно типа *O* (179 штаммов/изолятов). При анализе производился отбор последовательностей, у которых в каждой области генерации олигонуклеотидных затравок (по различным изолятам) встречается не более двух замен нуклеотидов. Первый локус, в котором есть возможность произвести дизайн олигонуклеотидных затравок, локализуется на участке от 4132 до 4292 п.о., при этом максимальная вариабельность отмечена у штамма с ID HQ412603 и изолята с ID AY593813. Второй локус, в котором есть возможность произвести дизайн олигонуклеотидных затравок, локализуется на участке от 7810 до 7908 п.о., при этом максимальная вариабельность отмечена у изолята с ID KF985189. И третий локус, находится на участке от 7913 до 8043 п.о., в нуклеотидной последовательности локуса существенно вариабельных штаммов/изолятов не выявлено.

Дальнейшее выявление гомологий проводилось среди следующего по многочисленности штаммов/изолятов вируса, тип *A* (117 штаммов/изолятов). Выявление гомологий проводилось по трём локусам, которые исходя из результатов анализа вируса типа *O*, имели возможность произвести дизайн олигонуклеотидных затравок. Анализируя первый локус, который локализуется на участке от 4151 до 4310 п.о., выявлен один изолят с тремя нуклеотидными заменами в области генерации обратного праймера (AY593793). Анализ второго локуса, локализованного на участке от 7829 до 7926 п.о., выявил три вариабельных изолята (KC588943, KY322678, KY404934). Анализ третьего локуса, локализованного на участке от 7933 до 8061 п.о., выявил один изолят (MG725874) с тремя нуклеотидными заменами в области генерации олигонуклеотидного зонда.

Выявление гомологий среди изолятов вируса, тип *Asia 1* (59 штаммов/изолятов) продолжили по тем же трём локусам. Анализируя первый локус, локализующийся на участке от 4162 до 4321 п.о., выявлен один изолят (JN006720) с тремя нуклеотидными заменами в области гибридизации предполагаемого олигонуклеотидного зонда. Второй локус, локализующийся на участке от 7840 до 7937 п.о., характеризовался вариабельностью трёх нуклеотидов в области гибридизации предполагаемого зонда у одного штамма (EF149009). Анализ третьего локуса, локализованного на участке от 7944 до 8072 п.о., выявил полиморфизм в области гибридизации предполагаемого зонда у двух изолятов вируса (DQ989310, DQ989311).

Дальнейшему анализу на выявление гомологий подвергли изоляты вируса, тип *C* (23 штамма/изолята). Первый локус, локализуется на участке от 4100 до 4259 п.о., при этом максимальная вариабельность отмечена у шести изолятов вируса (AY593804, AY593810, KM268897, MH053308, MH 053309, MH053310). Второй локус, локализуется на участке от 7778 до 7875 п.о., при этом максимальная вариабельность отмечена у трёх изолятов вируса (AY593810, MH053308, MH053310). И третий локус, локализующийся на участке от 7882 до 8010 п.о., в нуклеотидной последовательности которого существенно вариабельных штаммов/изолятов не выявлено.

Выявление гомологий среди изолятов вируса, тип *SAT* проводили сразу по всем трем вариантам (*SAT1*, *SAT2*, *SAT3*), всего 74 штамма/изолята. Первый локус, локализуется на участке от 4137 до 4296 п.о., при этом максимальная вариабельность отмечена более чем у двадцати одного штамма/изолята вируса. Второй локус, локализуется на участке от 7812 до 7909 п.о., при этом максимальная вариабельность отмечена у двадцати трёх штаммов/изолятов вируса. И третий локус, локализуется на участке от 7916 до 8044 п.о., при этом максимальная вариабельность отмечена у девяти изолятов вируса (FY461346, YX014255, YX014256, KC440884, MF678823, MF678824, MF678825, MF678826, MH053324), однако критические нуклеотидные замены встречались в одних и тех же местах, применение дополнительного зонда, с учетом трех замен минимизирует вариабельность в нуклеотидной последовательности этих изолятов.

Таким образом, выявление гомологий среди штаммов/изолятов всех типов вируса позволило определить локус с минимальной вариабельностью (по тексту это третий локус). Кроме того в ходе анализа установлены оптимальные участки для генерации олигонуклеотидных затравок, ориентация в геноме по изоляту UGA/3/2002, серотип O (GenBank ID MH053318), прямой праймер с 7913 по 7934 п.о., обратный праймер с 8026 по 8043 п.о. и зонд, в различных модификациях с 7988 по 8024 п.о.

В пределах представленных выше локусов для индикации генома вируса ящура и ДНК-маркеров крупного рогатого скота произведен дизайн праймеров и зондов для ПЦР, при этом предъявлялись следующие требования: одинаковая температура плавления праймеров

($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$); минимум димеров и вторичных структур; минимум GC на 3' конце; для зонда, отсутствие G на 5' конце (первый нуклеотид) и самое главное минимальная вариабельность нуклеотидной последовательности (максимум две) в последовательности каждой олигонуклеотидной затравки. Индикация всех штаммов/изолятов всех серотипов вируса ящура достигается с использованием трех модификаций зонда. Первый зонд (PFMDV) служит для выявления основного количества штаммов/изолятов вируса, вторая модификация зонда (PasFMDV) позволяет выявлять не выявленные предыдущим зондом два изолята вирусов серотип Asia 1, особенности полиморфизма девяти изолятов серотипов SAT1 и SAT2 и одного изолята серотипа А при их индикации учитывает третий зонд (PsatFMDV).

Разработанные праймеры для индикации вируса ящура имеют температуру плавления ($58,6^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), а праймеры для контроля амплификации имеют температуру плавления ($55,45^{\circ}\text{C} \pm 0,15^{\circ}\text{C}$), такая разница температур подразумевает более благоприятные условия амплификации специфичных праймеров (при температуре отжига $58,5^{\circ}\text{C}$) и минимизирует влияние олигонуклеотидов для контроля амплификации на ход реакции.

Для контроля результата амплификации создан положительный контроль со специфической вставкой маркерной последовательности (atctccgtggcaggactcgccgtccactctggac ctgacgagtaccggcgtctctttgagccctccagggtctctttgagattccaagctacagatcactttacctgcgttgggtgaacgccgtgtgc) для индикации вируса ящура в плазмидной ДНК.

Результат амплификации маркерного локуса с разработанными праймерами и зондами изображен на рисунке 1.

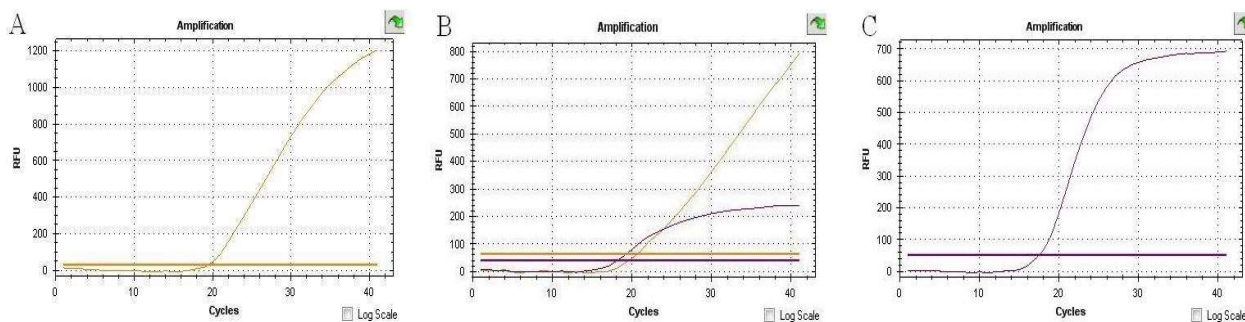


Рисунок 1 – Амплификация маркерного локуса для индикации вируса ящура

Примечание: А – амплификация плазмидного контроля, В – амплификация плазмидного контроля и ДНК крупного рогатого скота, С – амплификация ДНК крупного рогатого скота

Амплификация с олигонуклеотидными затравками для индикации вируса ящура была результативной как в отдельной ПЦР с положительным плазмидным контролем, так и в сочетании с ДНК крупного рогатого скота. Во всех случаях в реакционной смеси присутствовали праймеры/зонды для индикации и вируса и внутреннего контроля амплификации, а концентрация плазмидной ДНК составила 1×10^8 копий ДНК / мкл (обозначения на рисунке А и В). При отдельной амплификации с ДНК крупного рогатого скота перекрёстных реакций с праймерами/зондами для индикации вируса ящура не проявлялось.

2.2.1.1.2 Разработка способа мультиплексной индикации нуклеиновых кислот возбудителей классической чумы свиней и болезни Ауески

Для эффективной, достоверной прижизненной диагностики и качественного мониторинга всего поголовья животноводческих хозяйств оптимально подходят методики, основанные на генетических исследованиях, а именно применение ПЦР. Оптимально применение мультиплексной ПЦР для выявления генетического материала сразу двух вирусов в одной реакции.

Геном вируса КЧС представлен РНК длиной около 12,3 тыс. нуклеотидов, что позволяет производить поиск маркерных локусов, пригодных для индикации данного вируса, анализируя весь его геном. С этой целью из базы данных GenBank были сохранены 68 полногеномных последовательностей вируса КЧС, нуклеотидная последовательность вируса представлена одним полипротеином, идентичность которого для разных штаммов вируса составила 83,2 %. Наиболее информативное представление полиморфизма генома вируса представлена при выравнивании нуклеотидных последовательностей штаммов JSZL, HuN23/2013, Riems, Shimen/HVRI и NC002657 вируса классической чумы свиней (рисунок 2).

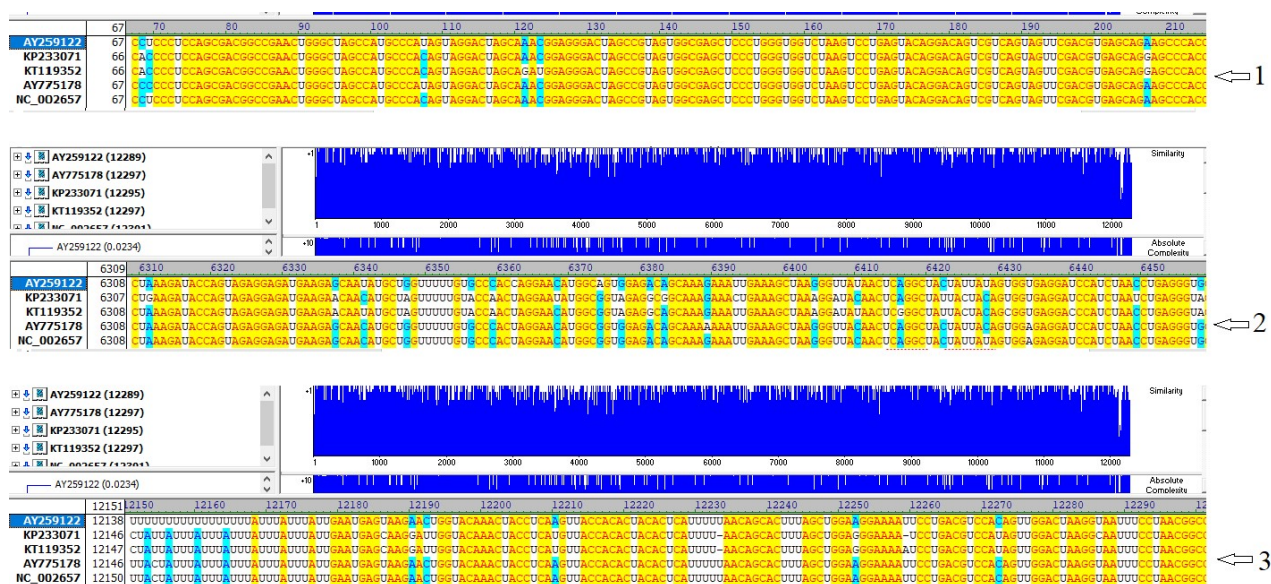


Рисунок 2 – Множественное выравнивание исследуемых нуклеотидных последовательностей потенциальных маркеров для выявления КЧС

Примечание: 1-3 области генома в пределах которых возможен дизайн праймеров и зондов

На основании полученных результатов удалось идентифицировать пять локусов с минимальным полиморфизмом нуклеотидов, в области которых возможен дизайн олигонуклеотидных затравок. BLAST-анализ данных участков указал на высокий потенциал для дальнейшей работы только у трёх из пяти, среди основных гомологий наиболее часто встречались пестивирусы различных животных, особенно мелкого рогатого скота. Перспективные области (обозначение относительно штамма AY775178) были локализованы в области от 70 до 206 п.о. (идентичность при выравнивании нуклеотидных последовательностей 83,1 %), от 6312 до 6457 п.о. (идентичность 87 %) и от 12193 до 12303 п.о.

(идентичность 75 %). Однако после дизайна зонда, прямого и обратного праймеров на каждый из указанных выше локусов, с учётом минимальной гомологии среди нуклеотидов в выравнивании полногеномных последовательностей вирусов диареи крупного рогатого скота, было установлено что участок, локализованный в позиции от 6312 до 6457 п.о. характеризовался минимальным полиморфизмом в отношении к анализируемым гетерогенным вирусам (уникальных для вируса КЧС нуклеотидов в предполагаемых олигонуклеотидных затравках менее 10%). Таким образом для дальнейшей разработки олигонуклеотидных праймеров и зонда были отобраны области генома вируса КЧС от 70 до 206 п.о. и от 12193 до 12303 п.о.

Так как наиболее подходящими для амплификации являются олигонуклеотидные праймеры длиной 28–35 нуклеотидов, для перспективных локусов генома вируса КЧС от 70 до 206 п.о. и от 12193 до 12303 п.о. провели поиск консервативных областей длиной до 40 нуклеотидов. По результатам множественного выравнивания с гетерологичными организмами характеризующимися наибольшей гомологией к анализируемой нуклеотидной последовательности были обнаружены участки со следующими позициям (обозначение относительно штамма AY775178): для КЧС1 F – 69-85 п.о., КЧС1 R – 175-201 п.о., КЧС1 P – 148-178 п.о., КЧС2 F – 12190-12225 п.о., КЧС2 R – 12267-12295 п.о. и КЧС2 P – 12232-12262 п.о.

Ожидаемые продукты амплификации с отображением локализации места отжига каждого праймера и зонда представлены на рисунке 3.

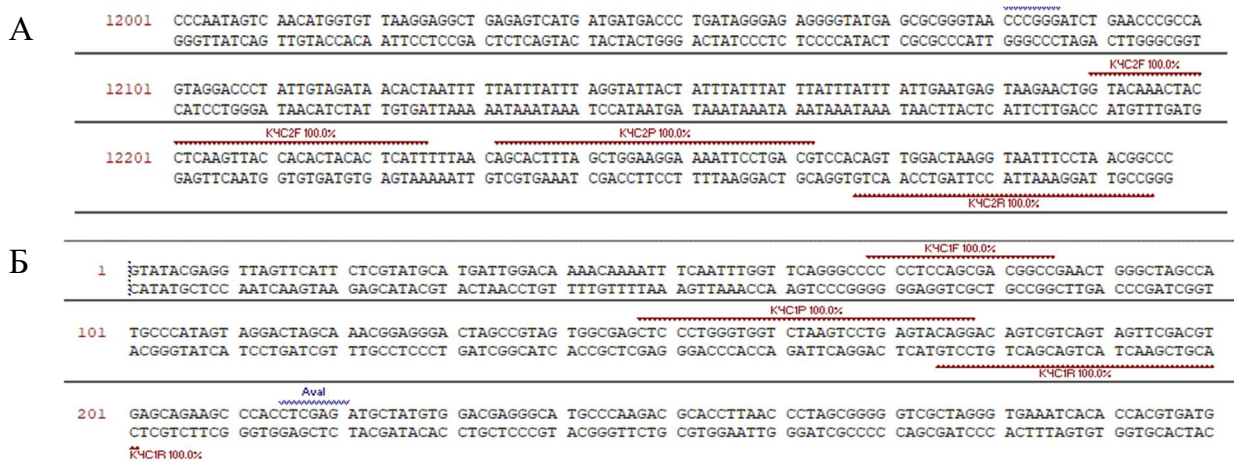


Рисунок 3 – Нуклеотидные последовательности участков генома вируса КЧС (GenBank: AY77517) от 12193 до 12303 нуклеотидов (А), от 70 до 206 нуклеотидов (Б)

Для подбора генов и локусов ДНК, пригодных для использования при индикации вируса БА из базы данных GenBank, были сохранены 7 нуклеотидных последователей возбудителя, которые по предварительному BLAST-анализу характеризовались низкими показателями варибельности среди нуклеотидных последовательностей искомого вируса, наряду с минимальной гомологией с ДНК гетерогенных организмов.

По результатам множественного выравнивания с гетерологичными организмами характеризующимися наибольшей гомологией к анализируемой нуклеотидной последовательности были обнаружены участки со следующими позициям: обозначение относительнополногеномной последовательности вируса (GenBank: NC006151) - для Auesky 1F – 121057-121076 п.о., Auesky 1R – 121171-121192 п.о., Auesky 1P – 121089-121108 п.о.; Auesky 2F – 54379-54397 п.о., Auesky 2R – 54445-54461 п.о. и Auesky 2P – 54415-54438 п.о. Исходя из вариабельности нуклеотидных последовательностей выбранных регионов анализируемых штаммов, были сконструированы олигонуклеотидные праймеры и зонды.

Кроме того, нами было принято решение о применении в качестве ВКО РНК, которые в процессе жизнедеятельности производят сами животные, чей материал будет анализироваться на предмет наличия целевых генетических маркеров. Таким образом при конструировании контроля амплификации можно использовать различные биомаркеры, в том числе локусы в рамках экзонов генов цитокинов, таких как *TNF* и *INFG*. *TNF* участвует в системном воспалении, и является одним из провоспалительных белков, которые запускают фазу острого воспаления, а *INFG* имеет решающее значение для врожденного и адаптивного звеньев иммунитета против вирусных, а также некоторых бактериальных и протозойных инфекций.

Ожидаемые продукты амплификации с отображением локализации места отжига каждого праймера и зонда представлены на рисунке 4.



Рисунок 4 – Нуклеотидные последовательности участков генома вируса Болезни Ауески (GenBank: E05619 (gIII protein)) (A), (GenBank: AY77517) (B)

Для дизайна олигонуклеотидных затравок для ВКО были использованы участки от 103 по 234 п.о. (GenBank: JF831365.1 – *Sus scrofa* TNF-alpha mRNA, complete cds) и от 4478 по 4587 п.о. (GenBank: HQ026021.1 - *Sus scrofa* interferon-gamma (IFN-gamma) gene, complete cds). В

нашем случае для дизайна зонда ВКО был использован флуорофор Cy5, тогда как для комбинации праймеров и зондов патогенов-мишеней (КЧС и БА) Rox и R6G, так как реакции амплификации во всех случаях протекают одновременно в одной пробирке. Разработанные праймеры для индикации КЧС и БА имеют температуру плавления ($61,6 \pm 0,1$) °C, а праймеры для контроля амплификации – ($55,45 \pm 0,15$) °C, такая разница температур подразумевает более благоприятные условия амплификации специфичных праймеров и минимизирует влияние олигонуклеотидов для контроля амплификации на ход реакции.

В результате амплификации разработанных праймерных комбинаций с созданным ДНК-маркером, содержащим участки гибридизации применяемых олигонуклеотидов были получены соответствующие продукты полимеразной цепной реакции, представленные на рисунке 5.

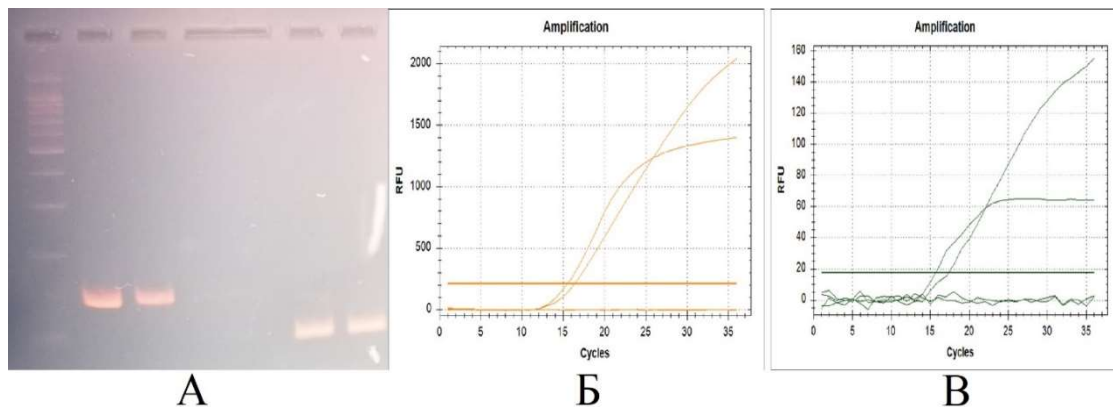


Рисунок 5 – Результат амплификации целевой ДНК с олигонуклеотидами для индикации возбудителей КЧС и болезни Ауески

Примечание: А – результат электрофоретической детекции продуктов амплификации, Б – амплификация с использованием олигонуклеотидов для индикации генома возбудителя КЧС в режиме реального времени, В – амплификация с использованием олигонуклеотидов для индикации генома возбудителя болезни Ауески в режиме реального времени

В результате амплификации с применением температурного градиента установлено что оптимальная температура отжига праймеров равна 61 °C, при которой достигается оптимальное соотношение порогового цикла амплификации и силы сигнала флуоресценции зондов.

Амплификация выявленных генетических маркеров в мультиплексном формате также проявила свою эффективность (в том числе с использованием генетического материала вируса КЧС (штамм Шиминь) и вируса болезни Ауески (штамм Арск)), при этом амплификация внутреннего контроля происходит лишь с РНК восприимчивого животного (свиньи), что позволяет контролировать не только процесс выделения нуклеиновых кислот, но и эффективность обратной транскрипции в ходе ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией. Эффективность выделения нуклеиновых кислот подтверждалась с применение коммерческих наборов «ПЦР-КЧС-ФАКТОР» (АО «Вектор-Бест», Россия) и «КЧС» (Амплисенс, Россия).

2.2.2 Анализ полиморфизма нуклеиновых кислот вируса бешенства, для подтверждения его таксономической принадлежности

Кроме индикации штаммов микроорганизмов и генотипирования (дифференциации вакцинных штаммов от патогенных, установление источника заноса инфекции в ранее благополучные хозяйства, определение штаммовой принадлежности микроорганизма) есть не менее важная причина генетического анализа и генотипирования. Такой причиной генетического анализа является прогнозирование сохранения исходных свойств анализируемого микроорганизма. Чтобы определить детально что именно изменилось в результате множества повторов культивирования бактерий и вирусов необходим более точный, чем описано ранее, анализ генома, который достижим при использовании секвенирования ДНК.

Известно, что геному вируса бешенства свойственна высокая эволюционная изменчивость ввиду отсутствия у вирусной РНК-полимеразы корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности, при этом наиболее высокая частота возникновения олигонуклеотидных замен характерна для последовательности гена G. Эти факторы приводят к формированию разнообразных штаммовых пулов вируса бешенства, что обуславливает необходимость контроля генетической стабильности производственных штаммов.

В ходе исследований из всех образцов, содержащих производственный штамм вируса бешенства «Овечий ВГНКИ», адаптированный к клеточной линии ВНК-21/13, получены ПЦР-продукты длиной 768 п.н. Амплифицированный фрагмент включает участки, кодирующие мажорный антигенный сайт I (АСI), представленный линейным и конформационным эпитопами (226-231 а.о.), и АСII, представленный конформационными эпитопами IIb (34-42 а.о.) и IIa (198-200 а.о.). Нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации геномов рабочих посевных вирусов, были идентичны. Сравнительный анализ структуры линейных эпитопов антигенных сайтов белка G нашего штамма с аналогичными последовательностями основных вакцинных и референтных штаммов вируса бешенства проводили при помощи программного обеспечения «MEGA 11.0» («MegaSoftware», США).

На следующем этапе исследований нами было проведено множественное выравнивание фрагментов гена G изучаемого вируса бешенства и ряда широко используемых отечественных и зарубежных вакцинных штаммов на предмет наличия единичных нуклеотидных замен (SNP).

Наибольшей гомологией со штаммом «Овечий ВГНКИ-ВНК-21/13» обладают штаммы «Щелково-51» и «Москва-3253» (95,8 % и 95,9 % соответственно), наименьшей – штаммы «ERA», «SAD-B19», «Flury НЕР», «CVS» (от 88,0 до 90,7 %). Это объясняется тем, что «Овечий ВГНКИ» и «Щелково-51» являются дериватами штамма «Москва-3253» – прямого потомка оригинального пастеровского штамма – и имеют европейское происхождение, тогда как представители группы SAD («Внуково-32», «ERA», «SAD-B19», «Flury НЕР») относятся к

североамериканской ветви вакцинных штаммов и по нуклеотидным последовательностям основных функциональных доменов значительно удалены от российско-европейской ветви. Высокую степень филогенетической близости штамма «Овечий ВГНКИ» к штаммам «Щелково-51» и «RV-97», сопряженную с идентичностью выявленных нуклеотидных замен, можно объяснить тем, что данные штаммы относятся к кластеру вакцинных дериватов, прошедших адаптацию к культурам клеток ВНК или Vero. Вероятно, большинство общих мутаций в геномах представителей этого кластера являются результатом адаптации вирусов к репликации в клетках конкретных линий.

Критически важным фактором в оценке генетической стабильности вируса бешенства является наличие аминокислотных замен в основных функциональных регионах белка G, так как именно им отводится ведущая роль в иницирующем моменте развития инфекции, связывании с вируснейтрализующими антителами и внутриклеточном транспорте гликопротеина. По результатам сравнительного анализа аминокислотных последовательностей установлено, что мажорные сайты связывания с вируснейтрализующими антителами – конформационные эпитопы I, Pa, Pb – являются консервативными для всех представленных штаммов (таблица 1).

Таблица 1 – Анализ вариабельности структуры основных функциональных доменов вакцинных штаммов вируса бешенства (антигенные сайты 1, 2)

Штамм	Антигенный сайт II		
	Антигенный сайт I Эпитоп I (226-231 а.о.)	Эпитоп Pa (198-200 а.о.)	Эпитоп Pb (34-42 а.о.)
Овечий ВГНКИ-ВНК-21/13	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
Щелково-51	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
RV-97	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
Внуково-32	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
Москва-3253	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
SAD-B19	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
ERA	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
Flury HEP	KLCGVL	KRA	GCTNLSGFS
CVS	KLCGVL	KRA	GCTNLS E FS

Молекулярно-генетический анализ фрагмента (768 п.н.) последовательности гена G производственного штамма вируса бешенства «Овечий ВГНКИ», адаптированного к культуре клеток линии ВНК-21/13, позволил установить его филогенетическую близость к штаммам вируса бешенства, принадлежащим к российско-европейской и североамериканской ветвям группы вакцинных штаммов, относящимся к 1-му генотипу (RABV). Максимальная гомология исследуемого штамма была отмечена в отношении штамма «Щелково-51», доля единичных нуклеотидных замен в сравнении с которым составила 4,2 %. Идентичность характерных точечных мутаций и аминокислотных замен позволяет предположить, что их возникновение

может быть обусловлено процессами адаптации вирусного генома к репликации в конкретных клеточных системах. Сохранение структуры основных функциональных доменов, а также отсутствие мутаций и замен в геномах рабочих посевных вирусов разных пассажей свидетельствует о генетической стабильности адаптированного производственного штамма и его соответствии требованиям технологических процессов.

2.2.3 Разработка способов индикации иммунного ответа животных на присутствие в организме возбудителей инфекционных заболеваний

2.2.3.1 Разработка способа индикации иммунного ответа на инфицирование бруцеллами, основанного на применении рекомбинантного антигена

Первично, предполагая, что необходимо применить антигены, имеющиеся лишь у *Brucella canis* был выполнен BLAST-анализ множества антигенов, характерных для данного вида бруцелл, однако антигенов, которые есть у *Brucella canis* и отсутствуют у других бруцелл обнаружить не удалось. Поэтому требования к проектируемому антигену скорректировали, и искали антигены *Brucella canis*, которые отсутствуют у других патогенных микроорганизмов, не входящих в род *Brucella*. Дальнейший анализ был ориентирован на конкретные иммуногенные эпитопы, которых по результатам запроса данных в базе данных иммуногенных эпитопов оказалось 9. Детальный BLAST-анализ каждого иммуногенного эпитопа позволил для дальнейшей работы отобрать лишь три эпитопа из девяти (qwallpylf, avnaatynr и etvwpfffy).

Анализ наличия сигнальных пептидов в полных аминокислотных последовательностях отобранных (трёх) антигенов указал на то, что в последовательности антигена «Leucine-binding protein domain-containing protein» в позиции 27-28 aa имеется сигнальный пептид, функционирующий по механизму Sec/SPI, что теоретически повышает иммунный потенциал применяемого антигена.

В линейном выражении аминокислотная последовательность всех применяющихся иммуногенных эпитопов была следующей qwallpylfavnaatynretvwpffya, и характеризовалась такими физическими свойствами: число аминокислот 27, молекулярная масса 3252.67 г/М, коэффициент экстинкции $15220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, изоэлектрическая точка возникает при $\text{pH} = 6.53$, суммарный заряд при нейтральном $\text{pH} = 0$, пептид плохо растворим в воде. В составе такого пептида много ароматических и алифатических аминокислот с выраженными гидрофобными свойствами, учитывая, что для удобной и эффективной очистки с С-конца молекулы добавлен гистидиновый тэг – гидрофобные свойства молекулы будут усилены. Для решения задач по оптимизации аминокислотной последовательности были добавлены ряд аминокислот: 9 аминокислот, характеризующихся гидрофильностью из последовательности антигена нитрат редуктазы и комбинации различных нейтральных и гидрофильных аминокислот. В конечном виде модифицированная аминокислотная последовательность обладала следующей аминокислотной последовательностью mkktaiaivalagfatvaqahwkesqwallpylfadlkerieravnaatynre raereygsetvwpfffyagtqrdsihhhhhh и характеризовалась такими физическими свойствами: число

аминокислот 84, молекулярная масса 9718.82 г/М, коэффициент экстинкции 22190 М⁻¹см⁻¹, изоэлектрическая точка возникает при рН = 9.11, суммарный заряд при нейтральном рН = 1.7, пептид хорошо растворим в воде. Следует дополнительно отметить, что в полученной аминокислотной последовательности нет цистеинов, что свидетельствует об отсутствии формирования дисульфидных мостиков, негативно влияющих на конформацию и растворимость белка.

Для получения желаемой аминокислотной последовательности была выполнена кодонная оптимизация и перевод из аминокислотной последовательности в нуклеотидную, с учетом вида продуцента, в итоге была получена следующая последовательность «atgaagaagactgccatcgccatcgccgtagcggtggcaggccttgcaacggctgcacaagcccactggaaggagagtcaatgggctttgtta ccatattgttcgctgacctgaaagagcgtattgagcgtgcagtgaacgcagcaacttacaaccgtgaacgtgcagaacgtgagtacggtagcg agacagtctggccattcttctatgcaggtaccagcgtgattctattcatcaccatcatcaccattga» которая с добавлением кодона, останавливающего синтез белка составила 255 п.о. (данная нуклеотидная последовательность была использована только для трансформации *E. coli* и дальнейшего получения соответствующего белка). Синтез нуклеотидной последовательности, в векторе рЕТ28(+) заказан в ЗАО «Евроген» (Россия).

Визуально результат роста генетически трансформированного продуцента рекомбинантного антигена представлен на рисунке 6.

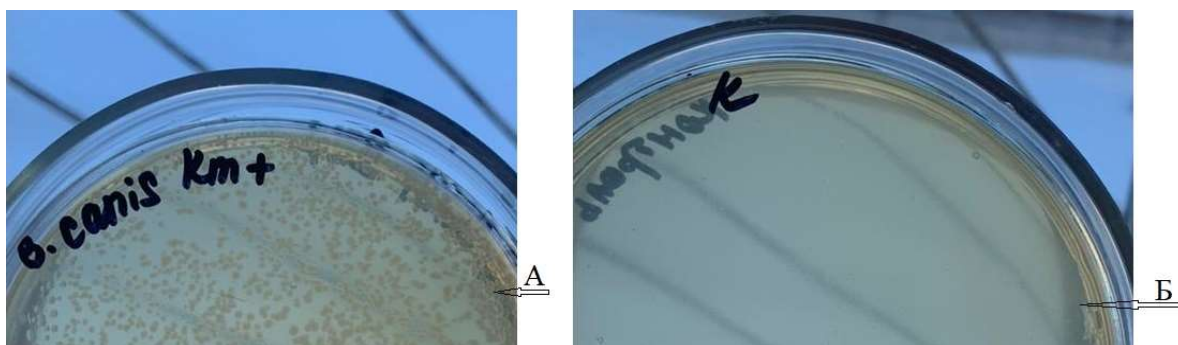


Рисунок 6 – Рост культуры бактерий *E. coli* штамм *BL21* (продуцент рекомбинантного антигена для выявления антител против бруцеллёза, в том числе против *Brucella canis*) после генетической трансформации

Примечание: А – рост бактериальных клеток, продуцентов рекомбинантного антигена на среде с селективным антибиотиков; Б – отсутствие роста нетрансформированных бактериальных клеток на среде с селективным антибиотиков

После получения антигена и его очистки (аффинная хроматография с применением никель-сефарозы в качестве сорбента) его функциональность определена в серологических реакциях с сыворотками крупного рогатого скота (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты серологических реакций рекомбинантного антигена с сыворотками крупного рогатого скота, содержащими и не содержащими антитела против возбудителя бруцеллёза

Антиген – рекомбинантный белок с <i>E. coli</i> 10 мкг/мл						
Сыворотки	A	S	M	R	K-	

Разведения сыворотки	Продолжение таблицы 2					
	x2	0,629	1,187	0,701	0,05	0,083
	x4	0,526	1,156	0,721	0,049	0,054
	x8	0,505	0,942	0,465	0,071	0,053
	x16	0,35	0,997	0,447	0,073	0,044
	x32	0,295	0,933	0,383	0,051	0,047
	x64	0,277	0,769	0,32	0,063	0,046
	x128	0,144	0,57	0,22	0,041	0,045
	x256	0,103	0,328	0,142	0,056	0,052

Примечание: А – сыворотка крови крупного рогатого скота против *B. abortus*; S– сыворотка против Сантигена бруцелл; М – сыворотка против *B. melitensis*; R – сыворотка против Рантигена бруцелл; К- – отрицательный контроль, в котором, в одном случае отсутствует антиген и применяется сыворотка крови не инфицированного бруцеллами крупного рогатого скота, в другом случае антиген сенсibilизирован на планшет и применяется сыворотка крови не инфицированного крупного рогатого скота.

Из представленных в таблице данных хорошо видно, что рекомбинантный антиген характеризуется серологической активностью. Серологическая активность отмечена в отношении противобруцеллёзных А-, S- и М-антител, в отношении R-антител такой активности не наблюдалось.

Коэффициенты специфичности рассчитывали относительно данных ИФА с сывороткой крови в разведении 1:128. Так для рекомбинантного антигена при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против *Brucella abortus* коэффициент специфичности составил 3.15, при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против S антигена бруцелл коэффициент специфичности составил 12.43, при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против *Brucella melitensis* коэффициент специфичности составил 4.79, при реакции с сывороткой крови крупного рогатого скота против R антигена бруцелл коэффициент специфичности составил 0.83.

2.2.3.2 Разработка способов индикации иммунного ответа, основанного на применении нативных антигенов возбудителей туберкулёза

Представленный подход к получению антигенов для выявления искомым антител в значительной степени отличается от подходов, описанных выше, данный подход достаточно затратный с материальной стороны и в отношении трудозатрат, и сложности выполнения исследования. Однако данный подход характеризуется одним очень важным преимуществом над всеми остальными способами получения антигенов, а именно: изучение нативных антигенов позволяет в каждом случае из всего антигенного профиля исследуемого микроорганизма идентифицировать, какие именно антигены являются серологически активными, и подобрать условия для их экстракции в очищенном от других компонентов клетки состоянии. В данном случае антигены представлены именно такими, как они презентуются при взаимодействии с восприимчивым организмом.

Материалом для исследования служили нативные антигены микобактерий туберкулёза, культуры *Mycobacterium bovis* штамм *Bovinus 8*, сыворотки крови, содержащие и не содержащие противотуберкулёзные антитела.

Так, меняя условия пробоподготовки и разделения антигенов удалось получить следующие результаты.

При разделении антигенов (продуктов экспрессии *M. bovis* в среде Сотона) путём ионообменной хроматографии с использованием ДЭАЭ целлюлозы в OH^- форме, было получено 34 фракции, иммуногенные антигены в которых (выполнен Вестерн блот и определена серологическая активность каждой фракции на модели гипериммунной сыворотки, полученной против *M. bovis* штамм *Bovinus 8*) представлены на рисунке 7.

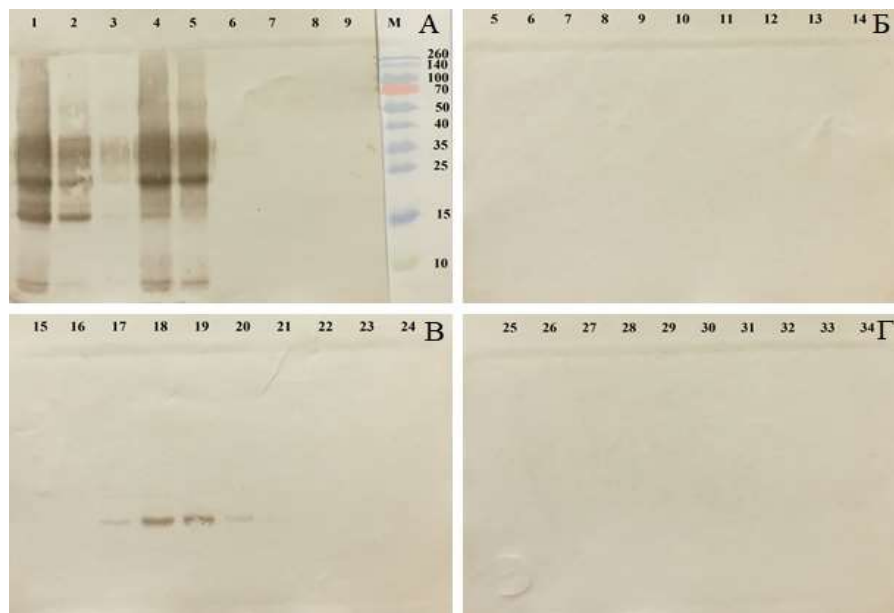


Рисунок 7 – Иммуноблот фракционированного материала на ДЭАЭ целлюлозе с использованием гипериммунной сыворотки против *Mycobacterium bovis*

Примечание: А – 1 гель; Б – 2 гель; В – 3 гель; Г – 4 гель; на части рисунка обозначенной литерой «А» 1 – супернатант первой промывки диализного мешка; 2 – супернатант второй промывки диализного мешка; 3 – супернатант третьей промывки диализного мешка; 4 – осадок супернатанта первой промывки диализного мешка; 5 – осадок супернатанта второй промывки диализного мешка; 6 – первая проба ДЭАЭ хроматографии; 7 – вторая проба ДЭАЭ хроматографии; 8 – третья проба ДЭАЭ хроматографии; 9 – четвертая проба ДЭАЭ хроматографии; М – маркер молекулярной массы Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; на части рисунка обозначенной литерами «Б», «В» и «Г» цифровое обозначение соответствует номерам проб

При помощи ионообменной хроматографии, был получен серологический активный антиген с молекулярной массой 16 кДа, который соответствовал фракциям с 17 по 20. При определении оптической плотности полученного антигена (UV 280 нм) содержание белка в этих фракциях установлено не было, что свидетельствует о минимальном показателе коэффициента экстинкции получаемого антигена.

В результате дальнейшего изучения подходов к получению серологически активных антигенов микобактерий установлено влияние SDS при хроматографии в 10 % ПААГ, в результате чего получены следующие данные:

- разделяющий гель и элюирующий буфер содержали 0,1 % SDS (рисунок 8),
- разделяющий гель не содержал, а элюирующий буфер содержал 0,1 % SDS (рисунок 9),
- разделяющий гель и элюирующий буфер не содержали SDS (рисунок 10).

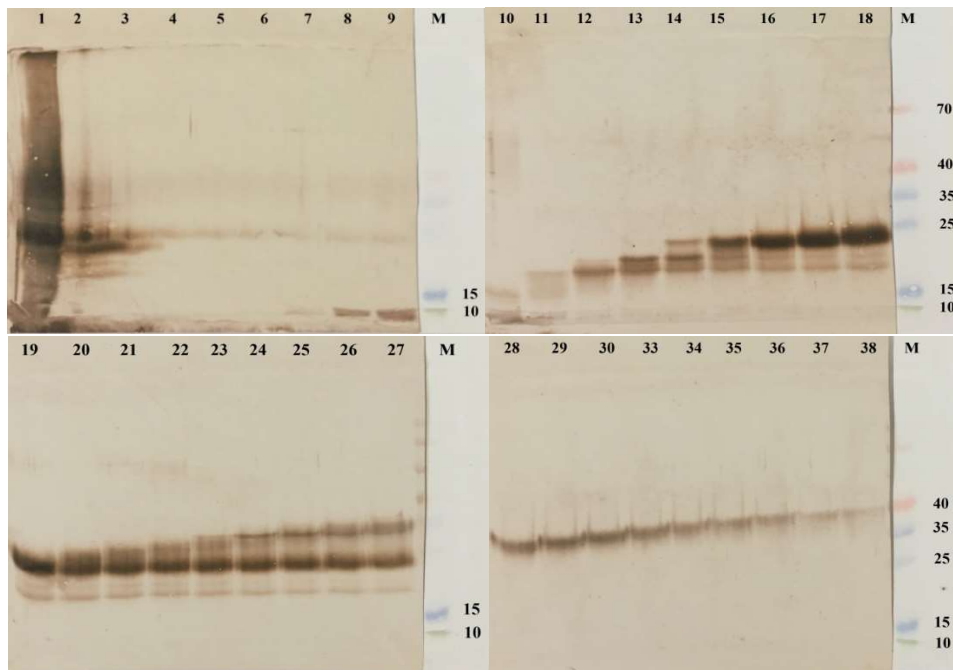


Рисунок 8 – Результаты иммуноблота, полученных после хроматографического разделения фракций (разделяющий гель и элюирующий буфер содержали SDS)

Примечание: 1 – исходная проба; 2-38 – фракции полученные в результате хроматографии; М – маркер молекулярной массы (ThermoFisher Science, США)

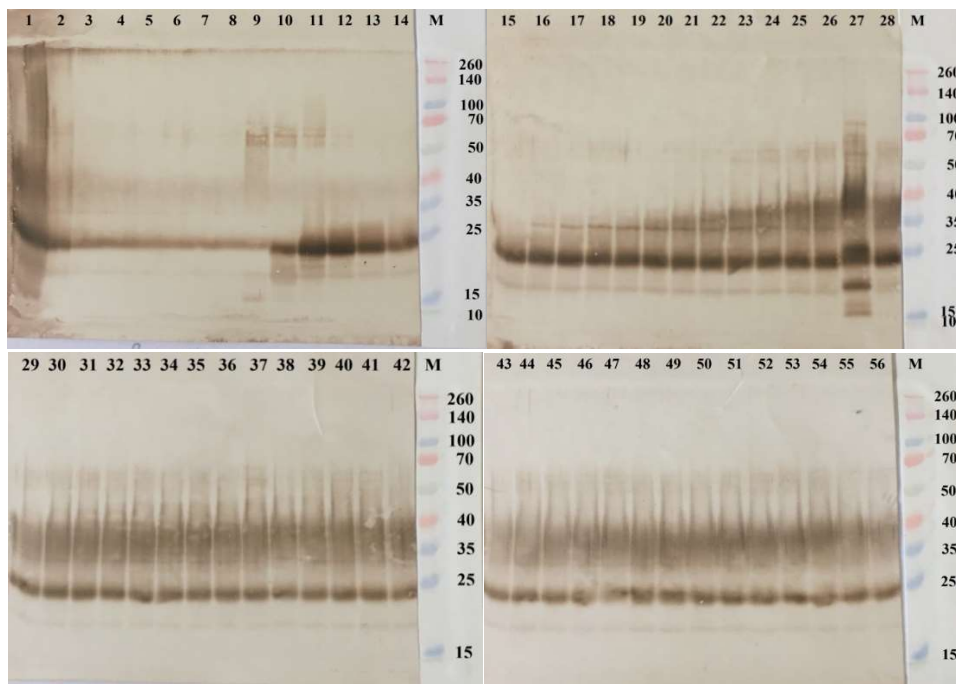


Рисунок 9 – Результаты иммуноблота, полученных после хроматографического разделения фракций (разделяющий гель не содержал SDS, элюирующий буфер содержал SDS)

Примечание: 1 – исходная проба; 2-38 – фракции полученные в результате хроматографии; М – маркер молекулярной массы (ThermoFisher Science, США)

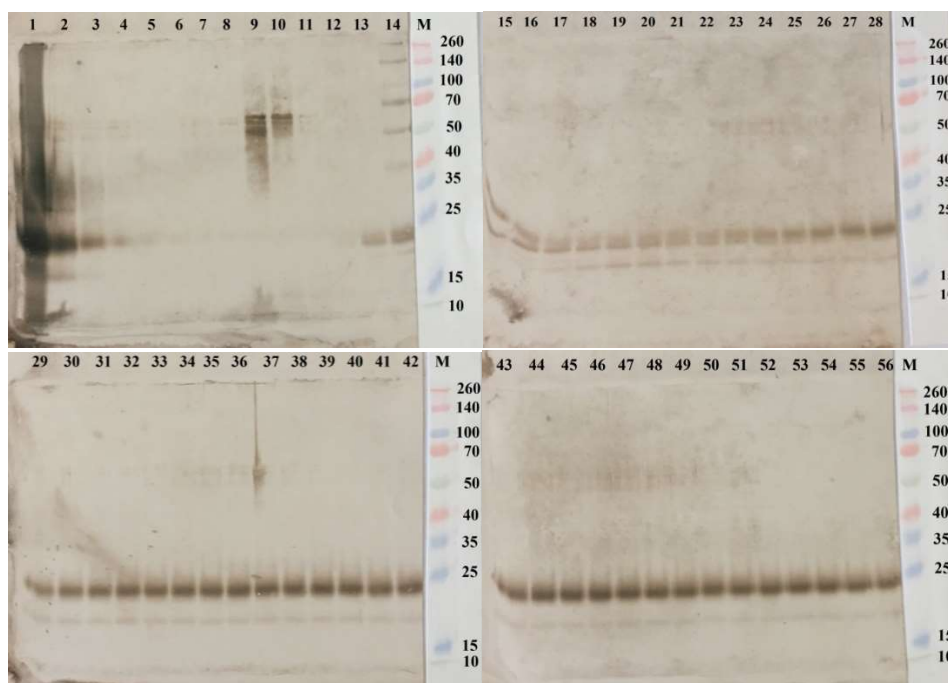


Рисунок 10 – Результаты иммуноблота, полученных после хроматографического разделения фракций (разделяющий гель и элюирующий буфер не содержали SDS)
 Примечание: 1 – исходная проба; 2-38 – фракции, полученные в результате хроматографии;
 М – маркер молекулярной массы (ThermoFisher Science, США)

Во фракциях хроматограммы представленной на рисунке 8 фракции с 6-й по 37-ю содержат иммуногенные антигены различной молекулярной массы.

Во фракциях хроматограммы представленной на рисунке 9 фракции с 8-й по 55-ю содержат иммуногенные антигены, доминирует фракция 22 кДа.

Хроматограмма представленная на рисунке 10 имела практически одинаковый профиль, количество полученных фракций составляло 55, доминирующая фракция также имела молекулярную массу 22 кДа.

Во всех трех хроматографиях зоны серологической активности начинались примерно с восьмой фракции, УФ детектор (длина волны 280 нм) не детектировал наличие белка, хотя серологическая активность нарастала, на основании чего было предположено, что это полипептиды, не содержащие триптофана, тирозина и цистеина. Особенно триптофана, учитывая, что степень оптической плотности аминокислоты триптофан = $5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, тирозин $1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и цистеин $120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Таким образом, использование в качестве матрицы 10% полиакриламидного геля и предварительного разрушения структуры белков до полипептидов с использованием детергентов и блокатора S-S связей позволило выделять полипептиды необходимой молекулярной массы. Выделение каждой фракции антигена определяется в том числе и пробоподготовкой исходного препарата бактериальной культуры.

Обобщая результаты наработки антигенов, нам удалось получить в достаточном количестве ЛАМ и различные антигены белковой природы, последние представленные на рисунке 11.

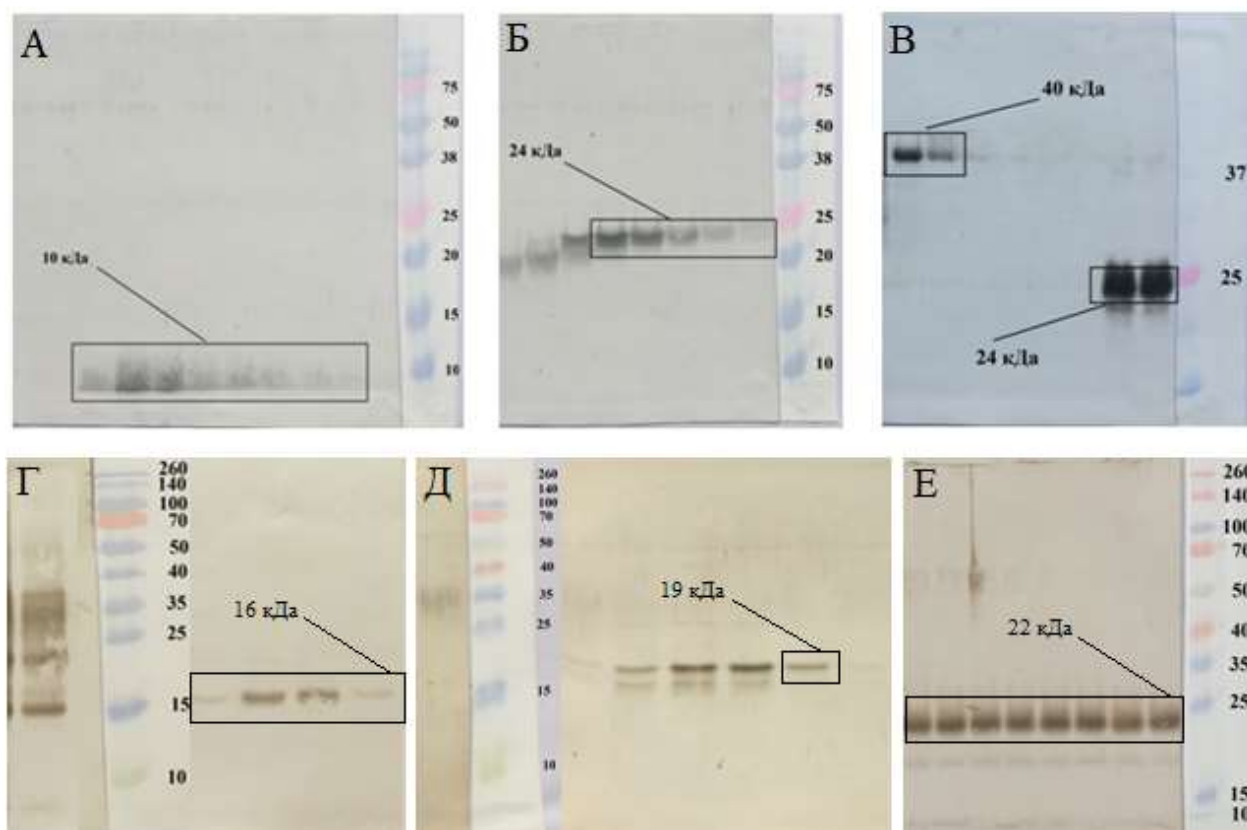


Рисунок 11 – Результат наработки антигенов *M. bovis*

Примечание: А – 12 % ПААГ электрофорез выделение антигенов с молекулярной массой 10 кДа; Б – 12 % ПААГ электрофорез выделение антигенов с молекулярной массой 24 кДа; В – 9% ПААГ электрофорез выделение антигенов с молекулярной массой 24 и 40 кДа, Г – хроматография с ДЭАЭ целлюлозой выделение антигенов с молекулярной массой 16 кДа; Д – хроматография с сорбентом «Сефадекс G 200» целлюлозой выделение антигенов с молекулярной массой 19 кДа; Е – 10 % ПААГ электрофорез выделение антигенов с молекулярной массой 22 кДа

Из обилия нативных антигенов удалось определить и наработать серологически активные антигены *M. bovis*, а для создания диагностического теста применяли антиген молекулярной массой 24 кДа.

Применение различных способов получения антигенов позволило подтвердить функциональную состоятельность антигенов различного происхождения – это и оригинальные антигены, выделенные из клеточной стенки микобактерий и продуктов секреции клеток в питательную среду, и цельные рекомбинантные антигены бруцелл, и короткие рекомбинантные антигены бруцелл и вируса артрита-энцефалита коз (содержащие аминокислотные последовательности 3-5 иммуногенных эпитопов целевого микроорганизма) и синтетические пептиды, соответствующие аминокислотным последовательностям иммуногенных эпитопов возбудителей бруцеллёза.

Каждый из описанных подходов к получению антигенов может быть достаточно ценным в зависимости от решаемых задач. Так при отсутствии возможности детально проработать дизайн антигенов, определить возможные перекрёстные реакции и определить в конкретных условиях какие именно антигены являются серологически активными – особо ценным будет подход к получению исходных антигенов непосредственно из бактериальных клеток или

вирионов. Если же антиген с наибольшей серологической активностью известен, но нет ясности, какие именно иммуногенные эпитопы будут наиболее эффективно связываться с детектируемыми антителами – объективно будет применять рекомбинантный синтез цельной аминокислотной последовательности антигена. И в ситуации, когда вся информация относительно иммуногенных эпитопов известна, для индикации специфичных антител хорошо подойдёт применение коротких рекомбинантных антигенов, в аминокислотной последовательности которых имеется последовательность иммуногенных эпитопов, либо применение аналогичных синтетических пептидов. Выбор между синтетическими пептидами и короткими рекомбинантными антигенами так же определяется особенностями технологического процесса: для рекомбинантных антигенов потребуется хроматографическая очистка получаемого белка, а для синтетического пептида такая очистка не требуется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая данные относительно эпизоотической ситуации в Российской Федерации за 2012-2022 гг. среди патологии крупного рогатого скота инфекционной природы уверенно доминирует лейкоз, бруцеллёз и лептоспироз. Так же на примере 2022 года по заразной патологии крупного рогатого скота, в порядке убывания (по числу заболевших животных), регистрировались следующие болезни: инфекционный ринотрахеит, заразный узелковый дерматит, колибактериоз, некробактериоз, бабезиоз, анаплазмоз, злокачественный отёк, эмфизематозный карбункул, пастереллёз, пироплазмоз, бешенство, парагрипп-3, хламидиоз, микоплазмоз, коронавирусная инфекция, псевдомоноз, сальмонеллёз, ротавирус, энтеротоксимия, сибирская язва и листериоз. Относительно мелкого рогатого скота 80% от случаев инфекционных заболеваний за 2012-2022 гг. в разные годы приходится на бруцеллёз, Висна-Маеди, оспу, энтеротоксимию, инфекционный эпидидимит, братзот, пастереллёз, хламидиоз и контагиозный пустулёзный дерматит.

Как в отношении перечисленных заболеваний, так и в отношении других патогенных микроорганизмов, представляющих экономическую и социальную угрозу, ведётся постоянных мониторинг, основой которого является определение специфических антител и выявление генетического материала искомого патогена. Так в представленном диссертационном исследовании раскрыты детали создания средств диагностики инфекционного ринотрахеита, патариппа-3, вирусной диареи, ящура, туберкулёза, бруцеллёза, сибирской язвы, классической чумы свиней, болезни Ауески, боррелиоза, клещевого энцефалита.

Детальное описание процесса разработки средств генетической и серологической диагностики перечисленных выше инфекционных заболеваний выполнено с целью представления и популяризации различных подходов к анализу различных электронных ресурсов, баз данных и «in silico» работе с потенциальными маркерами для индикации возбудителей инфекционных заболеваний и дизайну специфических компонентов реакции. Представленные в работе подходы к индикации нуклеиновых кислот описывают работы с

генами различной величины (от пестивирусов до микроскопических грибов и хромосом млекопитающих животных) и различной степенью полиморфизма (возбудители артрита-энцефалита коз и классической чумы свиней), различные подходы к визуализации результатов реакции (от классической электрофоретической детекции до технологий TaqMan и колориметрической изотермической амплификации), различные цели анализа генетической информации (от простой индикации до генотипирования и анализа нуклеотидного полиморфизма, ведущего к аминокислотному полиморфизму в области иммуногенных эпитопов иммунодоминантных антигенов), что полностью соответствует первым семи задачам диссертационного исследования.

Детальный анализ маркеров для серологической индикации специфических антител, включающий определение иммуногенных эпитопов антигенов, полиморфизма аминокислотной последовательности антигенов, их специфичность, физические свойства, наличие трансмембранных доменов, сигнальных пептидов, сайтов N- и O-гликозилирования, порог вариабельности и анализ консервативности антигенов, возможную коррекцию физических свойств позволили презентовать, каким должен быть порядок действий при дизайне синтетического или рекомбинантного антигена, а физическое получение таких антигенов позволило подтвердить функциональность полученных в результате дизайна антигенов, что (учитывая получение ряда антигенов микобактерий нативной природы) соответствует восьмой-одиннадцатой задачам диссертационного исследования.

Алгоритм омиксных исследований для диагностики инфекционной патологии сельскохозяйственных животных условно можно разделить на три самостоятельных последовательности действий наиболее эффективного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, а именно:

- анализ нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний с величиной генома до 10-20 тысяч пар нуклеотидов;
- анализ нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний с величиной генома более 10-20 тысяч пар нуклеотидов;
- анализ аминокислотных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний.

Так, последовательность действий при анализе относительно коротких нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний сводится к выравниванию полногеномных нуклеотидных последовательностей искомого микроорганизма, определению возможной гомологии маркерной нуклеотидной последовательности с гетерологичными нуклеотидными последовательностями, дизайну соответствующих праймеров и зондов и их проверке. Последовательность действий при анализе нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний с большим размером генома подразумевает поиск коротких нуклеотидных последовательностей искомого микроорганизма, определение гомологии анализируемой нуклеотидной последовательности с нуклеотидными

последовательностями гомо- и гетерологичных организмов, дизайн праймеров и зондов для амплификации специфичной маркерной нуклеотидной последовательности, проверку специфичности разработанных олигонуклеотидов. Последовательность действий при анализе аминокислотных последовательностей возбудителей инфекционных заболеваний сильно отличается от анализа нуклеотидных последовательностей и сводится к определению антигенного состава анализируемого микроорганизма, определению иммунодоминантных антигенов и иммуногенных эпитопов, характера полученного на них иммунного ответа, определению трансмембранных доменов, сайтов гликозилирования, сигнальных пептидов, анализу специфичности и отбору аминокислотных последовательностей с наиболее желаемыми показателями, с последующей корректировкой физических свойств аминокислотной последовательности и, в случае необходимости рекомбинантного синтеза антигена, добавление необходимых технических последовательностей и кодонной оптимизации (в случае необходимости), получению антигена и его проверке.

Описанные подходы к работе с последовательностями нуклеиновых кислот и аминокислот способствуют пониманию основных принципов работы, посвященной дизайну олигонуклеотидных и белковых молекул для индикации специфичных генетических и серологических маркеров инфекционных заболеваний и открывают перспективы работы в представленном направлении для создания средств индикации и других (не описанных в диссертационном исследовании) патогенов бактериальной, вирусной природы и микроскопических грибов.

Резюмируя описанные в диссертационном исследовании результаты были констатированы следующие заключения: консервативные участки нуклеотидных последовательностей целевых микроорганизмов позволяют разрабатывать способы их специфичной индикации методом полимеразной цепной реакции, что служит основой для создания соответствующих диагностических тестов для выявления генетических маркеров инфекционных заболеваний; анализ полиморфизма нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных заболеваний позволяет дифференцировать различные штаммы и изоляты в пределах одного вида, что может стать основой для точного и аргументированного проведения эпизоотического расследования и выяснения путей заноса инфекции в возникший неблагополучный пункт; получение антигенов для серологического выявления антител возможно в одном из трёх направлений: получение синтетических антигенов, получение рекомбинантных антигенов, очистка антигенов нативной природы из соответствующего возбудителя инфекционного заболевания, а выбор одного из перечисленных подходов зависит от конкретных задач и имеющихся условий. Исходя из чего была сформулирована одна из основных рекомендаций при работе по созданию средств специфической индикации ПБА, а именно необходимость детального информационного анализа множества вариантов потенциальных генетических и пептидных маркеров, с целью получения наиболее

эффективного инструмента для серологической либо генетической индикации искомого патогена. Подходы к такому анализу детально изложены в результатах представленного диссертационного исследования.

Анализируя полученные в диссертационном исследовании результаты установлено, что поставленная в исследовании цель и соответствующие задачи достигнуты, что позволило изложить следующие выводы:

1. Выявленные генетические маркеры возбудителей – клещевого энцефалита (non-structural protein – ген *NS3*, локус полипротеина), ящура (3' конец гена полипротеина), инфекционного ринотрахеита (ген *UL52*, ген белка *UL50*), вирусной диарей (5' UTR), парагриппа-3 (ген фосфопротеина), туберкулёза (16S ribosomal RNA, variable region RvD2), бруцеллёза (ген *BSCP31*, локус BAW_20982, локус C0R52_12390), болезни Ауески (ген гликопротеина D, ген гликопротеина C), классической чумы свиней (5' UTR region, 3'UTR region), боррелиоза (ген *flaB*, ген *ospA*), сибирской язва (локус CDS 2554, локусы плазмиды *pXO1* и *pXO2*), характеризуются минимальным полиморфизмом и идентичны максимальному количеству штаммов и изолятов идентифицируемого микроорганизма.

2. Разработаны олигонуклеотидные затравки для специфичной индикации нуклеиновых кислот возбудителей инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи – болезни слизистых, парагриппа-3 позволяющие проводить реакцию амплификации для выявления генетических маркеров респираторных заболеваний крупного рогатого скота в мультиплексном формате ПЦР-РВ.

3. Разработаны способы специфической индикации нуклеиновых кислот особо опасных, социально значимых и трансмиссивных инфекционных болезней животных – вирус ящура, возбудителей туберкулёза, бруцеллёза, сибирской язвы, классической чумы свиней, болезни Ауески, клещевого боррелиоза и вируса клещевого энцефалита.

4. Определены протеомные маркеры для серологической диагностики возбудителей бруцеллёза (иммуногенные эпитопы карбоксилтрансферазы, трансгликозилазы и канала секреции OMP2a – для синтетического пептида, дехалогеназы, лийцинсвязывающий домен, нитрат редуктазы и O-антигена – для рекомбинантных антигенов), туберкулеза (ЛАМ и антигены молекулярной массой 10, 16, 19, 22, 24 и 40 кДа) и артрита-энцефалита коз (мультиэпитопный протеин из антигенов *gag* и *env*).

5. Разработан синтетический пептид, для выявления иммунного ответа на присутствие антигенов возбудителей бруцеллёза в сыворотке крови восприимчивых животных, представляющий собой аминокислотную последовательность иммуногенных эпитопов антигенов карбоксилтрансферазы, Omp2a и трансгликозилазы.

6. Разработаны рекомбинантные антигены для выявления иммунного ответа на присутствие антигенов вируса артрита-энцефалита коз (состоящий из иммуногенных эпитопов антигенов *gag* и *env*) и возбудителей бруцеллёза в организме восприимчивых животных (один

антиген представляет собой аминокислотные последовательности иммуногенных эпитопов дехалогеназы, лейцин-связывающего домена, нитрат редуктазы, другой – О-антиген).

7. Определён антигенный профиль возбудителя туберкулёза (*Mycobacterium bovis*) и выделены соответствующие антигены молекулярной массой 10, 16, 19, 22, 24 40 кДа и ЛАМ, на которые формируется В-клеточный иммунный ответ крупного рогатого скота.

8. Описан алгоритм омиксных исследований для диагностики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, позволяющий наиболее эффективно подобрать порядок действий и выбрать ресурсы для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Полученные в ходе реализации диссертационного исследования результаты позволили сформировать следующие практические предложения и рекомендации: работы, связанные с анализом биологической информации (нуклеотидные, либо аминокислотные последовательности) желательно выполнять в соответствии с описанным в представленной работе (раздел заключение) алгоритмом омиксных исследований для диагностики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, что позволит повысить результативность биоинформационных исследований; для повышения достоверности анализа нуклеотидного либо аминокислотного полиморфизма необходимо выполнять сопоставление (выравнивание) анализируемых последовательностей для выявления максимально возможного числа изолятов и штаммов организмов с высокой степенью гомологии (по результатам BLAST-анализа); при выборе способа получения антигенов необходимо в первую очередь определить технологичность процесса его получения и определить возможность его постоянного получения; для проведения масштабных научных исследований экономически целесообразнее применять отдельные компоненты различных диагностических методов по сравнению с использованием коммерческих тестов; создание диагностических и вакцинных препаратов необходимо начинать с детального биоинформационного анализа в интересующей области.

Популяризация омиксных исследований, в том числе в виде представленных результатов диссертационного исследования, открывает перспективы дальнейшей разработки темы, в частности относительно самостоятельного применения указанных в результатах исследований способов индикации генетических и серологических маркеров инфекционных заболеваний для выполнения схожих исследовательских работ. Другой стороной перспектив разработки описанной темы является применение алгоритмов омиксных исследований для диагностики иных (не представленных в работе) инфекционных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в отечественных рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК

1. Дизайн и получение рекомбинантного мультиэпитопного антигена для индикации антител против вируса артрита энцефалита коз / Н. И. Хаммадов, А. Г. Галеева, М. Е. Горбунова,

- Г. Р. Сальманова, Е. А. Громова, А. И. Хамидуллина, М. А. Ефимова // Международный вестник ветеринарии. – 2025. – № 1. – С. 25-37.
2. Дизайн и применение синтетического пептида из иммуногенных эпитопов антигенов *Brucella abortus* для выявления антител против S-формы бруцелл / Н. И. Хаммадов, А. Г. Галеева, М. Е. Горбунова, А. И. Хамидуллина, Г. Р. Сальманова, М. А. Косарев, Р. И. Шангараев // Ветеринарный врач. – 2025. – № 3. – С. 91-97.
 3. Получение и определение серологической активности рекомбинантного О-антигена бруцелл, синтезированного в эукариотической системе экспрессии / Н. И. Хаммадов, Е. А. Громова, М. Е. Горбунова, А. Г. Галеева, М. А. Косарев, К. В. Усольцев, М. А. Ефимова // Международный вестник ветеринарии. – 2025. – № 3. – С. 37-46.
 4. Дизайн специфических олигонуклеотидов для выявления контаминации культур клеток возбудителем вирусной диареи и микоплазмами при разработке интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят / Н. И. Хаммадов, М. Е. Горбунова, М. А. Ефимова, К. В. Усольцев, Г. Р. Сальманова, Р. И. Шангараев, Е. Ю. Тарасова // Ветеринарный врач. – 2025. – № 3. – С. 98-104.
 5. Способ количественного определения вирусных нуклеиновых кислот для стандартизации условий производства интраназальной вакцины против респираторных болезней новорожденных телят / Н. И. Хаммадов, М. Е. Горбунова, Е. Ю. Тарасова, Р. И. Шангараев, Л. Ш. Дуплева, К. В. Усольцев, М. А. Ефимова // Международный вестник ветеринарии. – 2025. – № 4. – С. 15-19.
 6. Хаммадов, Н. И. Определение специфичности мультиэпитопного рекомбинантного антигена для индикации антител против вируса артрита-энцефалита коз / Н. И. Хаммадов // Ветеринарный врач. – 2025. – № 6. – С. 99-103.
 7. Хаммадов, Н. И. Анализ распределения иммуногенных эпитопов в структуре антигенов *Brucella abortus* / Н. И. Хаммадов // Ветеринарный врач. – 2025. – № 6. – С. 104-108.
 8. Хаммадов, Н. И. Получение рекомбинантного антигена для серологической диагностики бруцеллеза / Н. И. Хаммадов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2025. – Т. 263, № 3. – С. 100-105.
 9. Разработка ПЦР тест-системы для индикации нетуберкулезных микобактерий в биологических образцах и окружающей среде / Р. Х. Равилов, Д. Н. Мингалеев, Н. И. Хаммадов, А. Г. Галеева, Ю. Р. Камалиева, А. И. Трубкин, М. А. Ефимова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2024. – Т. 260, № 4. – С. 200-205.
 10. Конструирование специфических праймеров для ПЦР-диагностики классической чумы свиней / Н. И. Хаммадов, М. Е. Горбунова, Г. Р. Сальманова, Н. А. Фахрутдинов, А. М. Гулюкин, А. Г. Галеева, Е. А. Громова // Ветеринарный врач. – 2024. – № 3. – С. 41-46.

11. Нуклеотидный полиморфизм гена G производственного штамма вируса бешенства «Овечий ВГНКИ» / А. Г. Галеева, Н. И. Хаммадов, З. З. Алеева, К. В. Усольцев, Ш. М. Насыров, Г. С. Арутюнян, К. А. Осянин, М. А. Ефимова // Ветеринария. – 2024. – № 2. – С. 13-18.
12. Иммунохроматографический тест для выявления противотуберкулёзных антител / Н. И. Хаммадов, К. С. Хаертынов, Р. М. Ахмадеев, Р. И. Шангараев, К. В. Усольцев, А. И. Хамидуллина, А. Г. Галеева // Международный вестник ветеринарии. – 2023. – № 4. – С. 14-20.
13. Анализ геномов респираторных вирусных биопатогенов крупного рогатого скота и оптимизация единых условий ПЦР для их индикации / К. А. Осянин, Н. И. Хаммадов, Н. А. Фахрутдинов, Т. Х. Фаизов, Э. А. Магдеева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2018. – Т. 236, № 4. – С. 150-155.

Статьи в научных изданиях, входящих в базы данных Scopus

14. A case of laying hens mycosis caused by *Fusarium proliferatum* / R. M. Potekhina, E. Yu. Tarasova, L. E. Matrosova, N. I. Khammadox, A. M. Saifutdinov, O. K. Ermolaeva, S. A. Tanaseva, N. N. Mishina, G. N. Nigmatulin, A. Z. Mukharlyamova, S. Yu. Smolentsev, E. I. Semenov // *Veterinary Medicine International*. – 2023. – Vol. 2023. – P. 5281260.
15. Хаммадов, Н. И. Подбор генетических маркеров для выявления ДНК патогенных боррелий / Н. И. Хаммадов, А. И. Хамидуллина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 2. – С. 134-141.
16. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов / Е. А. Анисимова, Н. А. Фахрутдинов, Д. А. Миргазов, Е. А. Додонова, И. А. Елизарова, М. Е. Горбунова, Н. И. Хаммадов, Л. И. Зайнуллин, К. А. Осянин // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26, № 6. – С. 560-567.
17. Хаммадов, Н. И. Поиск генетических маркеров вируса клещевого энцефалита для его специфичной индикации / Н. И. Хаммадов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 122-128.
18. Сполиготипирование туберкулезных микобактерий, выделенных от человека и крупного рогатого скота / Н. И. Хаммадов, Т. Х. Фаизов, К. А. Осянин, А. В. Хаммадова, К. С. Хаертынов, Э. А. Шуралев // Туберкулез и болезни легких. – 2020. – Т. 98, № 3. – С. 13-18.
19. Хаммадов, Н. И. Генетические маркеры вируса ящура крупного рогатого скота, геномный анализ / Н. И. Хаммадов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 2. – С. 111-116.
20. Evaluation of the Effectiveness of Genetic Markers of Mycobacteria for Assessing the Disinfection Quality by Viability Real Time PCR / N. I. Khammadox, E. A. Shuralev, N. M. Aleksandrova, A. V. Khammadox // *BioNanoScience*. – 2019. – Vol. 9, No. 4. – P. 918-927.

21. Indication and Identification of Bacillus anthracis Isolates from the Middle Volga Region by Multi-Primer PCR / N. M. Aleksandrova, I. A. Rogozhina, T. K. Faizov, N. I. Khammadox, E. A. Shuralev, A. V. Vasileva // BioNanoScience. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – P. 434-440.
22. Маркерные локусы генома бруцелл для дифференциальной ПЦР индикации патогенных штаммов / Н. И. Хаммадов, К. А. Осянин, К. В. Усольцев, А. В. Хаммадова, К. С. Хаертынов, Э. А. Шуралев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 3. – С. 88-93.

Патенты РФ

23. Патент № 2811034 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/00, А61К 39/04, G01N 33/531. Способ получения антигена из *Mycobacterium bovis* Bovinus-8 штамм 700201 молекулярной массой 24 кДа для изучения гуморального иммунного ответа : № 2023110770 : заявл. 25.04.2023 : опубл. 10.01.2024 / Н. И. Хаммадов, К. А. Осянин, А. Г. Галеева, Р. М. Ахмадеев, К. С. Хаертынов, Р. И. Шангараев, Н. А. Фахрутдинов, А. В. Москвичёва, М. А. Ефимова, К. В. Усольцев ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности".
24. Патент № 2765829 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Набор высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для детекции и дифференциации нетуберкулезных микобактерий : № 2021111909 : заявл. 27.04.2021 : опубл. 03.02.2022 / Ю. Р. Камалиева, Д. Н. Мингалеев, Р. Х. Равилов, М. А. Ефимова, Н. И. Хаммадов ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».
25. Патент № 2668829 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ проведения аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллельным вариантам АА, КК и ак гена фермента диацетил-глицерин о-ацетил трансферазы для определения наследуемости жирномолочности : № 2013141659 : заявл. 10.09.2013 : опубл. 02.10.2018 / К. В. Усольцев, Т. Х. Фаизов, И. И. Усольцева, Р. Р. Шайдуллин, Н. И. Хаммадов, Ф. С. Сибгатуллин, Г. С. Шарафутдинов ; заявитель Общество с ограниченной ответственностью "Научно-производственная фирма Биогентехнология-форте" (ООО "НПФ Биогентехнология-форте").

Публикации в других изданиях

26. Хаммадов, Н. И. Генетические маркеры для ПЦР-диагностики классической чумы свиней / Н. И. Хаммадов, М. Е. Горбунова, Г. Р. Сальманова // Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2024 : Сборник тезисов Конгресса с международным участием, Москва, 16–17 апреля 2024 года. – Москва Moscow: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, 2024. – С. 122-123.

27. Поиск генетических маркеров вируса болезни Ауески / Н. И. Хаммадов, М. Е. Горбунова, К. В. Усольцев, Н. А. Фахрутдинов, А. И. Хамидуллина, А. Г. Галеева // Современные научно-практические достижения в ветеринарии : сборник статей XXIII Международной научно-практической конференции, Киров, 19–20 апреля 2024 года. – Киров: Вятский государственный агротехнологический университет, 2024. – С. 300-304.
28. Поиск генетических маркеров для индикации пестивирусов свиней / Н. И. Хаммадов, М. Е. Горбунова, Р. И. Шангараев [и др.] // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2024. – Т. 13, № 1. – С. 260-264.
29. Выявление противотуберкулёзных антител методом иммунохроматографического анализа / Н. А. Фахрутдинов, А. И. Хамидуллина, Р. И. Шангараев, К. С. Хаертынов, Н. И. Хаммадов, М. А. Ефимова // Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности : Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Казань, 23–24 ноября 2023 года. – Казань, 2023. – С. 191-193.
30. Хаммадов, Н. И. Контрольные антигены в иммунохроматографическом анализе / Н. И. Хаммадов, А. И. Хамидуллина, М. А. Ефимова // Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности : Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Казань, 23–24 ноября 2023 года. – Казань, 2023. – С. 75-78.
31. Хаммадов, Н. И. ПЦР-индикация ДНК маркеров вирусов медоносной пчелы / Н. И. Хаммадов, А. В. Хаммадова // Молекулярная диагностика : Сборник трудов X юбилейной международной научно-практической конференции, Москва, 09–11 ноября 2021 года. Том 2. – Тамбов: Общество с ограниченной ответственностью фирма "Юлис", 2021. – С. 360-361.
32. Khammadox, N. I. Genetic Polymorphisms of Foot-and-Mouth Disease Virus / N. I. Khammadox // Some RNA Viruses. Intech Open. – London, 2021. P. 67-77. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93351>.
33. Генетические маркеры возбудителей особо опасных заболеваний характеризующихся природной очаговостью / Н. И. Хаммадов, К. А. Осянин, Т. Х. Фаизов, Н. А. Фахрутдинов, И. Н. Камалдинов, К. В. Усольцев // Ветеринарный врач. – 2020. – № 1. – С. 67-73.
34. Специфичные нуклеотидные последовательности генома бруцелл для видовой ПЦР индикации / К. А. Осянин, Н. И. Хаммадов, Д. А. Миргазов, М. А. Косарев, А. В. Софронова // Ветеринарный врач. – 2020. – № 2. – С. 39-44.
35. Генетический полиморфизм вируса ящура / Н. И. Хаммадов, А. И. Хамидуллина, К. В. Усольцев, Т. Х. Фаизов // Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2020 : Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. Сборник

- материалов, Москва, 06–08 октября 2020 года. – Москва: Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. – С. 247-248.
36. Хаммадов, Н. И. Определение видовой принадлежности туберкулезных микобактерий, инфицирующих человека и крупный рогатый скот / Н. И. Хаммадов // Физико-химическая биология как основа современной медицины : тезисы докладов участников Республиканской конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения В. А. Бандарина, Минск, 24 мая 2019 года / Белорусский государственный медицинский университет. Том Часть 2. – Минск: Белорусский государственный медицинский университет, 2019. – С. 127-128.
37. Молекулярно-генетический контроль патогенных микобактерий / К. А. Осянин, Т. Х. Фаизов, К. В. Усольцев, Н. И. Хаммадов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины : Материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина, Казань, 05–06 апреля 2018 года. – Казань: Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, 2018. – С. 240-243.
38. Физико-химические показатели полипептидов антигенных детерминант *Mycobacterium bovis* BQ2027_MB2900 ген-локус зависимого белка и их модификаций / Н. И. Хаммадов, Э. А. Шуралев, К. А. Осянин, К. В. Усольцев, Т. Х. Фаизов // Молекулярная диагностика 2018 : Сборник трудов Международной научно-практической конференции, Минск, 27–28 сентября 2018 года. – Минск: СтройМедиаПроект, 2018. – С. 518-519.
39. Дифференциальная диагностика туберкулеза у человека и животных с применением мультиплексной тест-системы / Н. М. Александрова, Н. И. Хаммадов, Э. А. Шуралев, И. А. Елизарова // Молекулярная диагностика 2017 : сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 18–20 апреля 2017 года. Том 1. – Москва: ООО фирма "Юлис", 2017. – С. 493.