УДК 616.981.51:616.9-093

КРИЛЕНКО С.Ю.*, e-mail: *krilenko@ukr.net,*
БАБКІНА М.М., e-mail: *pharmwork@ukr.net,*
ТЕРЕЩЕНКО С.М., e-mail: *tereschen@ukr.net*,
ЗОЦЕНКО І.А., e-mail: *irazotz@ukr.net,*
САПЕЙКО В.П., канд. вет. наук, e-mail: *v.sapeyko@ukr.net,*
ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: *ast97@ukr.net,*
ГУДЗЬ Н.В., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: *gudznataly@gmail.com,*
ГАЛКА І.В.,канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: *Ptica2005@ukr.net*
Інститут ветеринарної медицини НААН

ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВАКЦИННИХ ШТАМІВ ЗБУДНИКА СИБІРКИ

В статті наведені результати вивчення молекулярно-генетичних властивостей та варіабельності геному вакцинних штамів збудника сибірки у порівнянні із сапрофітними бактеріями роду Bacillus. Підібрано праймери комплементарнігіперваріабільним послідовностям хромосомної ДНК, які дозволяють отримати штамоспецифічніелектрофореграми продуктів ампліфікації, що характеризуються наявністю як загальних так і специфічних фрагментів. Ці фрагменти розрізняються за молекулярною вагою та мають видову та штамову специфічність.Отримані результати можуть бути використані для диференціювання вакцинних штамів збудника сибірки від сапрофітних бактерій а також для контролювання можливих генетичних змін в процесі культивування.

***Ключові слова*:** *збудник сибірки, полімеразна ланцюгова реакція, молекулярно-генетичні властивості.*

Вступ. Сибірка є одним з найбільш поширених антропозоонозних інфекційних захворювань, що викликає значні економічні збитки та являє собою значну небезпеку здоров'ю людей [1–6].

Майже до середини XX століття сибірка була однією з найбільш поширених особливо небезпечних інфекційних хвороб. Щорічно від неї гинуло величезне число сільськогосподарських тварин і виникали масові захворювання людей [4, 7, 8]. Недотримання елементарних правил знешкодження трупів загиблих від сибірки тварин, контамінаціяґрунтусибіркових поховань значної частини території України в минулі роки були однією з головних причин збереження інфекції, формування стаціонарно неблагополучних пунктів та підтримання їх епізоотичної активності протягом наступних років [5, 7–9].

В даний час, незважаючи на успіхи, досягнуті в боротьбі з сибіркою, захворювання тварин і людей періодично реєструються в Україні у вигляді спорадичних випадків, останній з яких відбувся 2017 році.

*Аспірант, науковий керівник – канд. вет. наук, **О.А. Тарасов О.А.**

Сьогодні для вивчення генетичних особливостей мікроорганізмів використовуються молекулярно-генетичні методи, одним з яких є так званий «RAPD-fingerprint» [2–11], де застосовуються універсальні праймери, які ампліфікують повторювані регіони геному мікроорганізму, в результаті чого отримують специфічний профіль продуктів ПЛР. Такийпрофіль, як правило, специфічний для виду або для штаму. Повторювальні регіони геному володіють більшою мінливістю, ніж інші геномні регіони та використовуються для аналізу генетичних відносинміж штамами одного виду, а також для контролювання стабільності геному [13–16].

Вивчення молекулярно-генетичних особливостей збудника є актуальним для створення високочутливих, специфічних діагностичних тест-систем. Важливим є розроблення методів контролювання генетичної варіабельності вакцинних штамів, що має прямий вплив на якість засобів специфічної профілактики [11, 13–16].

Мета роботи. Вивчення генетичної варіабельності генома вакцинних штамів *Bacillusanthracis*. Підібрати специфічні праймеридля вибіркової ампліфікації різних фрагментів генома збудника сибірки та оптимізувати умови проведення ПЛР для диференціювання штамів *B. anthracis*та сапрофітних мікроорганізмів роду *Bacillus.*

Матеріали та методи досліджень. В роботі використовували вакцинні штами *B. anthracis* СН 05,UA-07, UA-M, а також спороутворюючі сапрофітні бактерії роду *Bacillus: B.anthrocoides 96, B.cereus ATCC 10702, B.subtilis 7241*.

Всі вказані штами отримані із музею лабораторії з вивчення сибірки ІВМ НААН.

Для культивування мікроорганізмів використовували щільні та рідкі живильні середовища: бульйон МПБ, бульйон Хоттингера, МПА, агар Хоттингера. Спори штамів засівали в пробірки із відповідним живильним середовищем та інкубували 18 годин за температури (37±0,2)°С. Отриману культуру засівали на поверхню поживного агару в чашках Петрі та інкубували 24–48 годин до отримання росту колоній.

Виділення ДНК проводили за допомогою набору «ДНК сорб» згідно інструкції виробника. ПЛР здійснювали за загальноприйнятим протоколом [16] із застосуванням ампліфікатора «Терцик»(РФ).

Генотипування хромосомної ДНК було проведено з використанням чотирьох специфічних олигонуклеотидних праймерів довжиною 20–22 нуклеотидів (RAPD-fingerprint) [10, 16]:

1. 5'-CGAAAGCGGCTTACTGGCTT-3':
2. 5'-TTGAGATTAGCTCCCCTT C ACAG-3':
3. 5 -TTCTAAATTAGTTACTCGTGCA-3':
4. 5 -AATAAACTGTATTCT CTA GCCA-3'.

Аналіз продуктів ампліфікації проводився шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5% гелі агарози. Після охолодження розплавленої агарози до 55–60° С додавали 0,003 см^3 розчину броміду етидію і перемішували. Агарозний гель заливали у форму (товщиною 5–6 мм) і формували за допомогою гребінок

лунки для внесення зразків. Оскільки реакційна суміш ПЛР вже містила гліцерин та маркерний барвник ксиленціанол, зразки додавали безпосередньо в лунки та проводили електрофорез.

Смуги готового гелю розміщували в електрофоретичній камері так, щоб лунки були звернені убік негативного електрода. У середні лунки вносили по 0,001 $см^3$ зразків реакції ампліфікації, а в крайні по 0,0007 $см^3$ відповідних маркерів. Електрофорез проводили у градієнті напруги 10 В/см до того моменту, як барвник (ксиленціанол) проходив приблизно половину довжини гелю.

Розташування смуг ДНК на отриманій електрофореграмі переглядали на трансіллюминаторі під ультрафіолетовим випромінюванням. Електрофореграму фотографували за допомогою цифрової фотокамери „А530" (Canon).

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень нами було оптимізовано режим проведення ПЛР, а саме: денатурація ДНК (94°С – 1 хв), відпал (38°С – 3 хв) ампліфікація (72°С – 3 хв), всього 40 циклів. За умови зниженої температури відпалу спостерігається більша вираженість мажорних полосок.

Праймери, використані в дослідах дозволяють ампліфікувати окремі ділянки геному різних штамів бацил. Чотири застосованих праймери утворювали характерний для роду набір мажорних та мінорних фрагментів ДНК, які відрізнявся від відповідного набору ампліфікатівбактерій сибірки.

Використані праймери №1 та №2ампліфікували набір мажорних та мінорних фрагментів у вигляді 3–5 смужок розміром від 800 до 2840 н.п (табл. 1). Набір ПЦР-фрагментів за мажорними смугами буводнаковий для всіх досліджених штамів збудника сибірки та складав 1,0; 1,5; 1,9; 2,3; 2,8 тис н.п. В той же час спороутворюючі сапрофіти значно відрізнялись за ампліфікованими фрагментами (*B.anthracoides* 96 – 0,8; 1,2; 1,5; 2,8 тис н.п.; *B.subtilis* – 1,2; 1,5; 1,7; 1,9 тис н.п.). За порівняння електрофореграм виявлено один загальний для всіх досліджених штамів фрагмент розміром 1,5 тис н.п., який був відсутній лише у *B. cereus,* розмір якого складав 1,4 тис. п.н.

Спороутворюючі сапрофіти (*B.cereus, B.subtilis*) утворювали два специфічних фрагменти розміром 1,2 и 1,7 тис н.п., фрагмент розміром 1,2 тис н.п. був виявлений у всіх трьох досліджених сапрофітів, але був відсутній у вакцинних штамів збудника сибірки.

За використання праймерів № 3 та № 4 виявлені від 3 до 5 добре виражених смужок, які є специфічними для досліджених штамів збудника сибірки та сапрофітних спороутворюючих мікроорганізмів. Розміри фрагментів складали від 0,5 до 2,1 тис. п.н. (табл.2).

Таблиця1

Результати ПЛР з універсальними праймерами № 1 та № 2 (розмір продуктів у тис.п.н.)

№ фрагменту	*B. anthracis*CH-05	*B. anthracis* UA-07	*B. anthracis* UA-M	*B.cereusATCC 10702*	*B.anthracoides 96*	*B.subtilis 7241*
1	2,8	2,8	2,8	-	2,8	-
2	2,3	2,3	2,3	-	-	-
3	1,9	1,9	1,9	-	-	1,9
4	-	-	-	1,7	-	1,7
5	1,5	1,5	1,5	-	1,5	1,5
6	-	-	-	1,4	-	-
7	-	-	-	1,2	1,2	1,2
8	1,0	1,0	1,0	-	-	-
9	-	-	-	0,8	0,8	-

За використання праймерів № 3 та № 4 виявлено відмінності спороутворюючих сапрофітів від сибіркових вакцинних штамів (*B. cereus*–0,7; 1,0; 1,3; 2,1 тис. п.н.; *B.anthracoides 96*–0,7; 1,0; 1,3; 1,5; 2,1 тис. п.н.; *B.subtilis7241*–0,5; 1,1; 1,7; 2,1 тис. п.н.). Необхідно відзначити, що за порівняння електрофореграмампліфікатів досліджуваних мікроорганізмів виявлено загальні фрагменти розміром 1,0 та 1,5 тис. п.н. Спороутворюючі сапрофіти *B. cereus* та *B. Anthracoides* мали п’ять загальних фрагментів розміром 0,7; 1,0; 1,3та 2,1 тис. п.н. Фрагмент розміром 1,9тис.п.н. був виявлений у всіх трьох вакцинних штамів збудника сибірки, але у інших досліджуваних мікроорганізмів був відсутній.

Таблиця2

Результати ПЛР з універсальними праймерами № 3 та № 4 (розмір продуктів в тис. п.н.)

№	*B. anthracoides 96*	*B. subtilis 7241*	*B.cereus ATCC 10702*	*B. anthracis*CH-05	*B. anthracis* UA-07	*B. anthracis* UA-M
1	2,1	2,1	2,1	-	-	-
2	-	-	-	1,9	1,9	1,9
3	-	1,7	-	-	-	-
4	1,5	-	-	1,5	1,5	1,5
5	1,3	-	1,3	-	-	-
6	-	1,1	-	-	-	-
7	1,0	-	1,0	1,0	1,0	1,0
8	0,7		0,7	-	-	-
9	-	0,5	-	-	-	-

При цьому всі досліджені штами збудника сибірки не відрізнялись між собою. У всіх досліджених вакцинних штамів виявлено три загальних фрагмента розміром 1,9;1,5 та 1,0тис. п.н.

Таким чином, універсальні праймери, що комплементарні варіабельним повторам, дозволяють здійснити диференціювання вакцинних штамів збудника сибірки від сапрофітних мікроорганізмів та перевірити наявність контамінації в процесі підготування культур при виробництві вакцини за допомогою ПЛР та можуть бути використані для диференціації, контролю та паспортизації виробничих вакцинних штамів.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. В результаті проведених досліджень з використанням специфічних праймерів отримано штамоспецифічні картини електрофореграм. Кожний досліджений штам характеризувався наявністю як загальних, так і індивідуальних фрагментів ДНК, що відрізнялись за молекулярною масою та специфічністю.

2. Методи полімеразної ланцюгової реакції, дозволяють виявити генетичну варіабельність вакциних штамів збудника сибірки (штами СН 05, UA07, UA-M) та диференціювати їх від сапрофітних мікроорганізмів роду *Bacillus.*

3. Фрагменти ДНК вакциних штамів збудника сибірки специфічно ампліфікуються з праймерами, комплементарними гіперваріабільним послідовностям інсерційного елемента хромосомної ДНК, розташування якої має родову та видову специфічність. Метод може бути використаним для контролювання варіабільності штамів в процесі культивування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hoffmaster A.R. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak United States / A.R. Hoffmaster, C.C. Fitzgerald, E. Ribot [et al] // Emerg.Infect.Dis. – 2002. – № 8 (10). – P. 1111–1116.

2. Lista F. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25- loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis / F. Lista, G. Faggioni, S. Valjevac // BMC Microbiol. – 2006. – № 6(1). – P. 33.

3. Цыбанова Л.Я. Дифференциация вакцинных штаммов сибирской язвы с помощью ПЦР / Л.Я. Цыбанова, Ю.О. Селянинов, Д.В. Колбасов // Материалы конференции Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных. – Владимир. обл., пос. Вольгинский, 1998. – С. 313–314.

4. Цыбанова Л.Я. Геномный полиморфизм возбудителя сибирской язвы / Л.Я. Цыбанова, Ю.О. Селянинов, Д.В. Колбасов // Материалы конференции Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных. – Владимир. обл., пос. Вольгинский, 1998.– С. 316–318.

5. Колбасов Д.В Современные подходы типирования патогенных микоплазм и возбудителя сибирской язвы / Д.В. Колбасов, С.Ж. Цыбанов // Материалы конференции Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных. – Владимир. обл., пос. Вольгинский, 1998. – С. 321–323.

6. Степанов А.С. Молекулярные механизмы, лежащие в основе ранних стадий инфекции *Bacillus anthracis*и разработка новых вакцин / А.С. Степанов, Л.И. Маринин, М.Ф. Болотникова // Вест. Рос. Акад. Мед. Наук. – 1997. – №6. – С.16.

7. Yanenko U. Study of *B. anthracis* UA-07 vaccine strain pathogenicity factors' changes after lyophilization / U. Yanenko, O. Tarasov, N. Hudz, S. Tereshchenko // Науковий вісник

Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. – 2014. – № 201 (1). – С. 192–195.

8. Cherif A. Genetic relationship in the '*Bacillus cereus* group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment / A. Cherif, L. Brusetti, S. Borin [et al]. // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 94. – P. 1108–1119.

9. Hansen B.M. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells / Hansen B.M., T.D. Leser, N.B. Hendriksen // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – Vol. 202. – P.209–213.

10.Brumlik M.J. Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains / M.J. Brumlik, U. Szymajda, D. Zakowska, X. Liang, R.J. Redkar, V.G. Del Vecchio // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67. –P. 3021–3028.

11. Kim W. Genetic relationships of *Bacillus anthracis* and closely related species based on variable-number tandem repeatanalysis and BOX-PCR genomic fingerprinting / W. Kim, Y.-P. Hong, J.-H. Yoo [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – Vol. 207. – P. 21–27.

12. Helgason E. *Bacillus anthracis, Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis ofgenetic evidence / E. Helgason, O.A. Okstad, D.A. Caugant [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66. – P. 2627–2630.

13. Куликова В.В. Етіологічна структура лептоспірозу свиней у господарствах України / В.В. Куликова, А.В. Пискун, В.В. Уховський, П.В. Шарандак // Вет. біотехнологія: бюл. – 2016. – № 28. – С. 125–133.

14. Галка І.В. Ізоляція *Clostridium difficile* з клінічного матеріалу від свиней / І.В. Галка, О.В. Рудой, Л.М. Музикіна [та ін.] // Вет. біотехнологія: бюл. – 2016. – № 28. – С. 20–26.

15. Жовнір О.М. Моніторинг некробактеріозу, основний видовий спектр мікробних асоціацій за участі F. necrophorum та специфічні засоби профілактики / О.М. Жовнір, О.І. Горбатюк, В.О. Андріящук [та ін.] // Вет. біотехнологія: бюл. – 2015. – № 27. – С. 113–121.

16. Бабкіна М.М. Чутливість мікроорганізмів роду *Bacillus* до антимікробних речовин invitro / М.М. Бабкіна, О.А. Тарасов, С.А. Ничик [та ін.] // Вет. біотехнологія: бюл. – 2015. – № 27. – С. 226–231.

17. Тарасов О.А. Вплив молекулярно-генетичних особливостей *Streptococcus suis* на його вірулентні властивості // О.А. Тарасов, В.П. Сапейко [та ін.] // Вет. біотехнологія: бюл. – 2014. – № 25. – С. 111–115.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ / Крыленко С.Ю., Бабкина М.М., Терещенко С.М., Зоценко И.А., Сапейко В.П., Тарасов А.А., Гудзь Н.В., Галка И.В.

В статье приведены результаты изучения молекулярно-генетических свойств и вариабельности генома вакцинных штаммов возбудителя сибирской язвы по сравнению с сапрофитными бактериями рода Bacillus. Подобраны праймеры комплементарные и гипервариабильным последовательностям хромосомной ДНК, которые позволяют получить штаммоспецифические электрофореграммы продуктов амплификации, характеризующиеся наличием как общих, так и специфических фрагментов. Эти фрагменты различаются по молекулярному весу и имеют видовую и штаммовую специфичность. Полученные результаты могут быть использованы для дифференцирования вакцинных штаммов возбудителя сибирской язвы от сапрофитных бактерий, а также для контроля возможных генетических изменений в процессе культивирования.

Ключевые слова: *возбудитель сибирской язвы, полимеразная цепная реакция, молекулярно-генетические свойства*

STUDY OF MOLECULAR GENETIC PROPERTIES OF VACCINE STRAINS OF ANTHRAX / Krylenko S.Yu., Babkina M.M., Tereschenko S.M., Zotsenko I.A., Sapeiko V.P., Tarasov O.A., Hudz N.V., Halka I.V.

Introduction. *Molecular-genetic methods widely used to study the genetic peculiarities of microorganisms, one of which is the so-called "RAPD-fingerprint" method, based on using universal short primers that amplify repeating regions of the genome of a microorganism, creating the specific profile of PCR products.*

The goal of the work. *To evaluate the genetic variability of vaccine strains of Bacillus anthracis and saprophytic microorganisms. To choose specific primers for selective amplification of hypervariable fragments of the genome of the anthrax and to optimize the PCR conditions for the differentiation of B. anthracis strains and saprophytic microorganisms of the Bacillus genus.*

Materials and methods. *The vaccine strains B. anthracis CH 05, UA-07, UA-M, and selection of spore-forming saprophytic bacteria of genus Bacillus were used: B. anthrocoides 96, B. cereus ATCC 10702, B. subtilis 7241. The genotyping of chromosomal DNA was performed using four Specific oligonucleotide primers with a length of 20–22 nucleotides (RAPD-fingerprint).*

Results of research and discussion. *The regimes of PCR were optimized. The used primers amplified a set of major and minor fragments of 3–5 major strips with the size from 800n.b.to 2840 n.b. The set of PCR fragments was the same for all investigated strains of the B.anthracis and consist of 1.0; 1.5; 1.9; 2.3; 2.8 thousand n.b. fragments. The spore-forming saprophytes differed significantly in amplified fragments.*

Thus, universal primers were complementary to variable repeat domains and was suitable for differentiation of vaccine strains of the anthrax pathogen from saprophytic microorganisms and it could help to detect the possible contamination during preparation of cultures in the production of the vaccine and can be used for differentiation, control and certification of B. anthracis vaccine strains.

Conclusions and perspectives of further research. *As a result of the studies carried out using specific primers, the strain-specific patterns of amplificates were obtained. Each tested strain was characterized by the presence of both general and individual amplified DNA fragments, differing in molecular weight and specificity. The fragments of the DNA of the vaccine strains of the anthrax pathogen were specifically amplified with primers complementary to the hypervariable sequences of the insertion element of the chromosomal DNA. The method can be used to control the variability of strains during the vaccine preparation*

Keywords: *causative agent of anthrax, polymerase chain reaction, RAPD-fingerprinting.*

REFERENCES

1. Hoffmaster, A.R., Fitzgerald, C.C., Ribot, E. et al. (2002). Molecular subtyping of Bacillus anthracis and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak United States. *Emerg.Infect.Dis.*, 8 (10), 1111-1116.

2. Lista, F., Faggioni, G. & Valjevac, S. (2006). Genotyping of Bacillus anthracis strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. BMC *Microbiol.*, 6(1), 33.

3. Tsibanova, L.Ya.,Selianinov, Yu.O., & Kolbasov, D.V. (1998). Differentsiatsiia vaktsynnykh shtammov sibirskoi uazvy s pomoshchiu PCR [Differentiation of anthrax vaccine strains by PCR]. Proceedings from The Diagnosis, prevention and control measures for especially dangerous and exotic animal diseases: *Mezhdunarodnaia nauchno prakticheskaia konferentsiia – International Scientific and Practical Conference*. (pp. 313-314) [in Russian].

4. Tsibanova,L.Ya.,Selianinov, Yu.O. & Kolbasov, D.V. (1998). Genomnii polimorfizm vozbuditelia sibirskoi yazvy [Genomic polymorphism of the causative agent of anthrax]. Proceedings from The Diagnosis, prevention and control measures for especially dangerous and exotic animal diseases: *Mezhdunarodnaia nauchno prakticheskaia konferentsiia – International Scientific and Practical Conference*. (pp. 316-318) [in Russian].

5. Kolbasov, D.V. & Tsibanov, S.Zh. (1998). Sovremennie podkhody tipirovaniia patogennykh mikoplazm i vozbuditelia sibirskoi yazvy [Modern approaches of typing of pathogenic mycoplasms and an agent of anthrax]. Proceedings from The Diagnosis, prevention and control measures for especially dangerous and exotic animal diseases: *Mezhdunarodnaia nauchno prakticheskaia konferentsiia – International Scientific and Practical Conference*, (pp. 321-323) [in Russian].

6. Stepanov, A.S., Marynyn, L.I. & Bolotnykova, M.F. (1997). Molekuliarnye mekhanizmy, lezhashchie v osnove rannikh stadii infektsii Bacillus anthracis irazrabotka novykh vaktsin [Molecular mechanisms underlying the early stages of Bacillus anthracis infection and the development of new vaccines]. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 6, 16 [in Russian].

7. Yanenko, U., Tarasov, O., Hudz, N. & Tereshchenko, S. (2014). Study of B. anthracis UA-07 vaccine strain pathogenicity factors' changes after lyophilization .*Naukovyivisnyk Natsionalnog oUniversitety bioresursiv i pryrodokorystuvannia– Scientific Bulletin of National Agriculture University of Ukraine*, 201 (1), 192-195.

8. Cherif, A., Brusetti, L. & Borin, S. (2003). Genetic relationship in the 'Bacillus cereus group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a Bacillus anthracis-specific rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 1108-1119.

9. Hansen, B.M., Leser, T.D. & Hendriksen, N.B. (2001). Polymerase chain reaction assay for the detection of Bacillus cereus group cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 202, 209-213.

10.Brumlik, M.J., Szymajda, U., Zakowska, D., Liang, X., Redkar, R.J. & Del Vecchio, V.G. (2001). Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate Bacillus anthracis strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3021-3028.

11. Kim, W. Hong, Y.-P. & Yoo, J.-H. et al. (2002). Genetic relationships of Bacillus anthracis and closely related species based on variable-number tandem repeat analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters*, 207, 21-27.

12. Helgason, E., Okstad, O.A. & Caugant, D.A. (2000). Bacillus anthracis, Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis – one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2627-2630.

13. Kulikova, V.V., Pyskun, A.V., Ukhovskii, V.V. & Sharandak, P.V. (2016). Etiologichna struktura leptospirozu svynei u gospodarstvakh Ukraini [Etiological structure of leptospirosis in swine farms in Ukraine]. *Veterinarna biotechnologija – Veterinary biotechnology*, 28, 125-133 [in Ukrainian].

14. Galka, I.V., Rudoi, O.V. & Muzikina, L.M. et al. (2016). Izoliatsiia Clostridium difficile z klinichnogo material vid svinei [Isolation of Clostridium difficile from clinical material from pigs]. *Veterinarna biotechnologija – Veterinary biotechnology*, 28, 20-26 [in Ukrainian].

15. Zhovnir, O.M., Gorbatiuk, O.I., Andriiashchuk, V.O. et al. (2015). Monitoring nekrobakteriozy, osnovnii vydovyi spektr mikrobnykh asotsiatsii zauchasti F. necrophorum ta spetsifichni zasobi profilactiki [Necrobacteriosis monitoring, the main species spectrum of microbial associations with the participation of F. necrophorum and specific prophylaxis]. *Veterinarnabiotechnologija – Veterinary biotechnology*, 27, 113-121 [in Ukrainian].

16. Babkina, M.M., Tarasov, O.A., Nychyk, S.A. et al. (2015). Chutlyvist mikroorganizmiv rodu Bacillus do antimikrobnykh rechovin in vitro [Sensitivity of microorganisms of genus Bacillus to antimicrobial substances in vitro]. *Veterinarna biotechnologija – Veterinary biotechnology*, 27, 226-231 [in Ukrainian].

17. Tarasov, O.A., Sapeiko, V.P. et al. (2014). Vplyv molekuliarno-genetychnykh osoblyvostei Streptococcus suis na yogo virulentni vlastyvosti [Influence of molecular genetic features of Streptococcus suis on its virulent properties]. *Veterinarna biotechnologija – Veterinary biotechnology*, 25, 111-115 [in Ukrainian].