

УДК 619:579.843.95-078

UDC 619:579.843.95-078

06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (ветеринарные науки)

06.02.02 Veterinary Microbiology, Virology, epizootology, Mycology with mycotoxicology and immunology (veterinary sciences)

АЛЛЕЛЬСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПЦР ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ OMPH -ТИПОВ PASTEURELLA MULTOCIDA И ПОИСК НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ

ALLELE-SPECIFIC PCR FOR TYPING OMPH-TYPES OF PASTEURELLA MULTOCIDA AND SEARCHING FOR NEW APPROACHES TO STUDYING OF PATHOGENICITY OF BACTERIAL ISOLATES

Нефедченко Алексей Васильевич
канд. вет. наук, старший научный сотрудник
nav-vet@mail.ru

Nefedchenko Aleksey Vasiljevich
Cand.Vet.Sci. senior research worker
nav-vet@mail.ru

Глотов Александр Гаврилович
д-р вет. наук, профессор,
glotov_vet@mail.ru

Glotov Alexander Gavrilovich
Dr.Sci.Vet. Professor
glotov_vet@mail.ru

Глотова Татьяна Ивановна
д-р биол. наук, профессор,
t-glotova@mail.ru

Glotova Tatyana Ivanovna
Dr.Sci.Biol, Professor
t-glotova@mail.ru

Терентьева Татьяна Евгеньевна
канд. вет. наук, старший научный сотрудник,
tatjana177@mail.ru
Диагностический центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук Новосибирская область, пос. Краснообск, Россия

Terentyeva Tatjana Evgenjevna
Cand.Vet.Sci. senior research worker,
tatjana177@mail.ru
Diagnostic Center of Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences Novosibirsk region, pos. Krasnoobsk, Russia

Кошчаев Андрей Георгиевич
д-р биол. наук, профессор,
koshhaev.a@kubsau.ru
Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия

Koshchaev Andrey Georgievich
Dr.Sci.Biol, professor
koshhaev.a@kubsau.ru
Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar Russia

Pasteurella multocida – значимый респираторный патоген крупного рогатого скота. Протеин OmpH представляет собой важный протективный антиген бактерии и хорошо изучен у птичьих штаммов. В доступной литературе отсутствуют данные по изучению разнообразия последовательностей гена этого протеина среди изолятов, выделенных при респираторной патологии КРС. Описаны несколько генов, ассоциированных с вирулентностью бактерии для крупного рогатого скота, сообщений о частоте выявления этих генов и связи их с патогенностью изолятов бактерии для лабораторных животных недостаточно. Целью исследования была разработка аллель-специфической ПЦР для определения OmpH -типов *Pasteurella multocida* и поиск новых подходов для оценки патогенности изолятов бактерии. Всего исследовали 83 изолята, выделенных из легких телят с респираторной патологией. Все изоляты

Pasteurella multocida is an important respiratory pathogen of cattle. OmpH Protein is a major protective antigen of bacteria has been well studied in avian strains. In the literature there are no data available for the study of a variety of sequence of this protein among isolates with cattle respiratory pathology. There have been described several genes associated with the virulence of the bacterium in respiratory disease of cattle, but none of the authors compared the frequency of detection of these genes with the pathogenicity for laboratory animals. The aim of our study was the development of allele-specific PCR to determine OmpH-types of *Pasteurella multocida* and the search for new approaches to assess the pathogenicity of isolates of bacteria. Total amount of 83 isolates allocated from the lungs of calves with respiratory pathology was investigated. All isolates belonged to groups A or D (isolates 63 and 20, respectively). Among isolates of capsular serogroup A we revealed 6

относились к капсульным группам А или D (63 и 20 изолятов, соответственно). Среди изолятов капсульной серогруппы А выявлено 6 типов, а наиболее распространенными типами были А1 и А2. Все изоляты капсульной группы D относились к одному omph- типу. В 16 из 23 хозяйств были выделены изоляты только одного omph-типа, в 4 – 2 типов, в 3 – трех типов. Частота выявления гена hgbB - гемоглобин связывающего протеина коррелировала с патогенностью изолятов для белых мышей. Разработанную аллельспецифическую ПЦР в сочетании с выявлением гена hgbB в можно использовать для скрининга и изучения антигенных свойств и патогенности циркулирующих изолятов, а также для отбора штаммов-кандидатов в вакцинные

Ключевые слова: PASTEURELLA MULTOCIDA, ПЦР, АЛЛЕЛЬ, КРУПНЫЙ РОГАТЫЙ СКОТ, ПАТОГЕННОСТЬ, ГЕНЫ, ВИРУЛЕНТНОСТЬ, ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ, РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ

types, most propagation types were A1 and A2. All isolates of capsular serogroup D were one omph- type. In 16 out of 23 farms there were identified isolates of only one omph-type, 4 - 2 types, 3 - three types. The frequency of gene hgbB - hemoglobin binding protein correlated with pathogenicity of isolates for white mice. The developed allele-specific PCR along with hgbB gene detection can be used for screening and studying the properties of antigen and circulating pathogenic isolates and selecting a candidate vaccine strains

Keywords: PASTEURELLA MULTOCIDA, PCR, ALLELE, CATTLE, PATHOGENICITY GENES, VIRULENCE, LABORATORY ANIMALS, RESPIRATORY INFECTIONS

Doi: 10.21515/1990-4665-147-033

ВВЕДЕНИЕ

В условиях интенсификации молочного животноводства большое значение приобретают респираторные болезни, приводящие к снижению экономической эффективности данной отрасли. В возникновении бронхопневмоний у крупного рогатого скота большую роль играет бактерия *P. multocida* [1, 2, 5, 10, 12, 17]. Болезни, вызванные этой бактерией, не имеют выраженной сезонности и регистрируются чаще у молодняка 1-6-месячного возраста на фоне стрессов, вирусных инфекций и неудовлетворительных условий кормления и содержания [3, 4, 11, 19, 20].

Pasteurella multocida – грамотрицательная, неподвижная, факультативно анаэробная коккобактерия, являющаяся частью комменсальной микрофлоры верхних дыхательных путей домашних и диких животных. [15, 21]. У бактерии выявлено пять капсульных групп (А, В, D, Е и F), имеющих различное эпизоотологическое значение для животноводства. Штаммы бактерии капсульных групп А и D считаются основными этиологическими агентами «вторичного» пастереллеза,

участвуют в возникновении респираторных болезней телят и реже взрослых животных, причиняющих значительный экономический ущерб скотоводству во всем мире [18, 22], в том числе в Российской Федерации [5, 23].

Контроль болезней, вызываемых *P. multocida*, включает ежегодную иммунизацию восприимчивого поголовья животных. В нашей стране для этой цели в основном используются вакцины, изготовленные из штаммов капсульной группы В, реже А и D, но их эффективность, особенно первых, не всегда бывает высокой, что связано не только с условно-патогенной природой возбудителя, но и несоответствием между антигенными профилями вакцинных и полевых штаммов, циркулирующих в конкретном хозяйстве [10].

Для выявления *P. multocida* и типирования по капсульным группам широкое применение нашла ПЦР на видоспецифичный ген *kmt-1* и гены капсульного синтеза (*hyaD*, *dcbF*, *bcbD*), специфичные для каждой капсульной группы [8], однако эти гены не дают полного представления об антигенных свойствах изолятов и их вирулентности. Традиционно для этого используется типирование с антигеноспецифическими сыворотками и биопроба на лабораторных животных. Последние исследования в области молекулярной биологии *P. multocida* позволяют решить данную проблему с использованием молекулярно-генетических методов.

У бактерии описано несколько протеинов наружной мембраны (*OmpA*, *OmpP*, *Oma87*, *PlpV* и другие) [16], среди которых *OmpH* составляет более 70 % массы клеточной стенки, и вместе с капсульным антигеном выступает в качестве основного протективного антигена. Протеин состоит из 353 аминокислотных остатков, образующих 5 внутренних и 2 наружных петли. Внешние петли переменны и обладают высокой иммуногенностью, антитела к ним обеспечивают 70% защиту животных против гомологичного штамма [13].

У *P. multocida* описано несколько генов, ассоциированных с вирулентностью бактерии для разных видов животных. По сообщениям зарубежных авторов [13, 17], три гена (*tbpa* – трансферринсвязывающий протеин, *pfha* – филаментный гемагглютинина, *hgbb* – гемоглобин связывающий протеин) чаще выявляли у изолятов от больных телят, чем от здоровых, однако никто из авторов не сравнивал частоту выявления этих генов с патогенностью изолятов для лабораторных животных.

Цель исследования

Разработка и апробация аллельспецифической ПЦР для изучения частоты выявления *ompH*-типов у изолятов *P. multocida*, выделенных при респираторных болезнях молодняка крупного рогатого скота и поиск новых подходов для оценки вирулентности изолятов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение и идентификация изолятов. Восемьдесят три изолята *P. multocida* были выделены из пораженных легких телят, больных респираторными болезнями, в период с 2006 по 2014 год в 23 хозяйствах молочного направления из различных регионов Западной Сибири. Предварительный посев проводили на кровяной агар (НИЦФ, Россия) с добавлением 5% дефибрированной овечьей крови и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37⁰С в течение 24 часов. Выделенные бактерии типировали стандартными бактериологическими методами. Колонии бактерий с характерными морфологическими признаками очищали, переносили на кровяной агар, после чего оценивали по стандартным биохимическим тестам (тест на каталазу, оксидазу, индол, подвижность, уреазная активность, производство орнитин декарбоксилазы, сбраживание углеводов), а также наличие гена *kmt1* с помощью разработанной нами мультиплексной ПЦР [8]. После типирования и определения патогенности изоляты сохраняли при -80⁰С в сердечно мозговом бульоне с добавлением

40% глицерина. Для сравнения использовали российские референтные штаммы 1231 (капсульная группа А), Т-80 и 681 (капсульная группа В) и АТ (капсульная группа D).

Аллельспецифическая ПЦР. Праймеры (таблица 1) были разработаны для выявления переменных фрагментов гена *ompH*, соответствующих одной из внешних петель протеина, на основе последовательностей гена, полученных в нашей предыдущей работе [8]. Для подтверждения специфичности реакции, а также определения нетипируемых данными праймерами изолятов, проводили секвенирование фрагмента гена у нескольких изолятов каждого *ompH*-типа.

Постановка ПЦР. Для постановки ПЦР 100 мкл суспензии бактерий отмывали несколько раз в стерильной дистиллированной воде, конечный осадок ресуспензировали в 100 мл воды, прогревали 5 минут при 95⁰С, центрифугировали и надосадочную жидкость использовали для амплификации. Реакцию проводили в 30 мкл смеси, содержащей 5 мкл ДНК бактерии, 10XПЦРбуфер, 3 мМ MgCl₂, 3 мМ dNTP, 10 pM каждого праймера, 1 ea ДНК полимеразы (BIORON GmbH, Germany). Для проведения ПЦР использовали праймеры, представленные в таблице 1.

Идентификация генов вирулентности. Определяли три гена вирулентности: *tbpa* – трансферринсвязывающий протеин, *pfha* – филаментный гемагглютинаина, *hgbb* – гемоглобин связывающий протеин с помощью ПЦР. Последовательности праймеров представлены в таблице 1. Специфичность реакции подтверждали с помощью секвенирования ампликонов.

Таблица 2 – Последовательности праймеров, использовавшихся для обнаружения *P. multocida* и капсульных серотипов, выявления генов вирулентности, аллельных вариантов и секвенирования гена *ompH*

Название	Последовательность (5' - 3')	Выявляемый ген	Размер ампликона	Назначение	Источник
Kmt1-F	TAAGAAACGTAACCTCAACATGGAAATA	kmt1	211	Выявление <i>P. multocida</i>	[6]
Kmt1-R	GAGTGGGCTTGTCGGTAGTCTT				
P.m.A-F	CGATAGTCCGTTAGATATTGCAAC	hyaD	564	Капсульная серогруппа А	
P.m.A-R	CATAATGGATTTGGCGCCAT				
P.m.D-F	ATCGCATCCAGAATAGCAAACCTC	dcbF	355	Капсульная серогруппа D	
P.m.D-R	TCCGATGCTTTGGTTGTGC				
P.m.B-F	GCGTGTATAACCTACATCTTCCCA	bcbD	167	Капсульная серогруппа В	
P.m.B-R	CGTCCATCAACACCTTTACTGC				
Pfha1 s	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	<i>pfhA</i>	296	Типирование генов вирулентности	[12]
Pfha1 as	TGGTACATTGGTGAATGCTG				
TbPA s	TTGGTTGGAAACGGTAAAGC	<i>tbpA</i>	508		
TbPA as	TAACGTGTACGGAAAAGCCC				
HgbB s	ACCGCGTTGGAATTATGATTG	<i>hgbB</i>	769		
HgbB as	CATTGAGTACGGCTTGACAT				

ompH-F	GCGTTTCATTCAAAGCATCTC	ompH	960, 964, 984	Секвенирование ompH	[6]
ompH-R	ATGACCGCGTAACGACTTTC				
A1-F	TTCCTGGTCAAGTAGAGCGTT	ompH-тип A1	484	Генотипирование ompH- типов	Собствен ные
A2-F	AGACAAGAATTATGATGTTGAAG	ompH-тип A2	847		
A3-F	TACCAGCACCTTCTGGCTCA	ompH-тип A3	50		
D1-F	CGTTTCAGTACAAAAGAGGAAGT	ompH-тип A1	898		
ompH-R	ATGACCGCGTAACGACTTTC	Общий			

Определение нуклеотидных последовательностей гена *ompH* и филогенетический анализ. Для секвенирования использовали праймеры, представленные в таблице 1. Секвенирующую реакцию проводили с использованием набора реагентов BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирующей реакции анализировали методом капиллярного электрофореза в автоматическом секвенаторе ABI PRISM[®] 3130xl (Applied Biosystems, США). Выравнивание последовательностей, филогенетический анализ проводили методом присоединения соседей в программах MEGA 5 и Lasergene 7. Статистическую достоверность топологии филогенетических деревьев устанавливали с помощью бутстреп-теста.

Исследование патогенности изолятов на лабораторных мышах. Для проверки патогенности для каждого изолята использовали по 4 беспородных самца в возрасте 3-4 недели массой не менее 20 гр. Животных содержали в контролируемых условиях со свободным доступом к воде и пищи. Рацион состоял из стандартного комбикорма.

Заражение проводили внутрибрюшинно суспензией бактерий в дозе 1×10^6 КОЕ, разведенных в 1 мл фосфатно-солевого буфера. За животными вели наблюдение в течение 7 дней. Время смерти фиксировали. Культуры считали высокопатогенными, если мыши погибали в течение 3 дней после заражения, низко патогенными – если гибель наступала на 4 – 7 суток, и не патогенными – если мыши выживали более 7 суток. Выживших животных подвергали гуманной эвтаназии путем ингаляции CO_2 с последующей дислокацией шейных позвонков [5].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica версия 8 (StatSoft Inc., США). Описательные статистические данные были использованы для расчета абсолютной и относительной частоты выявления генов патогенности, патогенности изолятов. Хи-квадрат тест и точный критерий Фишера был

использован для изучения достоверности различий между аллельными группами, значение $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследованные в данной работе изоляты были разделены на капсульные серотипы с помощью ПЦР с праймерами на гены капсульного синтеза *hyaD*, *dcbF*, *bcbD*, представленными в таблице 1. Из 83 изолятов 63 были отнесены нами к серотипу А, 20 – к серотипу D. Мы не выявили нетипируемые изоляты, а также изоляты других капсульных групп, что указывает на более важную роль изолятов капсульной серогруппы А в развитии эпизоотической ситуации в обследованных нами хозяйствах, чем капсульной группы D, и согласуется с результатами других исследователей [13, 14].

В дальнейшем для изучения антигенной структуры протеина OmpH и частоты распространения его отдельных антигенных вариантов среди изолятов бактерии провели типирование изолятов с помощью разработанных нами праймеров в аллельспецифической ПЦР. Праймеры были разработаны для выявления различий антигенных детерминант протеина, образованных двумя внешними петлями L2 и L5, на основе последовательностей гена, полученных в нашей предыдущей работе [8]. С помощью аллельспецифической ПЦР 60 из 63 изолятов капсульного серотипа А были разделены на 3 типа, которые мы обозначили буквами (соответствующими капсульному серотипу) и цифрами (порядок выявления аллельных вариантов) – А1, А2 и А3. Три изолята были отнесены к нетипируемым, и по результатам секвенирования они принадлежали к аллельным вариантам А4, А5 и А6 (таблица 2, рисунок 1). Все изоляты капсульной серогруппы D и референтный штамм АТ были представлены одним типом – D1. По результатам аллельспецифичной ПЦР референтный штамм 1231 относился к варианту А3. Референтные штаммы

T-80 и 681 по результатам секвенирования были отнесены к аллельному варианту B1.

Основные различия между аллельными вариантами были выявлены в двух вариабельных областях, соответствующих внешним петлям протеина (рисунок 1). Степень различия между отдельными штаммами каждого типа в этих областях не превышала 2 %, и изменения характеризовались синонимичными заменами.

Таблица 2 – Частота выявления аллельных вариантов среди изолятов и штаммов бактерии

Капсулярная группа	Кол-во исследованных культур и штаммов	OmpH-тип							
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	D1
Культуры									
A	63	24	24	12	1	1	1	0	0
D	20	0	0	0	0	0	0	0	20
Штаммы									
A	1	0	0	1	0	0	0	0	0
B	2	0	0	0	0	0	0	2	0
D	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Таким образом, аллельспецифическая ПЦР для выявления ompH-типов показала высокую эффективность, ее результаты были подтверждены секвенированием фрагмента гена. По результатам исследований все изоляты были разделены на 7 аллельных типов. Каждый из аллелей формировал свою ветвь на филогенетическом дереве. Внутри группы сходство нуклеотидных последовательностей изолятов составило 98-100%.

Звездами выделены штаммы и культуры бактерий, исследованные в данной работе. Буквами и цифрами обозначены аллельные варианты гена.

Топология дерева восстановлена при помощи метода ближайших соседей (Neighbor-Joining method). Матрица генетических расстояний рассчитана с применением метода Maximum Composite Likelihood.

Указаны индексы статистической поддержки узлов, бутстреп-тест рассчитан для 1000 реплик. Филогенетический анализ проведен в программе MEGA5.

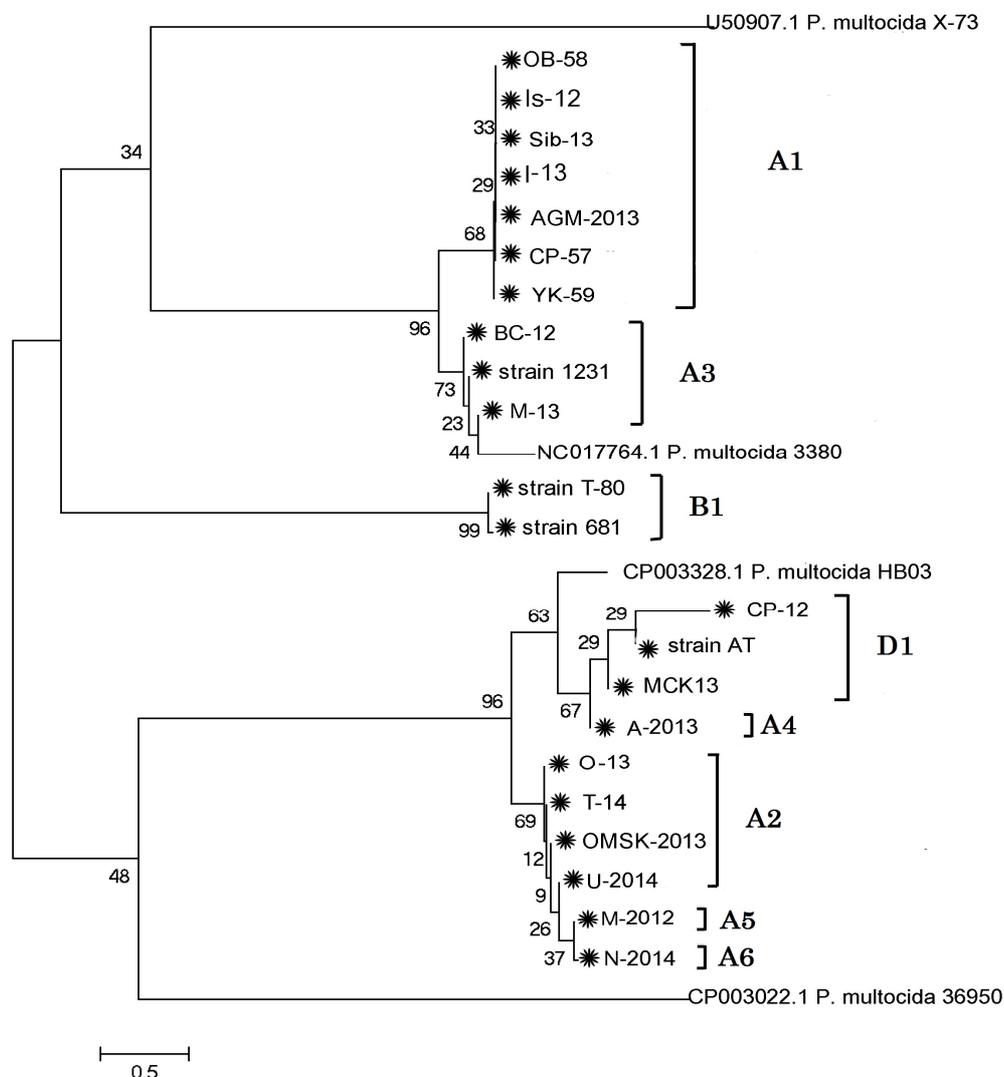


Рисунок 1– Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей участка гена *ompH* *Pasteurella multocida*

Наиболее интересным было изучить частоту выявления отдельных *ompH*-типов или их комбинаций в обследованных хозяйствах. В 16 из них выделили изоляты только одного *ompH*-типа или только одной капсульной

группы (Таблица 3). В семи были выделены изоляты 2 и 3 omrH-типов, в том числе разных капсульных серогрупп.

Таблица 3 – Частота выделения комбинаций OmrH-типов в хозяйствах

Один	A1	A2	A3	D1	Всего
Кол-во хозяйств	3	5	2	6	16
Два	A1+A2	A2+A3	A1+ D1	Другие	
Кол-во хозяйств	2	1	1	0	4
Три	A1+A3+A4	A1+A3+A5	A1+A6+ D1	Другие	
Кол-во хозяйств	1	1	1	0	3

Мы не выявили различий по частоте выделения отдельных OmrH-типов или их комбинаций на молочных комплексах с наличием или отсутствием завезенного по импорту скота.

Поскольку все наши изоляты были выделены из пораженных легких, для оценки их патогенности была использована модель сепсиса у мышей и оценка по маркерным генам вирулентности.

В тесте хи-квадрат определили статистически достоверные различия в патогенности изолятов разных omrH-типов. Все исследованные изоляты несли хотя бы один из генов вирулентности. Распределение генов вирулентности по капсульным серогруппам и аллельным вариантам представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Выявление генов вирулентности и патогенность культур *P. multocida* разных аллельных вариантов

Аллельный тип	Кол-во культур	Выявление генов вирулентности, кол-во культур/%			Патогенность для белых мышей кол-во культур/%		
		<i>tbpA</i>	<i>pfhA</i>	<i>hgbB</i> *	высокая*	низкая*	отсутствует*
A1	24	24/100,0	14/58,3	20/83,3	22/91,6	2/8,4	0
A2	24	24/100,0	22/91,6	10/41,7	12/50,0	8/33,3	4/16,7
A3	12	12/100,0	8/66,7	6/50,0	8/66,7	4/33,3	0
A4	1	1/100,0	1/100,0	1/100,0	1/100,0	0	0
A5	1	1/100,0	0	0	0	0	1/100,0
A6	1	1/100,0	1/100,0	0	0	0	1/100,0
D1	20	16/80,0	4/20,0	16/80,0	16/80,0	4/20,0	0

Примечание: *- различия достоверны ($p \leq 0,05$)

Частота выявления генов *tbpA* и *pfhA* составила 95,2 и 60,2 %, соответственно, и их чаще выявляли у изолятов капсульной группы А, чем D. Культуры аллельных вариантов капсульной группы А различались по частоте выявления генов *pfhA* и *hgbB* и патогенности для белых мышей. Ген *pfhA* чаще выявляли у культур аллельного типа А2, а ген *hgbB* – у А1. Культуры типа А1 были более патогенны для белых мышей, чем культуры остальных аллельных типов.

Мы выявили корреляционную связь между геном *hgbB* и патогенностью изолятов разных *ompH*-типов для белых мышей. Этот ген достоверно чаще выявляли у высокопатогенных изолятов чем у низкопатогенных. Известно, что этот ген кодирует белок, участвующий в

поглощении гема и обеспечивает хорошую адаптацию к смене источника железа [16]. Вероятно, тест на данный ген можно использовать в качестве маркера патогенности изолятов и заменить биопробу на лабораторных животных.

Данное исследование показало, что изоляты бактерии *Pasteurella multocida*, выделенные при респираторной патологии КРС в Сибири, могут различаться антигенно и по патогенности даже в одном стаде. При проведении профилактической вакцинации необходимо учитывать капсульную серогруппу и *ompH*-тип изолятов *Pasteurella multocida*, циркулирующих в хозяйстве.

ВЫВОДЫ

1. Аллельспецифическая ПЦР достоверно определяет аллельный вариант гена *ompH* (*ompH*-тип) у изолятов *P. multocida*, предварительно охарактеризованных при помощи культурально-морфологических, биохимических признаков и генетических методов, и может использоваться в качестве инструмента для скрининга и изучения антигенных свойств циркулирующих изолятов бактерии и отбора штаммов-кандидатов в вакцинные.

2. В обследованных хозяйствах выявлена неоднородность циркулирующих изолятов *P. multocida* по капсульной группе и *ompH*-типу. Популяция бактерии представлена 7 антигенными группами, различающимися по протеину *OmpH* и капсульной серогруппе (А или D). Ни в одном случае не были выявлены изоляты капсульной серогруппы В. Среди изолятов капсульной серогруппы А выявлено 6 *ompH*-типов, наиболее распространенными типами были А1 и А2 (по 38%). Все изоляты капсульной серогруппы D относились к одному *ompH*-типу. Только в 16 хозяйствах все выделенные изоляты принадлежали к одной группе, в семи они были представлены 2-3 группами.

3. Из трех генов, ассоциированных с вирулентностью изолятов *P. multocida* для крупного рогатого скота, частота выявления гена *hgbb* - гемоглобин связывающего протеина коррелировала с патогенностью изолятов *P. multocida* для белых мышей. В перспективе ПЦР на этот ген можно использовать для типирования патогенных изолятов с целью замены трудоемкой биопробы на лабораторных животных.

Литература

1. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: бактериальные заболевания: монография / А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, А. Я. Самуйленко, И. М. Донник, С. А. Гринь, Л. В. Шевченко, В. Н. Шевкопляс, А. Г. Кощаев, А. С. Кривоногова, А. Г. Исаева, П. А. Красочко, Н. С. Мотузко. – Краснодар, 2018. – 701 с.
2. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания: монография / А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, И. М. Донник, А. Я. Самуйленко, С. А. Гринь, Л. В. Шевченко, В. Н. Шевкопляс, А. Г. Кощаев, А. Г. Исаева, А. С. Кривоногова, П. А. Красочко, Н. С. Мотузко, Р. А. Кривонос. – Краснодар, 2018. – 485 с.
3. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота / А. Г. Глотов, О. Г. Петрова, Т. И. Глотова, А. В. Нефедченко, А. Т. Татарчук, С. В. Котенева, Г. В. Ветров, А. Н. Сергеев // Ветеринария. – 2002. – № 3. – С. 17-21.
4. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, А. В. Нефедченко, С. В. Котенева, Н. Р. Будулов, О. В. Кунгурцева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2008. – № 3. – С. 72-78.
5. Гетерогенность пастерелл, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах / А. Г. Глотов, Т. Е. Терентьева, А. В. Нефедченко, Т. И. Глотова, А. Н. Шиков, А. П. Агафонов // Ветеринария. – 2014. – № 12. – С. 23-26.
6. Кощаев А. Г. Здоровье животных – основной фактор эффективного животноводства / А. Г. Кощаев, В. В. Усенко, А. В. Лихоман // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 99. – С. 201-210.
7. Методические указания по лабораторной диагностике пастереллезом животных и птиц: утверждены Главветуправлением №22-7/82. – М., 1992. – 12 с.
8. Crawshaw W.M., Field study of pneumonia in vaccinated cattle associated with incorrect vaccination and *Pasteurella multocida* infection / W.M. Crawshaw, G.L. Caldow // Veterinary Record. – 2015. – V.176. – P.434-438.
9. Dabo S. M. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease / S. M. Dabo, J.D. Taylor, W. Confer // Animal Health Research Reviews. – 2007. – V.8. – P. 129-150.
10. Davies R. L., Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin / R. L. Davies, R. Mac Corquodale, S. Reilly // Veterinary Microbiology. – 2004. – V. 99. – P. 145-158.

11. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status / C. Ewers, A. Lübke-Becker, A. Bethe, S. Kießling, M. Filter, L.H. Wieler // *Veterinary Microbiology*. – 2006. – V. 114. – P. 304-317.
12. Hatfaludi T., Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* / T. Hatfaludi, K. Al-Hasani, J.D. Boyce, B. Adler // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – V.144. – P.1-17.
13. Hotchkiss E. J., et al. Prevalence of *Pasteurella multocida* and other respiratory pathogens in thenasal tract of Scottish calves / E. J. Hotchkiss, M. P. Dagleish, K. Willoughby // *Veterinary Record*. – 2010. – V.167. – P. 555-560.
14. Katsuda K. Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves / K. Katsuda, K. Hoshino, Y. Ueno // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – V.167. – P. 737-741.
15. Lübke A. Isolation and partial characterization of the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* / A. Lübke, L. Hartmann, W. Schroder, E. Hellmann // *Zentralblatt für Bakteriologie*. – 1994. – V. 281. – P. 45-54.
16. Luo Y. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge / Y. Luo, Q. Zeng, J.R. Glisson // *Vaccine*. – 1999. – V.17. – P. 821-831.
17. Sellyei B. Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the ompH gene / B. Sellyei, E. Ivanics, T. Magyar // *Acta Veterinaria Hungarica*. – 2013. – V. 61. – P.1-8.
18. Wilkie I.W. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis / I.W. Wilkie, M. Harper, J. D. Boyce, B. Adler // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2012. – V. 361. – P.1-22.
19. Amino acid profile of meat of specialized beef breeds/ A. G. Koshchaev, I. V. Shchukina, M. P. Semenenko, K. AnnaSergeevna, K. V. Vasilevich // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. – T. 7. – № 5. – C. 670-676.
20. Efficiency of the use of probiotic supplements for the formation of digestive microbiocenosis in calves/ I. N. Mikolaychik, L. A. Morozova, A. G. Koshchaev, E. S. Stupina // *Advances in Agricultural and Biological Sciences*. – 2017. – T. 3. – № 1. – C. 35-43.
21. Plutakhin G. A. Quality assessment of chicken meat by analysis-of-variance method/ G. A. Plutakhin, A. G. Koshchaev I. M. Donnik // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. – T. 7. – № 3. – C. 2293-2299.
22. Relationship between the genetic variants of kappa-casein and prolactin and the productive-biological characteristics of cows of the black-motley breed/ M. A. Chasovshchikova, O. M. Sheveleva, M. A. Svjazhenina, N. I. Tatarkina, A. B. Satkeeva, A. A. Bakharev, E. A. Ponomareva, A. G. Koshchaev // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2017. – T. 9. – № 7. – C. 1038-1044.
23. Semenenko M.P. Mechanisms of biological activity of bentonites and possibilities of their use in veterinary medicine/ M. P. Semenenko, E. V. Kuzminova, A. G. Koshchaev // *Advances in Agricultural and Biological Sciences*. – 2015. – T. 1. – № 2. – C. 3-10.

References

1. Diagnostika infekcionnyh boleznej sel'skhozjajstvennyh zhivotnyh: bakterial'nye zabojevanija: monografija / A. A. Shevchenko, O. Ju. Chernyh, A. Ja. Samujlenko, I. M. Donnik, S. A. Grin', L. V. Shevchenko, V. N. Shevkopljas, A. G. Koshchaev, A. S. Krivonogova, A. G. Isaeva, P. A. Krasochko, N. S. Motuzko. – Krasnodar, 2018. – 701 s.
2. Diagnostika infekcionnyh boleznej sel'skhozjajstvennyh zhivotnyh: virusnye zabojevanija: monografija / A. A. Shevchenko, O. Ju. Chernyh, I. M. Donnik, A. Ja.

Samujlenko, S. A. Grin', L. V. Shevchenko, V. N. Shevkopljas, A. G. Koshhaev, A. G. Isaeva, A. S. Krivonogova, P. A. Krasochko, N. S. Motuzko, R. A. Krivonos. – Krasnodar, 2018. – 485 s.

3. Rasprostranenie virusnyh respiratornyh boleznej krupnogo rogatogo skota / A. G. Glotov, O. G. Petrova, T. I. Glotova, A. V. Nefedchenko, A. T. Tatarchuk, S. V. Koteneva, G. V. Vetrov, A. N. Sergeev // Veterinarija. – 2002. – № 3. – S. 17-21.

4. Jetiologicheskaja struktura massovyh respiratornyh boleznej molodnjaka krupnogo rogatogo skota v hozjajstvah, zanimajushhhsja proizvodstvom moloka / A. G. Glotov, T. I. Glotova, A. V. Nefedchenko, S. V. Koteneva, N. R. Budulov, O. V. Kungurceva // Sibirskij vestnik sel'skhozjajstvennoj nauki. – 2008. – № 3. – S. 72-78.

5. Geterogenost' pasterell, vydelennyh ot krupnogo rogatogo skota na molochnyh kompleksah / A. G. Glotov, T. E. Terent'eva, A. V. Nefedchenko, T. I. Glotova, A. N. Shikov, A. P. Agafonov // Veterinarija. – 2014. – № 12. – S. 23-26.

6. Koshhaev A. G. Zdorov'e zhivotnyh – osnovnoj faktor jeffektivnogo zhivotnovodstva / A. G. Koshhaev, V. V. Usenko, A. V. Lihoman // Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2014. – № 99. – S. 201-210.

7. Metodicheskie ukazanija po laboratornoj diagnostike pasterellezov zhivotnyh i ptic: utverzhdeny Glavvetupravleniem №22-7/82. – M., 1992. – 12 s.

8. Crawshaw W.M., Field study of pneumonia in vaccinated cattle associated with incorrect vaccination and *Pasteurella multocida* infection / W.M. Crawshaw, G.L. Caldow // Veterinary Record. – 2015. – V.176. – R.434-438.

9. Dabo S. M. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease / S. M. Dabo, J.D. Taylor, W. Confer // Animal Health Research Reviews. – 2007. – V.8. – P. 129-150.

10. Davies R. L., Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin / R. L. Davies, R. Mac Corquodale, S. Reilly // Veterinary Microbiology. – 2004. – V. 99. – P. 145-158.

11. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status / C. Ewers, A. Lübke-Becker, A. Bethe, S. Kießling, M. Filter, L.H. Wieler // Veterinary Microbiology. – 2006. – V. 114. – P. 304-317.

12. Hatfaludi T., Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* / T. Hatfaludi, K. Al-Hasani, J.D. Boyce, B. Adler // Veterinary Microbiology. – 2010. – V.144. – P.1-17.

13. Hotchkiss E. J., et al. Prevalence of *Pasteurella multocida* and other respiratory pathogens in thenasal tract of Scottish calves / E. J. Hotchkiss, M. P. Dagleish, K. Willoughby // Veterinary Record. – 2010. – V.167. – P. 555-560.

14. Katsuda K. Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves / K. Katsuda, K. Hoshino, Y. Ueno // Veterinary Microbiology. – 2013. – V.167. – P. 737-741.

15. Lübke A. Isolation and partial characterization of the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* / A. Lübke, L. Hartmann, W. Schroder, E. Hellmann // Zentralblatt für Bakteriologie. – 1994. – V. 281. – P. 45-54.

16. Luo Y. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge / Y. Luo, Q. Zeng, J.R. Glisson // Vaccine. – 1999. – V.17. – P. 821-831.

17. Sellyei B. Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the ompH gene / B. Sellyei, E. Ivanics, T. Magyar // Acta Veterinaria Hungarica. – 2013. – V. 61. – P.1-8.

18. Wilkie I.W. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis / I.W. Wilkie, M. Harper, J. D. Boyce, B. Adler // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2012. – V. 361. – P.1-22.

19. Amino acid profile of meat of specialized beef breeds/ A. G. Koshchaev, I. V. Shchukina, M. P. Semenenko, K. AnnaSergeevna, K. V. Vasilevich // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – Т. 7. – № 5. – S. 670-676.

20. Efficiency of the use of probiotic supplements for the formation of digestive microbiocenosis in calves/ I. N. Mikolaychik, L. A. Morozova, A. G. Koshchaev, E. S. Stupina // Advances in Agricultural and Biological Sciences. – 2017. – Т. 3. – № 1. – S. 35-43.

21. Plutakhin G. A. Quality assessment of chicken meat by analysis-of-variance method/ G. A. Plutakhin, A. G. Koshchaev I. M. Donnik // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – Т. 7. – № 3. – S. 2293-2299.

22. Relationship between the genetic variants of kappa-casein and prolactin and the productive-biological characteristics of cows of the black-motley breed/ M. A. Chasovshchikova, O. M. Sheveleva, M. A. Svjazhenina, N. I. Tatarkina, A. B. Satkeeva, A. A. Bakharev, E. A. Ponomareva, A. G. Koshchaev // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2017. – Т. 9. – № 7. – S. 1038-1044.

23. Semenenko M.P. Mechanisms of biological activity of bentonites and possibilities of their use in veterinary medicine/ M. P. Semenenko, E. V. Kuzminova, A. G. Koshchaev // Advances in Agricultural and Biological Sciences. – 2015. – Т. 1. – № 2. – S. 3-10.