

АНАЛИЗ ЛОКУСОВ, КОДИРУЮЩИХ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *Haemophilus parasuis**

В.И. ПАВЕЛКО, Ю.Ю. БАБИН, А.В. СПРЫГИН, О.В. ПРУНТОВА

Гемофилезный полисерозит свиней (болезнь Глессера, возбудитель — *Haemophilus parasuis*, грамотрицательная бактерия семейства *Pasteurellaceae*) считается одним из значимых бактериальных инфекционных заболеваний и наносит существенный экономический ущерб отрасли. У свиней бактерии этого вида входят в состав нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей, но существуют штаммы *H. parasuis*, способные преодолевать колонизационную резистентность животных и вызывать болезнь. Появлению вирулентных штаммов способствует высокая генетическая изменчивость бактерий. Штаммы возбудителя различаются по вирулентным, серологическим и генетическим свойствам. Поиск различий в геноме высоковирулентных и авирулентных изолятов выявил множество генов факторов патогенности. Целью нашей работы было определение маркеров патогенности у представителей *H. parasuis*, выделенных на территории Российской Федерации с 2000 по 2011 год. Мы провели генетический скрининг 6 штаммов и 23 изолятов на наличие 10 факторов патогенности. Принадлежность изучаемых штаммов и изолятов к виду *H. parasuis* контролировал по биохимическим признакам и с помощью PCR в реальном времени (real-time PCR). Гены, которые предположительно связаны с патогенностью, выявляли методом PCR с десятью парами праймеров. Установлено присутствие всех потенциальных факторов патогенности (соответствующие локусы — *vtA*, *fluA*, *hhdA*, *hhdB*, *nhaC*, *cirA*, *HAPS_0254*, *sclB7*, *sclB11* и *phage_related*) в разных комбинациях. Среди 28 штаммов и изолятов *H. parasuis*, выделенных на территории РФ, ген *vtA* встречался у всех представителей, гены *sclB7* и *sclB11* — соответственно в 24 и 25 случаях, гены *cirA* — в 18 из 28, *fluA*, *HAPS_0254* и *hhdA* — в 15 из 28, *hhdB* — в 14 из 28, *nhaC* — в 12 из 28, *phage_related* — лишь в 3 из 28 образцов. Более половины (15 из 28 — LUB, Уральский ДЕП, МВ, СК-1-ДЕП, СК3, Краснодар, Ботово-2, Ботово-5, Ботово-7, ПЛ2, А14, V171, SH6, SW124, VN) обладали уникальным набором генов, не описанным до настоящего времени в литературе. При сопоставлении с данными о патогенности изучаемых штаммов для свиней и лабораторных животных, полученными ранее (А.В. Потехин с соавт., 2007) интересным оказался тот факт, что штаммы ИЛ-1-ДЕП, КОМИ ДЕП и изолят Надееево-2, обладающие набором генов, характерных для патогенных штаммов 13-го, 14-го и 15-го серотипов, проявили соответственно высоковирулентные, средневирулентные и авирулентные свойства. Также в нашем исследовании было показано, что авирулентные штамм СК-1-ДЕП и изоляты Ботово-2 и Надееево-2 содержат ген *vtA* группы 1, ранее считавшийся типичным только для потенциально вирулентных штаммов. Кроме того, следует отметить, что представляемая работа дополняет крайне немногочисленные исследования, в которых гены, кодирующие потенциальные факторы патогенности, выявляли у полевых изолятов.

Ключевые слова: *Haemophilus parasuis*, факторы патогенности, гемофилезный полисерозит, болезнь Глессера.

Для развития свиноводства в России и предотвращения финансовых потерь выращиваемое поголовье должно быть надежно защищено от бактериальных и вирусных угроз, наносящих серьезный экономический ущерб (1, 2). Гемофилезный полисерозит, или болезнь Глессера, — инфекционное заболевание свиней с симптомами серозно-фибринозного перикардита, плеврита, перитонита, артрита и менингоэнцефалита (3). Исторически эта болезнь рассматривалась как спорадическая инфекция поросят, проявляющаяся под воздействием стрессовых факторов. Однако современные технологии интенсивного животноводства и распространение инфекционных агентов, ослабляющих иммунную защиту (цирковирус 2-го типа, вирусы гриппа и репродуктивно-респираторного синдрома свиней, а также *Mycoplasma hyorhynchos* и *M. hyorhinis*), создали предпосылки для массового распространения гемофилезного полисерозита, что подчеркивает необходимость тщательного ветеринарного надзора (4).

Возбудитель болезни Глессера — грамотрицательная бактерия *Haemophilus parasuis*.

* Работа выполнена при поддержке Министерства сельского хозяйства РФ.

mophilus parasuis (сем. *Pasteurellaceae*), имеющая специфическое требование к ростовой среде — наличие никотинамидадениндинуклеотида (НАД) (4). У свиней бактерии этого вида входят в состав нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей, но существуют штаммы *H. parasuis*, способные преодолевать колонизационную резистентность животных и вызывать болезнь (5). Возбудитель передается поросятам при прямом контакте от свиноматок-бактерионосителей в первые дни жизни, однако заболевание обычно проявляется через 8-15 сут после отъема. Появлению вирулентных штаммов способствует высокая генетическая изменчивость бактерий (6), в результате которой авирулентные штаммы приобретают способность вызывать заболевание.

Изучение факторов патогенности методами молекулярной биологии выявило множество различий в геноме вирулентных и авирулентных штаммов, свидетельствующих о необходимости комплексного анализа изолятов *H. parasuis* из разных стран (7). Ряд авторов (8-10) идентифицировали гены, кодирующие потенциальные факторы вирулентности — белки внешней мембраны, выполняющие транспортную (*vtaA*, *fhuA*, *hhdA*, *hhdB*, *nhaC*, *HAPS_0254*, *cirA*) и адгезивную (*sclB7*, *sclB11*) функции. Фаговые гены (*phage_related*) способны кодировать токсины и участвовать в возникновении патогенных микроорганизмов в результате горизонтального переноса генетического материала (11).

Взаимосвязь между биологическими свойствами бактерий и наличием генов вирулентности остается до конца не изученной. Идентификация генов вирулентности может помочь в разработке новых методов типирования и новых вакцин, которые обеспечат более длительную и эффективную защиту от патогенных штаммов *H. parasuis*.

Мы впервые провели генетический скрининг штаммов и изолятов *H. parasuis*, выделенных на территории Российской Федерации с 2000 по 2011 год, на наличие 10 факторов патогенности (соответствующие локусы — *vtaA*, *fhuA*, *hhdA*, *hhdB*, *nhaC*, *cirA*, *HAPS_0254*, *sclB7*, *sclB11* и *phage_related*) и установили их присутствие в разных комбинациях. У 15 из 28 изученных представителей *H. parasuis*, выявленных на территории РФ, нами обнаружены сочетания локусов, которые до этого не были описаны. Кроме того, показано, что три авирулентных штамма и изолята содержат ген *vtaA* группы 1, ранее считавшийся характерным только для потенциально вирулентных штаммов.

Целью нашей работы было определение генотипических факторов патогенности у изолятов *Haemophilus parasuis*, выделенных на территории Российской Федерации.

Методика. Штаммы и изоляты *Haemophilus parasuis*, которые были использованы: типовой штамм *H. parasuis* ATCC 19417 (4-й серотип, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, США); изоляты AI4, SW124, NAG, D21, D95, SH6, V171, TO1, T72, NB144 (получены из ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, пос. Оболенск); штаммы ИН-1-ДЕП, ИЛ-1-ДЕП, Уральский ДЕП, КОМИ ДЕП и СК-1-ДЕП (депонированы во Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов — ВГНКИ, г. Москва); изоляты BEL, Ботово-2, Ботово-5, Ботово-6, Ботово-7, VN, LUB, IL2, IL3, MB, MB1, Надеево-2, SK3 (получены сотрудниками Федерального центра охраны здоровья животных в период с 2000 по 2011 год на территории РФ из патологического материала животных с клиническими признаками гемофилезного полисерозита). Культуры *H. parasuis* выращивали на агаре, приготовленном на основе Vacto Triptone, Vacto Peptone

и агара Difco («BD», Нидерланды). После стерилизации агара к 250 мл среды добавляли 25 мл дрожжевого экстракта (источник НАД), 25 мл эритроцитов лошади и 25 мл фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Бактерии культивировали при 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ в течение 24–48 ч.

Биохимические признаки изучали с помощью прибора VITEK 2 Compact и карт для идентификации требовательных микроорганизмов VITEK 2 NH ID Card («bioMérieux SA», Франция).

Бактериальную ДНК выделяли из чистых культур, используя комплект реагентов РИБО-сорб («ИнтерЛабСервис», г. Москва) согласно инструкции изготовителя.

Принадлежность НАД-зависимых бактерий к виду *H. parasuis* определяли с помощью PCR в реальном времени (real-time PCR) с праймерами и зондом, разработанными С. Turni с соавт. (12). Условия постановки реакции были описаны ранее (13).

Гены, которые предположительно связаны с патогенностью, выявляли методом PCR с десятью парами праймеров (8–10). Температурные режимы устанавливали аналогично предложенным (8–10). PCR проводили в реакционной смеси следующего состава: по 0,4 мкмоль/л каждого из dNTP («Fermentas», Литва), 0,4 мкмоль/л праймеров («Синтол», г. Москва), 3 ммоль/л MgCl₂, 1 ед. Taq-полимеразы, 1× Green Buffer («Promega», США) и 5 мкл ДНК. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза при 130 V в течение 15 мин в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл).

Оценку статистической значимости взаимосвязи между наличием гена и патогенностью референтных штаммов (на основе данных литературы) проводили при сравнении коэффициента корреляции χ^2 (14). Для вычисления достигаемого уровня значимости использовали односторонний точный тест Фишера (14).

Результаты. Проверка штаммов и изолятов на принадлежность к виду *H. parasuis* на основании биохимических признаков показала, что все культуры бактерий не проявляли уреазную и оксидазную активность, но были положительными по каталазе, не образовывали индол и обладали ферментативной активностью в отношении глюкозы, галактозы, маннозы, что соответствует критериям вида *H. parasuis* согласно определителю Берджи (15). Все культуры были также положительными в видоспецифичной для *H. parasuis* real-time PCR.

В последние несколько лет с помощью супрессионной вычитающей гибридизации (8, 16), репрезентативного разностного анализа (10) и секвенирования (9, 17, 18) идентифицирован ряд генов, связанных с вирулентностью, но взаимосвязь между биологическими свойствами изолятов и наличием этих генов полностью не изучена. Мы выполнили скрининг генов, связанных с вирулентностью, и сопоставили их биологические и молекулярно-генетические свойства, обнаруженные в настоящей работе, с данными по референтным штаммам, представленными в литературе.

Для выявления генов *vtaA*, *fhuA*, *sclB11*, *nhaC*, *sclB7*, *HAPS_0254*, *hhdA*, *hhdB*, *cirA* и *phage_related*, которые, как предполагается, связаны с патогенностью, использовали десять пар праймеров (табл. 1).

1. Праймеры, использованные при выявлении потенциальных генов патогенности у *Haemophilus parasuis*

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина ампликона, п.н.	Авторы праймеров
<i>vtaA</i>	YADAF1 PADHR1	TTTAGGTAAGATAAGCAAGGAAATCC CCACACAAAACCTACCCCTCCTCC	406	(9)

<i>fhuA</i>	E35-F E35-R	TCTAAGCGATGGGATTGAGC GGTGGCGTAAGACGTGATT	461	(8)
<i>sclB11</i>	A4-F A4-R	TTTGGCGTTTGTAGAGTT TGGCGTTAGGTTATGGTT	186	(8)
<i>nhaC</i>	E30-F E30-R	GTCCAGGAAGCATAATACA TACAAGGTGGCGAGATAA	312	(8)
<i>sclB7</i>	D32-F D32-R	CATTGGCAGAGGCTTTAT GTACGGTATTGCGGTTGG	242	(8)
<i>HAPS_0254</i>	B14-F B14-R	ACACCTTATGCTTCCGCTAT ACGGTAACAGAACAAGAGCC	146	(8)
<i>hhdA</i>	MP_A1 MP_A2	GGTCTAGTTCACAAACAGCCAATAC GATATTTACCCCTGCCTTCATTGTATC	964	(10)
<i>hhdB</i>	MP_B1 MP_B2	ATCTTGCCTGATTAGAGAGTAGGAGT GTGAATATAGCCCTTATCCAAATAGGC	557	(10)
<i>cirA</i>	MP_CirA1 MP_CirA4	GTATGCAGAAATAAGCCCTGCTAAAC CTGTAAAGCAATGCAATTACCGTAGTG	215	(10)
<i>phage_related</i>	Ophage13_1 Ophage13_2	GCTTGGCGGTAATCTGTGT AGAATCAACCTCAGCCGAAA	301	(10)
<i>infB</i>	CTinfF1 CTinfR1 CTinfP	CGACTTACTTGAAGCCATTCTTCTT CCGCTTGCATACCCTCTT FAM-ATCGGAAGTATTAGAATTAAGTGC-BHQ1	74	(12)

2. Наличие генов предполагаемых факторов патогенности у изученных штаммов и изолятов *Haemophilus parasuis*, использованных в эксперименте

Штамм, изолят	Ген									
	<i>vtaA</i>	<i>fhuA</i>	<i>sclB11</i>	<i>nhaC</i>	<i>sclB7</i>	<i>HAPS_0254</i>	<i>hhdA</i>	<i>hhdB</i>	<i>cirA</i>	<i>phage_related</i>
Типовой штамм										
АТСС 19417	+		+		+					
Штамм ИЛ-1-ДЕП	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Штамм ИН-1-ДЕП	+		+		+					
Штамм СК-1-ДЕП	+				+					
Штамм Уральский ДЕП	+	+	+	+	+	+		+	+	
Штамм КОМИ ДЕП	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Изолят ВЕЛ	+		+		+					
Изолят Ботово-2	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Изолят Ботово-5	+		+		+				+	
Изолят Ботово-6	+		+		+					
Изолят Ботово-7	+	+	+	+	+	+	+		+	
Изолят VN	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Изолят LUB	+		+		+				+	
Изолят IL2	+	+	+		+	+	+	+	+	
Изолят IL3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Изолят Краснодар	+				+					
Изолят МВ	+		+							
Изолят SK3	+									
Изолят Надево-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Изолят А14	+	+	+		+	+	+	+	+	
Изолят D21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Изолят D95	+		+		+					
Изолят SH6	+	+	+	+	+		+	+	+	
Изолят V171	+		+							
Изолят ТО1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Изолят Т72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Изолят NB144	+		+							
Изолят NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Изолят SW124	+	+	+		+	+	+	+	+	
Всего	29	15	26	12	25	15	15	14	18	3

Примечание. Происхождение штаммов и изолятов см. в разделе «Методика»; «+» — наличие, пропуск — отсутствие гена.

Результаты проверки штаммов и полевых изолятов *H. parasuis* на наличие генов, кодирующих предполагаемые факторы патогенности, показали присутствие всех из них в разных комбинациях (табл. 2). Среди 28 штаммов и изолятов *H. parasuis*, выделенных на территории РФ, ген *vtaA* встречался у всех представителей, гены *sclB7* и *sclB11* — соответственно в

24 и 25 случаях, гены *cirA* — в 18 из 28, *fhuA*, *HAPS_0254* и *hhdA* — в 15 из 28, *hhdB* — в 14 из 28, *nhaC* — в 12 из 28, *phage_related* — лишь в 3 из 28 образцов. Более половины (15 из 28 — LUB, Уральский ДЕП, MB, СК-1-ДЕП, СК3, Краснодар, Ботово-2, Ботово-5, Ботово-7, IL2, AI4, V171, SH6, SW124, VN) обладали уникальным сочетанием генов, не описанным до настоящего времени в литературе.

Оценка патогенных свойств изолятов представляет собой один из необходимых этапов в биологической характеристике вновь выявленных штаммов. Однако в настоящее время дорогостоящей проверке вирулентности на лабораторных животных не существует альтернативы (19). В связи с этим поиск генов, ответственных за патогенность *H. parasuis*, остается актуальной задачей, над которой работают многие исследователи. Методами генной инженерии удалось выявить потенциальные гены, отличающие вирулентные штаммы от авирулентных (8-10). К сожалению, роль этих генов в патогенезе заболевания остается неизученной, к тому же генетический скрининг большего числа изолятов *H. parasuis* из разных стран позволил бы глубже понять роль этих генов в симптоматике, связанной с конкретным изолятом.

Анализ генов (8-10), кодирующих факторы патогенности, у 15 референтных штаммов *H. parasuis* выявил корреляцию ($p < 0,05$) вирулентных свойств этих штаммов с наличием 8 генов: *vtaA*, *fhuA*, *sclB11*, *nhaC*, *sclB7*, *HAPS_0254*, *hhdA* и *hhdB* (8-10). В настоящей работе мы изучили 5 штаммов и 23 изолята, выделенные в 13 субъектах РФ от свиней с клиническими признаками гемофилезного полисерозита (см. табл. 2), с проведением скрининга по 10 локусам, которые, согласно данным литературы, могут отвечать за вирулентность.

Локус *vtaA* наиболее полно охарактеризован в качестве гена фактора патогенности у *H. parasuis* (17, 20, 21). Кодируемое им семейство белков образует β -складки во внешней мембране грамотрицательных бактерий (17, 20, 21). У разных бактерий *vtaA* вовлечен в обеспечение адгезии к клеткам хозяина, противодействия сывороточных антител и избегания фагоцитоза (17, 20, 21). Мы установили наличие гена *vtaA* группы 1 у всех 28 изученных российских штаммов и изолятов. Однако А. Olvera с соавт. (9) при исследовании референтных штаммов обнаружили ген *vtaA* у всех высоко- и средневирулентных штаммов и только у одного авирулентного (штамм 174 7-го серотипа). В исследованиях по валидации использованной этими авторами тест-системы на полевых пробах ген *vtaA* был выявлен в 41,5 % образцов материала (носовые смывы) от животных из хозяйств, благополучных по гемофилезному полисерозиту, но тем не менее содержащих геном *H. parasuis* (9, 22). Таким образом, выявление гена *vtaA* во всех российских штаммах и изолятах *H. parasuis* подтверждает факт их выделения от свиней с клиническими признаками гемофилезного полисерозита и служит свидетельством потенциальной патогенности этих бактерий. Ген *cirA*, кодирующий белок-переносчик железа, мы обнаружили у 18 из 28 представителей *H. parasuis*, выделенных на территории РФ. Первоначально этот ген был выявлен М. Sack и N. Baltes (10) как один из локусов высоковирулентного штамма Nagasaki (5-й серотип), вероятно, ассоциированных с патогенностью. Всего авторы идентифицировали 4 гена (*hhdA*, *hhdB*, *cirA* и *phage_related*), экспрессия которых была подтверждена у штамма Nagasaki с помощью PCR с обратной транскрипцией (10). Позднее К. J. Howell и соавт. (23) при исследовании более 200 штаммов *H. parasuis* установили, что *cirA* — один из 10 наиболее часто встречающихся генов, кодирующих потенциальные факторы пато-

генности, а локусы *hhdA*, *hhdB* — это псевдогены, которые не экспрессируются из-за мутаций в рамке считывания. В работе Р. Assavacheep с соавт. (24) в образцах биологического материала от павших свиней с помощью такой же системы праймеров ген *hhdA* выявили в 12 из 20 образцов, а *hhdB* — в 8 из 20 образцов. При скрининге российских изолятов мы обнаружили гены *hhdA* и *hhdB* соответственно у 15 и 14 представителей *H. parasuis*. К сожалению, эпидемиологические данные по остальным генам в доступной литературе отсутствуют.

При анализе связи между наличием генов и биологическими свойствами *H. parasuis* мы использовали результаты А.В. Потехина с соавт. (25), исследовавших патогенность штаммов ИЛ-1-ДЕП, СК-1-ДЕП, КОМИ ДЕП и изолятов Краснодар, Надеево-2, Ботово-2 на мышках, морских свинок и поросятах (табл. 3).

3. Результаты определения патогенных свойств бактерий *Haemophilus parasuis* при экспериментальном заражении беспородных свиней в условиях вивария (25)

Штамм, изолят	Число животных, гол.			
	с клиническими признаками	павших	с патологическими изменениями	от которых выделена культура
Штамм ИЛ-1-ДЕП	4	2	4	4
Штамм СК-1-ДЕП	0	0	0	0
Изолят Краснодар	3	0	3	3
Штамм КОМИ ДЕП	3	0	2	1
Изолят Надеево-2	1	0	0	0
Изолят Ботово-2	0	0	0	0
Контроль	0	0	0	0

Шесть представителей *H. parasuis* (ИЛ-1-ДЕП, ИЛ3, Т72, ТО1, КОМИ ДЕП, Надеево-2) по наличию 9 локусов и отсутствию локуса *phage_related* совпали с высоковирулентными референтными штаммами IA-84-17975 (13-й серотип), IA-84-22113 (14-й серотип) и средневирулентным штаммом SD-84-15995 (15-й серотип) (8-10). Несмотря на то, что штаммы ИЛ-1-ДЕП, КОМИ ДЕП и изолят Надеево-2 обладали одинаковыми факторами патогенности, их биологические свойства сильно различались: ИЛ-1-ДЕП вызвал гибель двух из четырех поросят, что свидетельствует о его высокой вирулентности; заражение КОМИ ДЕП приводило к тотальному поражению серозных оболочек плевральной, перикардиальной и перитонеальной полостей (штамм проявил среднюю вирулентность); у животных, экспериментально инфицированных изолятом Надеево-2, клинические признаки заболевания отсутствовали (25).

У поросят, зараженных изолятом Краснодар, в течение первых 3 сут наблюдали угнетенное состояние, отказ от корма и повышение температуры тела до 40,5-41,0 °С. Болезнь проходила с признаками полисерозита и с выпадением нитей фибрина во внутренние полости (25). В геноме этого изолята, который ранее был охарактеризован как средневирулентный, нами были выявлены локусы *vtaA* и *sclB7* — те же, что у непатогенного штамма СК-1-ДЕП. Таким образом, гены, которые предположительно кодируют факторы вирулентности, мы обнаружили и у патогенных, и у непатогенных представителей *H. parasuis*. Например, оказалось, что авирулентный изолят Ботово-2 содержал 9 из 10 локусов (отсутствовал ген *nhaC*), а авирулентный штамм СК-1-ДЕП — только 2 (*vtaA* и *sclB7*), причем эти сочетания локусов уникальны и не описаны в литературе. В целом более чем у половины изученных штаммов и изолятов (15 из 28) мы выявили сочетания генов, не встречающиеся, по данным литературы, ни у одного из 15 референтных штаммов всех 15 серотипов (8-10), что отражает высокую генетическую изменчивость бактерий (23) и свидетельствует о большем раз-

нообразии генотипов, чем серотипов (26). Следует также отметить, что авторы работ, в которых идентифицировали потенциальные факторы патогенности, определили гены только у 15 референтных штаммов, используемых для серотипирования, тогда как наша работа — одна из немногих, в которых гены, кодирующие потенциальные факторы патогенности, выявляли у полевых изолятов.

Полученные нами данные подтверждают гипотезу о мультифакторном характере вирулентности у *H. parasuis*, проявление которой зависит от генетических свойств бактерии и иммунологического статуса зараженного животного (27). Предпринятое изучение единичных локусов потенциальных факторов патогенности, конечно, недостаточно для глубокого анализа проблемы, но оно показывает необходимость разработки реалистичной модели заражения с привлечением методов системной биологии, полногеномного секвенирования и протеомного анализа для исследования максимально возможного числа изолятов (23, 28–30).

Итак, у 28 изученных представителей *Haemophilus parasuis*, выделенных на территории Российской Федерации, установлено присутствие всех генов, предположительно кодирующих факторы патогенности (*vtaA*, *fhuA*, *hhdA*, *hhdB*, *nhaC*, *cirA*, *HAPS_0254*, *sclB7*, *sclB11* и *phage_related*), в разных комбинациях. При этом у 15 обнаружены сочетания локусов, не описанные до настоящего времени в литературе. При сопоставлении полученных результатов с данными проведенных ранее исследований патогенности этих штаммов и изолятов для свиней и лабораторных животных интересным оказался тот факт, что штаммы ИЛ-1-ДЕП, КОМИ ДЕП и Надеево-2, обладающие одинаковым набором генов, характерным для патогенных штаммов 13-го, 14-го и 15-го серотипов, проявили соответственно высоковирулентные, средневирулентные и авирулентные свойства. Кроме того, нами было показано, что авирулентные штаммы содержат ген *vtaA* группы 1, ранее считавшийся характерным только для потенциально вирулентных штаммов.

Авторы выражают благодарность Н.В. Воложанцеву (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, пос. Оболensk) за предоставление изолятов Haemophilus parasuis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Загладова М.Х. Проблемы развития отрасли свиноводства в условиях ВТО. Российское предпринимательство, 2013, 14: 114–118 (doi: 10.18334/гр.14.14.1444).
2. Holtkamp D., Rotto H., Garcia R. Economic cost of major health challenges in large US swine production systems — Part 1. The Pig Site, 07 May 2007. Режим доступа: <http://www.thepigsite.com/articles/1935/economic-cost-of-major-health-challenges-in-large-us-swine-production-systemspart-1/>. Без даты.
3. Amano H., Shibata M., Kajio N., Morozumi T. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. J. Vet. Med. Sci., 1994, 56: 639–644 (doi: 10.1292/jvms.56.639).
4. Rapp-Gabrielson V.J., Oliveira S.R., Pijoan C. *Haemophilus parasuis*. In: Diseases of swine /B.E. Straw, J.J. Zimmerman (eds.). Ames, John Wiley & Sons, 2013.
5. Smart N.L., Miniats O.P., Rosendal S., Friendship R.M. Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in southern Ontario. Can. Vet. J., 1989, 30: 339–343.
6. Olvera A., Cerda-Cuéllar M., Aragon V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. Microbiology, 2006, 152: 3683–3690 (doi: 10.1099/mic.0.29254-0).
7. Mullins M.A., Register K.B., Brunelle B.W., Aragon V., Galofré-Mila N., Bayles D.O., Jolley K.A. A curated public database for multilocus sequence typing (MLST) and analysis of *Haemophilus parasuis* based on an optimized typing scheme. Vet. Microbiol., 2013, 162: 899–906 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.019).

8. Wang X., Xu X., Zhang S., Guo F., Cai X., Chen H. Identification and analysis of potential virulence-associated genes in *Haemophilus parasuis* based on genomic subtraction. *Microb. Pathogenesis*, 2011, 51: 291-296 (doi: 10.1016/j.micpath.2011.06.007).
9. Olvera A., Pina S., Macedo N., Oliveira S., Aragon V., Bensaïd A. Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (*vtaA*). *Vet. J.*, 2012, 191: 213-218 (doi: 10.1016/j.tvjl.2010.12.014).
10. Sack M., Baltés N. Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.*, 2009, 136: 382-386 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.11.008).
11. Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.-D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, 68: 560-602 (doi: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004).
12. Turni C., Pyke M., Blackall P.J. Validation of a real-time PCR for *Haemophilus parasuis*. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, 108(4): 1323-1331 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04526.x).
13. Павелко В.И., Елаткин Н.П., Прутнова О.В. Определение чувствительности и специфичности ПЦР-РВ для идентификации бактерий *Haemophilus parasuis*. *Вестник ветеринарии*, 2013, 67: 65-68.
14. Mehta C.R., Hilton J.F. Exact power of conditional and unconditional tests: going beyond the 2x2 contingency table. *The American Statistician*, 1993, 47(2): 91-98 (doi: 10.2307/2685184).
15. Определитель бактерий Берджи в 2 томах. Т. 2. М., 1997.
16. Zhou H., Yang B., Xu F., Chen X., Wang J., Blackall P.J., Zhang P., Xia Y., Zhang J., Ma R. Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization. *Vet. Microbiol.*, 2010, 144: 377-383 (doi: 10.1016/j.vetmic.2010.01.023).
17. Pina S., Olvera A., Barcelo A., Bensaïd A. Trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis*: generation of an extensive passenger domain repertoire specific for pathogenic strains. *J. Bacteriol.*, 2009, 191: 576-587 (doi: 10.1128/JB.00703-08).
18. Olvera A., Pina S., Pérez-Simy M., Oliveira S., Bensaïd A. Virulence-associated trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis* are antigenic proteins expressed in vivo. *Vet. Res.*, 2010, 41: 26 (doi: 10.1051/vetres/2009074).
19. Aragon V., Cerda-Cuellar M., Fraile L., Mombarg M., Nofrarias M., Olvera A., Sibila M., Solanes D., Segalés J. Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. *Vet. Microbiol.*, 2010, 142: 387-393 (doi: 10.1016/j.vetmic.2009.10.025).
20. Costa-Hurtado M., Ballester M., Galofré-Mila N., Darji A., Aragon V. VtaA8 and VtaA9 from *Haemophilus parasuis* delay phagocytosis by alveolar macrophages. *Vet. Res.*, 2012, 43: 571 (doi: 10.1186/1297-9716-43-57).
21. Olvera A., Martínez-Moliner V., Pina-Pedrero S., Pérez-Simy M., Galofré-Mila N., Costa-Hurtado M., Aragon V., Bensaïd A. Serum cross-reaction among virulence-associated trimeric autotransporters (VtaA) of *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.*, 2013, 164(3-4): 387-391 (doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.022).
22. Oliveira S.R. Validation of a species-specific PCR able to discriminate invasive and non-invasive strains of *Haemophilus parasuis*. *Scientific Reports*, 2010: 13. Режим доступа: <https://goo.gl/4FLKMT>. Без даты.
23. Howell K.J., Weinert L.A., Chaudhuri R.R., Luan S-L., Peters S.E., Corander J., Harris D., Angen Ø., Aragon V., Bensaïd A., Williamson S.M., Parkhill J., Langford P.R., Rycroft A.N., Wren B.W., Holden M.T., Tucker A.W., Maskell D.J. The use of genome wide association methods to investigate pathogenicity, population structure and serovar in *Haemophilus parasuis*. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1179 (doi: 10.1186/1471-2164-15-1179).
24. Assavacheep P., Assavacheep A., Turni C. Detection of a putative hemolysin operon, *hhdBA*, of *Haemophilus parasuis* from pigs with Glässer disease. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2012, 24: 339-343 (doi: 10.1177/1040638711435805).
25. Потехин А.В., Русалеев В.С., Ширяев Ф.А. Патогенность штаммов и изолятов *Haemophilus parasuis* для свиней и лабораторных животных. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных (Владимир)*, 2007, 5: 256-263.
26. Zhang J., Xu C., Guo L., Shen H., Deng X., Ke C., Ke B., Zhang B., Li A., Ren T., Liao M. Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China. *Can. J. Vet. Res.*, 2012, 76(3): 224-229.
27. Blackall P.J., Turni C. Understanding the virulence of *Haemophilus parasuis*. *Vet. J.*, 2013, 198(3): 549-550 (doi: 10.1016/j.tvjl.2013.09.070).
28. Zhao M., Liu X.-D., Li X.Y., Chen H.B., Jin H., Zhou R., Zhu M.J., Zhao S.H. Systems infection biology: a compartmentalized immune network of pig spleen challenged with *Haemophilus parasuis*. *BMC Genomics*, 2013, 14: 46 (doi: 10.1186/1471-2164-14-46).
29. Bello-Orti B., Aragon V., Pina-Pedrero S., Bensaïd A. Genome comparison

- of three serovar 5 pathogenic strains of *Haemophilus parasuis*: insights into an evolving swine pathogen. *Microbiology*, 2014, 160: 1974-1984 (doi: 10.1099/mic.0.079483-0).
30. Li J., Peng H., Xu L-G., Xie Y-Z., Xuan X-B., Ma C-X., Hu S., Chen Z-X., Yang W., Xie Y-P., Pan Y., Tao L. Draft genome sequence of *Haemophilus parasuis* gx033, a serotype 4 strain isolated from the swine lower respiratory tract. *Genome Announcements*, 1(3): e00224-13 (doi: 10.1128/genomeA.00224-13).

ФГБУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных»,

600901 Россия, г. Владимир, мкр. Юрьево, ФГБУ «ВНИИЗЖ»,
e-mail: vasily.pavelko@icloud.com, sprygin@arriah.ru

Поступила в редакцию
29 марта 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 4, pp. 491-499

DETERMINATION OF VIRULENCE FACTORS IN *Haemophilus parasuis* ISOLATES

V.I. Pavelko, Yu.Yu. Babin, A.V. Sprygin, O.V. Pruntova

Federal Center for Animal Health Control, FGBU VNIIZZh, mkr. Yurievets, Vladimir, 600901 Russia, e-mail vasily.pavelko@icloud.com, sprygin@arriah.ru;

Acknowledgements:

The authors thank N.V. Volozhantsev (State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk) for providing isolates of *Haemophilus parasuis*.

Supported by Ministry of Agriculture of the Russian Federation

Received March 29, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2016.4.491eng

Abstract

Glasser's disease is a bacterial infection typically characterized by fibrinous polyserositis, polyarthrititis, meningitis, and occasionally acute pneumonia and septicemia. *Haemophilus parasuis* is the etiologic agent of Glasser's disease, leading to significant economic losses in swine industry. *H. parasuis* normally colonizes the upper respiratory tract of healthy pigs. Significant variation in virulence, serological and genetic properties has been shown across *H. parasuis* strains. However, stress, concomitant viral infections, or poor immune status allow *H. parasuis* to cause disease. The current literature contains a few studies that clarify differences in the genome between highly virulent and avirulent strains in the context of putative virulence factors. The objective of this study was to examine *H. parasuis* strains isolated on Russian pig farms during the 11-year study period (2000-2011) for the presence of putative virulence loci. We screened 6 strains and 23 field isolates for the presence of 10 virulence factors. Identification of NAD-dependent isolates was performed by biochemical analysis and species-specific real-time PCR. Putative virulence genes were amplified by PCR using different primer pairs. Genetic analysis confirmed that the virulence factors (*vtaA*, *fhuA*, *hhdA*, *hhdB*, *nhaC*, *HAPS_0254*, *sclB7*, *sclB11* and *phage_related*) exist in different combinations. Out of 28 strains studied, the *vtaA* gene was found in all strains, *sclB7* and *sclB11* genes were present in 24 and 25 strains respectively, the *cirA* gene in 18 out of 28, the *fhuA* gene in *HAPS_0254*, the *hhdA* gene in 15, the *hhdB* gene in 14, the *nhaC* gene in 12, the *phage_related* target in only 3 strains. Our findings identified 15 novel genotypes (LUB, Ural'skii-DEP, MB, SK-1-DEP, SK3, Krasnodar, Botovo-2, Botovo-5, Botovo-7, IL2, AI4, V171, SH6, SW124, VN). The strains IL-1-DEP, KOMI DEP and isolate Nadeevo-2 carried all the loci, except for *phage_related*, which has only been reported for the virulent strains IA-84-17975, IA-84-22113 and SD-84-15995. In contrast to the paper by A.B. Potehin et al. (2007), IL-1-DEP turned out to be highly virulent, KOMI DEP exhibited moderately virulence, and Nadeevo-2 showed no virulence at all. Interestingly, the *vtaA* group 1 gene, the main determinant of virulence, was identified in SK-1-DEP avirulent strain and Botovo-2 and Nadeevo-2 avirulent isolates. This work contributes to a better understanding of putative virulence factors in field isolates of *H. parasuis*.

Keywords: *Haemophilus parasuis*, virulence factors, Glasser's disease.

Научные собрания

IV МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ДОСТИЖЕНИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ В ВЕТЕРИНАРНУЮ ПРАКТИКУ»,
посвященная 55-летию учреждения аспирантуры для подготовки научных
работников в ФГБУ «ВНИИЗЖ»

(6 декабря 2016 года, г. Владимир, мкр. Юрьево)

Контакты и информация: <http://www.arriah.ru/main/conference/>