

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038530**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.10

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201691915

(22) Дата подачи заявки
2015.03.25

(54) ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ОСЛАБЛЕННЫЕ HISTOPHILUS SOMNI

(31) 61/970,195

(32) 2014.03.25

(33) US

(43) 2017.04.28

(86) PCT/US2015/022519

(87) WO 2015/148687 2015.10.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ЭНИМАЛ ХЕЛТ ЮэсЭй ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Коландер Тэмми, Лоренс Полрадж,
Бей Рассел (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) CHALLACOMBE ET AL.: "Complete genome sequence of Haemophilus somnus (Histophilus somni) strain 129Pt and comparison to Haemophilus ducreyi 35000HP and Haemophilus influenzae Rd", CA, 15 December 2006 (2006-12-15), XP055195914, the whole document

US-B1-6770273

SHIVAKUMARA SIDDARAMAPPA ET AL.: "Horizontal gene transfer in Histophilus somni and its role in the evolution of pathogenic strain 2336, as determined by comparative genomic analyses", BMC GENOMICS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 12, no. 1, 23 November 2011 (2011-11-23), page 570, XP021117810, ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-12-570 the whole document

(57) В изобретении предлагаются ослабленные штаммы *Histophilus somni*, содержащие их композиции и способы их получения и применения. Эти ослабленные штаммы могут экспрессировать на низком уровне или не экспрессировать различные вирулентность-ассоциированные гены относительно соответствующих патогенных бактерий. Преимущественно ослабленные штаммы *Histophilus somni* могут быть введены перорально, интраназально, внутритрахеально или подкожно.

B1

038530

**038530
B1**

Включение ссылкой

Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США USSN 61/970195, поданной 25 марта 2014 г., включенной в данный документ ссылкой в полном объеме. Все другие ссылки, приведенные в данном описании, также включены в данный документ ссылкой во всей полноте.

Заявление в отношении перечня последовательностей

Перечень последовательностей, связанный с этой заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в данное описание в виде ссылки. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей -MER_13_225P_ST25. Текстовый файл имеет размер 17356 KB; был создан 20 февраля 2014 г.; и представлен в электронном виде через EFS-Web, одновременно с подачей описания.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к вакцинам из генетически сконструированных ослабленных бактерий, особенно к тем, которые предоставляют широкую, безопасную и эффективную защиту от инфекций/заболеваний у животных подсемейства бычьих, вызванных *Histophilus somni* (ранее *Haemophilus somnus*). Настоящее изобретение также относится к способам получения ослабленных бактерий и к идентификации вариаций нуклеиновых кислот, которые связаны со снижением патогенности ослабленных бактерий.

Изобретение, соответственно, относится к иммуногенным или вакцинным композициям, содержащим бактерии согласно изобретению; например живые ослабленные бактерии. Бактерии могут быть инактивированы в композициях; но может быть выгодно, чтобы бактерии являлись живыми ослабленными *Histophilus somni*. Таким образом, изобретение также относится к способам получения и/или разработки таких композиций; например, культивированием, или выращиванием, или размножением бактерий на подходящей среде или в подходящей среде, сбором бактерий, необязательно, инактивацией бактерий и, необязательно, смешиванием с подходящим ветеринарно или фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем, разбавителем или несущей средой и/или адъювантом и/или стабилизатором. Таким образом, настоящее изобретение также относится к применению бактерий при разработке таких композиций.

Предшествующий уровень техники

Комплекс респираторных заболеваний бычьих (BRDC) включает несколько патогенных микроорганизмов и способствует значительному экономическому ущербу в промышленном скотоводстве. Затраты на лечение, включая как профилактическую вакцинацию, так и лекарственные средства после вспышки, по оценкам, составляют около \$4 млрд в год (Griffin, 1997). Экономические последствия дополняются связанным снижением производительности, которое наблюдается у животных с диагнозом BRDC; измеримыми потерями среднесуточного прироста, массы тела при забое и категории качества говядины (Babcock, 2010). Отчеты о конкретных финансовых потерях, связанных со снижением производительности различаются; вероятно, в связи с изменением определений в случае BRDC, они оцениваются в интервале от \$ 40 (Fulton, 2002) до почти \$ 300 (Duff and Gaylean 2011) на одно животное. Также было показано, что потеря производительности значительно возрастает с увеличением количества случаев, когда животное требует лечения BRDC (Fulton, 2002).

Histophilus somni (ранее *Haemophilus somnus*) были определены в качестве ключевого участника BRDC (Duff and Gaylean, 2011). Эта грамтрицательная плеоморфная коккобактерия, принадлежащая к семейству Pasteurellaceae (Korczak, 2004), составляет часть нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей и мочеполовых путей крупного рогатого скота, овец и других жвачных животных (Ward, 2006). Она тесно связана с другими коровьими патогенами, включая *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* (оба из которых также связаны с BRDC), а также человеческими патогенами *Haemophilus ducreyi* и *Haemophilus influenzae* (Challacombe, 2007).

По оценке высеваемость *H. somni* из верхних дыхательных путей здоровых телят достигает 50% без каких-либо клинических проявлений заболевания. Однако животные с диагнозом BRDC имеют еще более высокую высеваемость для данных бактерий (Griffin, 2010). В стрессовых условиях или состояниях иммуносупрессии *H. somni* могут колонизировать нижние дыхательные пути, эндокард или центральную нервную систему и были идентифицированы как этиологический агент при различных заболеваниях, таких как пневмония, эндокардит, артрит, аборт, сепсис и тромбозомболический менингоэнцефалит (ТЕМЕ) (Ward, 2006).

Во время забоя менее 15% животных, получающих надлежащее лечение BRDC (профилактические прививки и соответствующие антибиотики во время вспышки), проявляют признаки поражения легких, и эти поражения затрагивают менее 5% от общего объема легких (Griffin, 2010). И наоборот, 50% животных, не получавших правильного ухода, демонстрируют поражение легких во время убоя, и эти поражения могут затрагивать 15% или более от общего объема легких (Griffin, 2010). В одном из полевых исследований на более 10000 животных 459 телят (4,6%) умерли от заболевания в той или иной форме. Исследования смертности показали, что 279 случаев (60,8%), связаны с респираторными заболеваниями, и из этих случаев с респираторными инфекциями 226 (81,0%) были ассоциированы с *H. somni*-связанными пневмонией, плевритом или абсцессами (Ribble, 1988). Хотя лечение антибиотиками может быть успеш-

ным в ответ на инфекцию *H. somni*, возрастающая распространенность устойчивых к антибиотикам изолятов вызывает озабоченность (Duff и Gaylean, 2011). Профилактический уход с помощью вакцинации будет предпочтительным, поскольку он является активным, а не реактивным и является гораздо более экономически эффективным.

Многие вакцины *H. somni* в настоящее время доступны у различных компаний по уходу за здоровьем животных; однако эти вакцины преимущественно состоят из убитых бактеринов и были лицензированы более тридцати лет назад с целью предотвращения ТЕМЕ. Использование этих бактериновых вакцин было эффективным против ТЕМЕ, но, тем не менее, было показано, что данные вакцины оказывают нейтральное или даже отрицательное воздействие на респираторные заболевания скота, содержащегося на кормовых площадках. Отрицательные побочные эффекты включают IgE-индуцированный анафилактический шок и взаимодействия при вакцинации телят, инфицированных бычьим респираторно-синцитиальным вирусом (BRSV) (Griffin, 2010). Снижение распространенности ТЕМЕ, появление *H. somni*-связанной пневмонии в США и миокардита в Канаде, начиная с конца 1980-х годов, привели к необходимости дальнейшего изучения эффективных антигенов для производства вакцин (O'Toole, 2009).

H. somni-связанная пневмония является экономически важным состоянием для мясной и молочной промышленности. Существует мало доказательств полевой эффективности имеющихся в настоящее время вакцин, поэтому потребность в проведении исследований вакцин следующего поколения является оправданной.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание ослабленных бактерий, а также способа лечения и профилактики инфекции, вызываемой *H. somni*.

В одном воплощении вакцины содержат ослабленные *H. somni*, которые менее патогены по сравнению с более вирулентным штаммом. Комплексный анализ сравнительной последовательности показал отсутствие важных факторов вирулентности в ослабленных штаммах *H. somni* по отношению к более вирулентным штаммам. Таким образом, целью настоящего изобретения является создание ослабленных *H. somni*, у которых отсутствуют вирулентные факторы, которыми обладают более вирулентные штаммы *H. somni*.

Как определено в данном описании, термин "ген" будет использован в широком смысле и включает как кодирующие, так и не кодирующие последовательности (т.е. вышележащие и нижележащие регуляторные последовательности, промоторы, 5'/3' UTR, интроны и экзоны). Где предполагается ссылка только на кодирующую последовательность гена, термин "кодирующая последовательность гена" или "CDS" будет использоваться взаимозаменяемо в данном описании. Когда обсуждается конкретная нуклеиновая кислота, специалист сразу же будет иметь в своем распоряжении все производные формы этой последовательности (мРНК, вРНК, кРНК, ДНК, белок и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунологического (или иммуногенного) или защитного ответа против *H. somni*, а также к способам профилактики или лечения *H. somni*, или болезненного состояния (ий), вызванного *H. somni*, включающему введение ослабленных *H. somni* или композиции, содержащей ослабленные *H. somni*, животным, нуждающимся в этом. Кроме того, также предлагаются наборы, содержащие, по меньшей мере, штамм(ы) ослабленных *H. somni* и инструкции по применению.

Эти и другие воплощения изобретения раскрыты или очевидны из нижеследующего подробного описания или охватываются им.

Краткое описание чертежей

Полное и разрешающее описание настоящего изобретения, включая наилучший способ его осуществления, для специалиста с обычной квалификацией в данной области изложено более конкретно в оставшейся части описания, включая ссылки на прилагаемые чертежи, на которых

фиг. 1 показывает средний процент повреждения легких для каждого изолята и дозы, протестированные в модели заражения. Группы с различными буквами значительно отличаются согласно критерию Стьюдента, осуществленном на арксинус преобразованных данных;

фиг. 2 демонстрирует процент повреждения легких, наблюдаемый для каждого теленка в исследовании "вакцинация-заражение", где вакцина вводится интраназально. Колонки одного цвета представляют результаты для животных, вакцинированных одним и тем же изолятом. Вакцинационный изолят приведен ниже колонок, и все животные были заражены одним и тем же изолятом для контрольного заражения. Группы с одной и той же буквой(ами) не сильно отличаются по критерию Стьюдента, выполненного на арксинус трансформированных данных.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предлагаются нуклеотидные последовательности и гены, участвующие в ослаблении микроорганизма, такого как бактерии, например *H. somni*, продукты (например, белки, антигены, иммуногены, эпитопы), кодируемые нуклеотидными последовательностями, способы получения таких нуклеотидных последовательностей, продуктов, микроорганизмов, а также их применение, например, для получения вакцин или иммуногенных композиций или для выявления иммунологического или иммунного ответа или в виде вектора, например в виде экспрессирующего вектора (например, *in vitro*

или *in vivo* экспрессирующего вектора).

Мутации, идентифицированные в нуклеотидных последовательностях и генах микроорганизмов, дают новые и неочевидные ослабленные мутанты. Эти мутанты могут быть использованы для получения живых ослабленных иммуногенных композиций или живых ослабленных вакцин, имеющих высокую степень иммуногенности.

Идентификация мутаций обеспечивает новые и неочевидные нуклеотидные последовательности и гены, а также новые и неочевидные генные продукты, кодируемые нуклеотидными последовательностями и генами.

В одном воплощении настоящее изобретение обеспечивает штамм ослабленных *H. somni*, который способен обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у крупного рогатого скота против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к бактериям, содержащим ослабляющую мутацию в нуклеотидной последовательности или гене, где мутация модифицирует биологическую активность полипептида или белка, кодируемого геном, что приводит к ослабленной вирулентности бактерий.

В частности, настоящее изобретение включает штаммы ослабленных *H. somni* и содержащие их вакцины, которые вызывают иммунный ответ у животного, в частности штаммы ослабленных *H. somni*, которые вызывают, индуцируют или стимулируют ответ у крупного рогатого скота.

Особые представляющие интерес ослабленные штаммы *H. somni*, которые имеют мутации в генах относительно вирулентных штаммов. Следует признать, что в дополнение к штаммам, имеющим раскрываемые мутации, ослабленные штаммы, имеющие любое количество мутаций в описанных генах вирулентности, могут быть использованы при практическом осуществлении настоящего изобретения.

В другом аспекте новые штаммы ослабленных *H. somni* включены в безопасную, эффективную вакцину против *H. somni* и инфекций/заболеваний, вызванных *H. somni*.

В одном воплощении штамм ослабленных *H. somni* способен обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у крупного рогатого скота против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*.

В конкретном воплощении ослабленный штамм утратил один или несколько генов вирулентности по сравнению со штаммами, подобными ему генетически во всех остальных отношениях. В одном воплощении изобретения ослабленный штамм утратил и/или не экспрессирует белок семейства гликозид-гидролаз (HSM_1160) и липопротейн (HSM_1714). Отсутствующие гены, которые также могут вносить вклад в ослабленный фенотип штамма включают оксидазу 3 типа со множеством атомов меди (HSM1726) и регулятор транскрипции семейства TetR (HSM1734). В еще более конкретном воплощении изобретения ослабленный штамм такой же, как хранящийся в ATCC под номером PTA-121029.

В одном воплощении штамм можно вводить интраназально или подкожно.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к иммунологической композиции, содержащей раскрытые ослабленные штаммы *H. somni*. Композиция может дополнительно включать фармацевтически или ветеринарно-приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

В одном из воплощений композиция может обеспечивать безопасный и защитный иммунный ответ у крупного рогатого скота против последующего заражения вирулентными *H. somni*.

В еще одном воплощении изобретения композиция может содержать полученный методами генной инженерии, не встречающийся в природе ослабленный штамм *H. somni*, пригодный для применения в составе безопасной и эффективной вакцины и имеющий, по меньшей мере, следующие мутированные гены, в том числе полностью удаленные, для устранения возможности у генов экспрессировать их родственный генный продукт: HSM_0270, HSM_0338, HSM_0377, HSM_0598, HSM_0708, HSM_0749, HSM_0953, HSM_1160, HSM_1191, HSM_1257, HSM_1426, HSM_1616, HSM_1624, HSM_1728, HSM_1730, HSM_1734, HSM_1736, HSM_1737, HSM_1741, HSM_1793 и HSM_1889. В конкретном воплощении сконструированный штамм *H. somni* имеет идентичный ослабленный фенотип по сравнению с ТК#4.

В родственном воплощении композиция может содержать полученный методами генной инженерии, не встречающийся в природе ослабленный штамм *H. somni*, пригодный для применения в составе безопасной и эффективной вакцины, имеющий достаточное количество мутированных следующих генов, включая полностью удаленные, для устранения возможности у генов экспрессировать их родственный генный продукт: HSM_0270, HSM_0338, HSM_0377, HSM_0598, HSM_0708, HSM_0749, HSM_0953, HSM_1160, HSM_1191, HSM_1257, HSM_1426, HSM_1616, HSM_1624, HSM_1728, HSM_1730, HSM_1734, HSM_1736, HSM_1737, HSM_1741, HSM_1793 и HSM_1889. В конкретном воплощении сконструированный штамм *H. somni* имеет идентичный ослабленный фенотип по сравнению с ТК #4.

В другом воплощении композиция может содержать полученный методами генной инженерии, не встречающийся в природе, ослабленный штамм *H. somni*, пригодный для применения в составе безопасной и эффективной вакцины, и имеющий, по меньшей мере, следующие мутированные гены, в том числе полностью удаленные, для устранения способности гена экспрессировать его родственный генный продукт: HSM0077, HSM_0270, HSM_0708, HSM_0975, HSM_1191, HSM_1257, HSM_1448, HSM_1542, HSM_1571, HSM_1624, HSM_1714, HSM_1726, HSM_1728, HSM_1730, HSM_1734, HSM1736, HSM1737, HSM1741 и HSM1793. В конкретном воплощении сконструированный штамм *H. somni* имеет идентич-

ный ослабленный фенотип по сравнению с ТК #42.

В родственном воплощении изобретения композиция может содержать полученный методами генной инженерии, не встречающийся в природе, ослабленный штамм *H. somni*, пригодный для применения в составе безопасной и эффективной вакцины, имеющий, по меньшей мере, достаточное количество следующих мутированных генов, в том числе полностью удаленных, для устранения способности гена экспрессировать его родственный генный продукт: HSM_0077, HSM_0270, HSM_0708, HSM_0975, HSM_1191, HSM_1257, HSM_1448, HSM_1542, HSM_1571, HSM_1624, HSM_1714, HSM_1726, HSM_1728, HSM_1730, HSM_1734, HSM_1736, HSM_1737, HSM1741 и HSM1793. В конкретном воплощении сконструированный штамм *H. somni* имеет идентичный ослабленный фенотип по сравнению с ТК #42.

В другом воплощении композиция может содержать полученный методами генной инженерии, не встречающийся в природе, ослабленный штамм *H. somni*, пригодный для использования в составе безопасной и эффективной вакцины, и имеющий, по меньшей мере, следующие мутированные гены, в том числе полностью удаленные, для устранения способности гена экспрессировать его родственный генный продукт: HSM_0268, HSM_0270, HSM_0274, HSM_0598, HSM_0708, HSM_0749, HSM_0938, HSM_1022, HSM_1160, HSM_1191, HSM_1212, HSM_1257, HSM_1542, HSM_1571, HSM_1667, HSM_1728, HSM_1730, HSM_1736, HSM_1737, HSM_1741, HSM_1793 и HSM_1889. В конкретном воплощении сконструированный штамм *H. somni* имеет идентичный ослабленный фенотип по сравнению с ТК #34.

В родственном воплощении изобретения композиция может содержать полученный методами генной инженерии, не встречающийся в природе, ослабленный штамм *H. somni*, пригодный для применения в составе безопасной и эффективной вакцины, имеющий, по меньшей мере, достаточное количество следующих мутированных генов, в том числе полностью удаленных, для устранения способности гена экспрессировать его родственный генный продукт: HSM_0268, HSM_0270, HSM_0274, HSM_0598, HSM_0708, HSM_0749, HSM_0938, HSM_1022, HSM_1160, HSM_1191, HSM_1212, HSM_1257, HSM_1542, HSM_1571, HSM_1667, HSM_1728, HSM_1730, HSM1736, HSM1737, HSM1741, HSM1793 и HSM_1889. В конкретном воплощении сконструированный штамм *H. somni* имеет идентичный ослабленный фенотип по сравнению с ТК #34.

Теперь, когда авторы раскрыли эти достаточные наборы ослабляющих генных делеций, специалисту в данной области будет понятно, что только нерутинная работа позволит определить какая из субкомбинаций этих генных делеций необходима для получения сравнимо- или эквивалентно-ослабленных вакцинных штаммов *H. somni*.

В другом воплощении композиция может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный антиген, связанный с или полученный из коровьего патогена, отличного от *H. somni*.

В одном воплощении по меньшей мере один или несколько дополнительных антигенов способны индуцировать у крупного рогатого скота иммунный ответ против *H. somni*, комплекса респираторных заболеваний бычьих (BRDC), бычьего респираторно-синцитиального вируса (BRSV), бычьей вирусной диареи (BVD), бычьего парагриппа 3 (PI3), инфекционного ринотрахеита бычьих (IBR), бычьего вируса герпеса-1 (BHV-1), вируса блютанга (BTV) или любого другого возбудителя, способного инфицировать и вызывать заболевание или восприимчивость к болезни у крупного рогатого скота.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу вакцинации животного, включающему введение по меньшей мере одной из раскрытых иммунологических композиций, содержащих ослабленные штаммы *H. somni*.

В одном из воплощений вакцины *H. somni* дополнительно включают адъювант. В конкретном воплощении адъювант содержит целые бактерии и/или бактерий, в том числе *Clostridium*, *H. somni*, *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Histophilus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* или их комбинации и/или вариации. В некоторых воплощениях адъювант увеличивает выработку у животного IgM, IgG, IgA и/или их комбинаций.

В другом воплощении настоящее изобретение обеспечивает ослабленный штамм *Histophilus somni* (*H. somni*), который способен обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у животных подсемейства бычьих против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*; где ослабленный штамм утратил в своей геномной последовательности минимальное количество генов, кодирующих вирулентные факторы, относительно эталонного вирулентного штамма *H. somni*, с получением ослабленного штамма, не способного вызывать инфекцию у животных подсемейства бычьих.

В одном воплощении эталонный вирулентный штамм содержит последовательность геномной ДНК, которая кодирует по меньшей мере, около 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 2. В других воплощениях настоящего изобретения ослабленный штамм кодирует по меньшей мере примерно 99% таких же генов, как последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 3, 4 или 5. В конкретном воплощении изобретения ослабленный штамм(ы) экспрессирует любой ген фактора вирулентности на уровне примерно равном или ниже, чем (включая недетектируемый уровень) уровень соответствующего гена вирулентности, экспрессированного ослабленным штаммом, имеющим в своем геноме последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3, 4 или 5.

В конкретном воплощении изобретения ослабленный штамм утратил по меньшей мере около 99% таких же генов, что и штамм #4 *H. Somni* относительно штамма 2336 *H. somni*. В этом воплощении

штамм 2336 включает геномную последовательность, которая кодирует по меньшей мере около 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 6; а штамм #4 содержит геномную последовательность, которая кодирует по меньшей мере около 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1.

В конкретном воплощении ослабленный штамм является изолятом #4 (т.е. ТК #4), который депонирован в АТСС под номером РТА-121029. В другом воплощении ослабленный штамм является изолятом #42 (т.е. ТК #42), который депонирован в АТСС под номером РТА-121030.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к иммунологической композиции, содержащей любой из ослабленных штаммов, описанных в настоящем документе. В одном воплощении композиция содержит ослабленный штамм, который кодирует по меньшей мере около 99% таких же генов, как последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1, 3, 4 или 5.

В одном конкретном воплощении изобретения ослабленный штамм кодирует по меньшей мере примерно 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1. В родственном воплощении изобретения ослабленный штамм кодирует такие же гены, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1.

В одном из воплощений ослабленный штамм кодирует по меньшей мере примерно 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 4. В родственном воплощении изобретения ослабленный штамм кодирует такие же гены, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 4.

В еще одном воплощении изобретения ослабленный штамм кодирует по меньшей мере примерно 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 3. В родственном воплощении изобретения ослабленный штамм кодирует такие же гены, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 3.

В еще одном воплощении изобретения ослабленный штамм кодирует по меньшей мере примерно 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 5. В родственном воплощении изобретения ослабленный штамм кодирует такие же гены, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 5.

В одном из воплощений иммунологическая композиция дополнительно включает фармацевтически или ветеринарно-приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

В конкретном воплощении иммунологическая композиция способна индуцировать у животных подсемейства бычьих защитный иммунный ответ, который защищает животных подсемейства бычьих от последующего воздействия вирулентным штаммом *H. somni*.

В другом воплощении иммунологическая композиция дополнительно включает по меньшей мере один или несколько дополнительных антигенов, которые способны индуцировать у животных подсемейства бычьих патоген-специфичный иммунный ответ. В конкретном воплощении по меньшей мере один или несколько дополнительных антигенов вызывают у животных подсемейства бычьих иммунный ответ, достаточный для защиты животного от последующего воздействия патогена, из которого был получен антиген. Таким образом, если коровий антиген PI3 входит в качестве компонента в иммунологическую композицию, то композиция должна вызывать защитный иммунный ответ.

В другом воплощении дополнительный антиген способен индуцировать у животных подсемейства бычьих иммунный ответ, который будет усиливать иммунный ответ животного против последующего контакта с комплексом респираторных заболеваний коров, BRSV, BVD, PI3 или любым другим патогеном, способным инфицировать и вызывать болезнь или предрасположенность к болезни у животных подсемейства бычьих. Например, антиген BRSV будет обеспечивать защиту от последующего воздействия вирулентным BRSV.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу вакцинации животного подсемейства бычьих, включающему стадию введения указанному животному подсемейства бычьих по меньшей мере одной дозы иммунологической композиции, описанной в данном документе.

Под термином "антиген" или "иммуноген" понимается вещество, которое индуцирует специфический иммунный ответ у животного-хозяина. Антиген может включать целый организм, убитый, ослабленный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; часть или фрагмент ДНК, которые способны индуцировать иммунный ответ при представлении животному-хозяину; полипептид, эпитоп, гаптен, или любые их комбинации. С другой стороны, иммуноген или антиген может включать токсин или антитоксин.

Термины "белок", "пептид", "полипептид" и "полипептидный фрагмент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот, и он может быть прерван химическими группами, отличными от аминокислот. Термины также включают аминокислотный полимер, который был изменен естественным образом или путем вмешательства; например формированием дисульфидных связей, гликозилированием, липидизацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с меткой или биоактивным компонентом.

Термин "иммуногенный или антигенный полипептид", используемый в данном документе, включа-

ет полипептиды, которые иммунологически активны в том смысле, что как только их вводят хозяину, они способны вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против белка. Предпочтительно, если белковый фрагмент является таким, что имеет, по существу, такую же иммунологическую активность, что и общий белок. Таким образом, фрагмент белка в соответствии с изобретением содержит или состоит, по существу, из или состоит из по меньшей мере одного эпитопа или антигенной детерминанты. "Иммуногенный" белок или полипептид при использовании в данном документе включает полноразмерную последовательность белка, ее аналог или ее иммуногенные фрагменты. Под термином "иммуногенный фрагмент" понимается фрагмент белка, который включает один или несколько эпитопов и, таким образом, вызывает иммунологический ответ, как описано выше. Такие фрагменты могут быть идентифицированы с использованием любого числа методик картирования эпитопов, хорошо известных в данной области. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Например, линейные эпитопы могут быть определены параллельным синтезом на твердых подложках большого числа пептидов, соответствующих частям белковой молекулы, и взаимодействию пептидов с антителами, при котором пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методы известны в данной области и описаны, например, в патенте США № 4708871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. Точно так же конформационные эпитопы легко идентифицируются путем определения пространственной конформации аминокислот, например путем рентгеновской кристаллографии и 2-мерного ядерного магнитного резонанса. См., например, *Epitope Mapping Protocols*, выше. Способы, особенно применимые к белкам *T. parva*, полностью описаны в PCT/US 2004/022605, включенные в данный документ в виде ссылки во всей своей полноте.

Как это обсуждалось в данном документе, настоящее изобретение охватывает активные фрагменты и варианты антигенного полипептида. Таким образом, термин "иммуногенный или антигенный полипептид" дополнительно рассматривает делеции, добавления и замены в последовательности при условии сохранения полипептидных функций для получения иммунологического ответа, как это определено в данном описании. Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка другим биологически аналогичным остатком, или замены нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты, таким образом, что закодированный остаток аминокислоты не изменяется или является другим биологически сходным остатком. В связи с этим, в частности, предпочтительные замены, как правило, консервативны по своей природе, т.е. являются заменами внутри семейства аминокислот. Так, например, аминокислоты, как правило, делятся на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Примеры консервативных вариаций включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток, или замены одного полярного остатка на другой полярный остаток, например замены лизина на аргинин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамин на аспарагин и т.п.; или подобная консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту, которая не будет иметь большое влияние на биологическую активность. Белки, имеющие, по существу, одну и ту же аминокислотную последовательность в качестве исходной молекулы, но имеющие незначительные аминокислотные замены, которые не оказывают существенного влияния на иммуногенность белка, таким образом, находятся в пределах определения эталонного полипептида. Все полипептиды, полученные этими изменениями, включены в данный документ. Термин "консервативная вариация" также включает использование замещенной аминокислоты вместо незамещенной родительской аминокислоты при условии, что антитела, индуцированные замещенным полипептидом также иммунореагируют с незамещенным полипептидом.

Термин "эпитоп" относится к участку на антигене или к гаптену, на который отвечают специфические В-клетки и/или Т-клетки. Термин также используется взаимозаменяемо с термином "антигенная детерминанта" или "участок антигенной детерминанты". Антитела, которые распознают один и тот же эпитоп, могут быть идентифицированы простым иммуноанализом, показывающим способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью.

"Иммунологический ответ" к композиции или вакцине представляет собой развитие в хозяине клеточного и/или антитело-опосредованного иммунного ответа на представляющую интерес композицию или вакцину. Обычно "иммунологический ответ" включает, без ограничения перечисленным, один или несколькими из следующих эффектов: продуцирование антител, В-клеток, Т-хелперов и/или цитотоксических Т-клеток, специфически направленных на антиген или антигены, включенные в представляющую интерес композицию или вакцину. Предпочтительно, если хозяин будет демонстрировать либо терапевтическую, либо защитную иммунологическую реакцию таким образом, чтобы устойчивость к новой инфекции была усилена и/или клиническая тяжесть заболевания снизилась. Такая защита будет продемонстрирована либо сокращением, либо отсутствием симптомов и/или клинических признаков заболевания, как правило, демонстрируемых инфицированным хозяином, более быстрое время восстановления и/или пониженный вирусный титр в инфицированном хозяине.

Под "животным" подразумевается млекопитающие, птицы и т.п. Животное или хозяин при исполь-

зовании в данном документе включает млекопитающих и человека. Животное может быть выбрано из группы, состоящей из лошадиных (например, лошади), псовых (например, собаки, волки, лисы, койоты, шакалы), кошачьих (например, львы, тигры, домашние кошки, дикие кошки, другие большие кошки и другие кошачьи, включая гепардов и рысей), овечьих (например, овцы), крупного рогатого скота (например, коров, телят, бычков-кастратов, быков), свиней (например, свинья), птиц (например, курица, утка, гусь, индейка, перепел, фазан, попугай, зяблик, ястреб, ворон, страус, эму и казуар), приматов (например, полуобезьяна, долгопят, обезьяна, гиббон, человекообразная обезьяна), хорьков, тюленей и рыбы. Термин "животное" также включает отдельное животное на всех стадиях развития, в том числе на стадиях новорожденного, эмбриона и плода.

Если иное не указано, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит данное описание. Термины в единственном числе включают множественное число, если контекст явно не указывает на иное. Точно так же слово "или" предназначено для включения "и", если контекст явно не указывает иное.

Следует отметить, что в данном описании и, в частности, в формуле изобретения и/или абзацах, такие термины, как "содержать", "содержит", "содержащий" и т.п., могут иметь значение, приписанное ему в патентном законодательстве США; например, они могут означать "включать", "включает", "включающий" и т.п.; и что такие термины, как "состоящий в основном из" и "в основном состоит из" имеют значение, присвоенное им в патентном законодательстве США, например, они разрешены для элементов явно не перечисленных, но исключают элементы, которые находятся в известном уровне техники или влияют на базовые или новые свойства настоящего изобретения.

Композиции.

Настоящее изобретение относится к вакцине *H. somni* или композиции, которая может включать ослабленный штамм *H. somni* и фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, наполнитель, или несущую среду, который вызывает, индуцирует или стимулирует реакцию у животного.

Термин "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" относится к РНК или ДНК, которая является линейной или разветвленной, одно- или двухцепочечной или их гибридом. Термин также включает гибриды РНК/ДНК. Ниже приведены не ограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мРНК, тРНК, рРНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги, урацил, другие сахара и связывающие группы, такие как фторрибоза и тиолат и нуклеотидные ветви. Нуклеотидная последовательность может быть дополнительно модифицирована после полимеризации, например, путем конъюгации с метящим компонентом. Другие типы модификаций, которые включены в данное определение, представляют собой кэпы, замена одного или нескольких естественных нуклеотидов на аналог, введение средств для прикрепления полинуклеотида к белкам, металлические ионы, метящие компоненты, другие полинуклеотиды или твердую подложку. Полинуклеотиды могут быть получены путем химического синтеза или получены из микроорганизма.

Термин "ген" используется в широком смысле для обозначения любого сегмента полинуклеотида, связанного с биологической функцией. Таким образом, гены включают интроны и экзоны, как в геномной последовательности, или только кодирующие последовательности, как в кДНК и/или регуляторных последовательностях, требуемых для их экспрессии. Например, ген также относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который экспрессирует мРНК или функциональную РНК, или кодирует специфический белок, и который включает регуляторные последовательности.

"Выделенный" биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота или белок или органелла) относится к компоненту, который был, по существу, отделен или очищен от других биологических компонентов клетки организма, в которой данный компонент содержится в природе, например других хромосомных и экстра-хромосомных ДНК и РНК, белков и органелл. Нуклеиновые кислоты и белки, которые были "выделены", включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты и белки, полученные с помощью рекомбинантной технологии, а также химического синтеза.

Термин "консервативная вариация" означает замену аминокислотного остатка на другой биологически аналогичный остаток или замены нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты, таким образом, чтобы закодированный остаток аминокислоты не изменялся или являлся другим биологически сходным остатком. В связи с этим, в частности, предпочтительные замены, как правило, консервативны по своей природе, как описано выше.

Термин "рекомбинантный" означает полинуклеотид полусинтетического или синтетического происхождения, который либо не существует в природе, либо связан с другим полинуклеотидом в расположении, не встречающимся в природе.

"Гетерологичный" означает полученный из сущности, все остальные признаки которой генетически отличаются от той сущности, с которой сравнивается. Например, полинуклеотид может быть помещен с

помощью методов генной инженерии в плазмиду или вектор, полученные из другого источника, и представляет собой гетерологичный полинуклеотид. Промотор, удаленный из нативной кодирующей последовательности и функционально связанный с кодирующей последовательностью, отличной от нативной последовательности, является гетерологичным промотором.

Полинуклеотиды по изобретению могут содержать дополнительные последовательности, такие как дополнительные кодирующие последовательности в пределах одной транскрипционной единицы, контролирующие элементы, такие как промоторы, сайты связывания рибосом, 5'-UTR, 3'-UTR, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования, дополнительные единицы транскрипции под контролем того же или другого промотора, последовательности, которые позволяют осуществить клонирование, экспрессию, гомологичную рекомбинацию, а также трансформацию клетки-хозяина, и любая такая конструкция, которая может быть необходима для обеспечения воплощения настоящего изобретения.

Способы применения и изделие.

Настоящее изобретение включает следующие воплощения способа. В одном из воплощений раскрывается способ вакцинации животного, включающий введение композиции, содержащей ослабленный штамм *H. somni* и фармацевтический или ветеринарно приемлемый носитель, наполнитель или несущую среду. В одном из аспектов этого воплощения изобретения животное представляет собой крупный рогатый скот.

В одном воплощении настоящего изобретения может быть использован режим "прайм-буст", который состоит по меньшей мере из одного первичного введения и по меньшей мере одного бустерного введения с использованием по меньшей мере одного обычного полипептида, антигена, эпитопа или иммуногена. Как правило, иммунологическая композиция или вакцина, используемая в первичном введении, отличается по своему характеру от тех, которые используются в качестве бустера. Тем не менее, следует отметить, что та же композиция может быть использована для первичного введения и бустерного введения. Этот протокол введения называется "прайм-буст".

Режим "прайм-буст" включает по меньшей мере одно праймирующее введение и по меньшей мере одно бустерное введение с использованием по меньшей мере одного обыкновенного полипептида и/или его вариантов или фрагментов. Вакцина, используемая в праймирующем введении, может быть отлична по своей природе от той, что используется позже в качестве бустерной вакцины. Праймирующее введение может включать одно или несколько введений. Аналогичным образом, бустерное введение может включать одно или несколько введений.

Объем дозы композиций для целевых видов, которыми являются млекопитающие, например, объем дозы композиций для коров или крупного рогатого скота на основе бактериальных антигенов обычно составляет от около 0,1 до около 2,0 мл, от около 0,1 до около 1,0 мл и от около 0,5 до примерно 1,0 мл.

Эффективность вакцин может быть протестирована через от около 3 до 5 недель после последней иммунизации путем заражения животных, таких как крупный рогатый скот, вирулентным, гетерологичным штаммом *H. somni*. Животное может быть заражено интраназально, интратрахеально и/или транстрахеально. Образцы из носовых ходов, трахеи, легких, головного мозга и/или ротовой полости могут быть собраны до и после заражения и могут быть проанализированы на наличие *H. somni*-специфического антитела.

Композиции, включающие ослабленные вирусные штаммы по настоящему изобретению, используемые в протоколах "прайм-буст", содержатся в фармацевтически или ветеринарно приемлемом носителе, разбавителе или наполнителе. Протоколы изобретения защищают животное от *H. somni* и/или предотвращают прогресс заболевания у зараженного животного.

Различные типы введения предпочтительно представляют собой одноразовое введение, но множественные дозировки могут быть осуществлены независимо от 1 до 6 недель. Предпочтительный интервал составляет от 2 до 3 недель, и также предусмотрен годовой бустер. В одном воплощении композиции вводят телятам, которые имеют возраст от около 5 до около 6 недель. В другом воплощении телятам может быть от около 3 до около 4 недель.

Специалистам в этой области должно быть понятно, что раскрытие в данном документе предоставлено для примера, и настоящее изобретение не ограничивается им. Из данного описания и информации в данной области специалист может определить количество введений, пути введения и дозы, которые будут использоваться для каждого протокола инъекции без проведения излишних экспериментов.

Другое воплощение настоящего изобретения представляет собой набор для осуществления способа выявления или индукции иммунологического или защитного ответа против *H. somni* у животного, включающий иммунологическую композицию или вакцину с ослабленными *H. somni* и инструкции для выполнения способа доставки в количестве, эффективном для индукции иммунного ответа у животного.

Другое воплощение настоящего изобретения представляет собой набор для осуществления способа индукции иммунологического или защитного ответа против *H. somni* у животного, который включает композицию или вакцину, содержащую ослабленный штамм *H. somni* согласно изобретению и инструкции для выполнения способа доставки в количестве, эффективном для индукции иммунного ответа у животного.

Фармацевтически или ветеринарно приемлемые носители или несущие среды или наполнители хо-

рошо известны специалистам в данной области. Например, фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель или несущая среда или наполнитель может представлять собой 0,9% раствор NaCl (например, физиологический раствор) или фосфатный буфер. Другие фармацевтически или ветеринарно приемлемые носитель или несущая среда или наполнитель, которые могут быть использованы в способах данного изобретения, включают, без ограничения указанным, поли(L-глутамат) или поливинилпирролидон. Фармацевтически или ветеринарно приемлемые носитель или несущая среда или наполнитель могут представлять собой любое соединение или комбинацию соединений, которые способствуют введению ослабленных бактерий. Дозы и объемы в данном документе обсуждаются в общем описании и могут также быть определены специалистами в данной области из этого описания в сочетании с информацией в данной области, без проведения излишних экспериментов.

Хотя раскрытые результаты были получены без использования вспомогательного средства, иммунологические композиции и вакцины могут дополнительно содержать или, по существу, состоять из соответствующего адъюванта. Подходящие адъюванты для практического применения представляют собой (1) полимеры акриловой или метакриловой кислоты, малеиновый ангидрид и алкенильные производные полимеров, (2) иммуностимулирующие последовательности (ISS), такие как олигодезоксирибонуклеотидные последовательности, имеющие одну или несколько неметилированных CpG единиц (Klinman et al., 1996; WO 98/16247), (3) эмульсии масло-в-воде, такие как эмульсии SPT, описанные на стр. 147 "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" published by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, и эмульсию MF59, описанную на стр. 183 той же работы, (4) катионные липиды, содержащие соль четвертичного аммония, например DDA, (5) цитокины, (6) гидроксид алюминия или фосфат алюминия, (7) сапонин или (8) другие адъюванты, обсуждаемые в любом документе, процитированном и включенном ссылкой в текущую заявку, или (9) любые комбинации или их смеси.

В одном воплощении вспомогательные вещества включают те, которые способствуют улучшенной абсорбции через слизистые оболочки. Некоторые примеры включают MPL, LTK63, токсины, микрочастицы PLG и ряд других (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). В одном воплощении адъювант может быть хитозаном (Van der Lubben et al. 2001; Patel et al. 2005; Majithiya et al. 2008; пат. США № 5980912).

Список литературы

- Alekshun, M. N. and Levy, S. B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128(6):1037-1050.
- Asgarali, A. Stubbs, K. A., Oliver, A., Vocadlo, D. J., and Mark, B. L. 2009. Inactivation of the Glycoside Hydrolase NagZ Attenuates Antipseudomonal β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(6):2274-2282.
- Aubry, C *et al.* 2011. OatA, a peptidoglycan O-acetyltransferase involved in *Listeria monocytogenes* immune escape, is critical for virulence. *J. Infect. Dis.* 204(5):731-740.
- Babcock, A.H. 2010. Epidemiology of Bovine Respiratory Disease and Mortality in Commercial Feedlots. Kansas State University (doctoral dissertation).
- Berghaus, L. J., Corbeil, L. B., Berghaus, R. D., Kalina, W. V., Kimball, R. A., and Gershwin, L. J. 2006. Effects of dual vaccination for bovine respiratory syncytial virus and *Haemophilus somnus* on immune responses. *Vaccine*. 24:6018-6027.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., and Hobman J. L. 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*. 27:145-163.
- Challacombe *et al.* 2007. Complete Genome Sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and Comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* Rd. *Journal of Bacteriology* 189(5); p 1890-1898.
- Corbeil, L. B. *et al.* 1985. Serum susceptibility of *Haemophilus somnus* from bovine clinical cases and carriers. *Journal of Clinical Microbiology*. 22(2):192-198.
- Cox, A. D., Howard, M. D., Brisson, J.-R., Van Der Zwan M., Thibault, P., Perry, M. B., and Inzana, T. J. 1998. Structural analysis of the phase-variable lipooligosaccharide from *Haemophilus somnus* strain 738. *European Journal of Biochemistry*. 97:253(2):507-516.
- Daines D. A. , Jarisch J., and Smith A. L. 2004. Identification and characterization of a nontypeable *Haemophilus influenzae* putative toxin-antitoxin locus. *BMC Microbiol.* Jul 26; 4:30.
- Duff and Gaylean 2011. Recent Advances in Management of Highly Stressed, Newly Received Feedlot Cattle. *Journal of Animal Science*. 85; p 823-840.
- Garbe, J. and Collin, M. 2012. Bacterial Hydrolysis of Host Glycoproteins – Powerful Protein Modification and Efficient Nutrient Acquisition. *Journal of Innate Immunity*. 4:121-131.
- Fulton, R.W. *et al.* 2002. Evaluation of Health Status of Calves and the Impact on Feedlot Performances: Assessment of a Retained Ownership Program for Postweaning Calves.

Can. J. Vet. Res. 66, 173-180.

Geertsema, R. S., Worby, C., Kruger, R. P., Tagawa, Y., Russo, R., Herdman, D. S., Lo, K. Kimball, R. A., Dixon, J., and Corbeil, L. B. 2008. Protection of mice against *H. somni* septicemia by vaccination with recombinant immunoglobulin binding protein subunits. *Vaccine*. 26:4506-4512.

Gershwin, L. J., Berghaus, L. J. Arnold, K., Anderson, M. L., and Corbeil, L. B. 2005. Immune mechanisms of pathogenic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. 2005. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 107:119-130.

Griffin, D. 2010, Bovine Pasteurellosis and other Bacterial Infections of the Respiratory Tract. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26(1); p57-71.

Griffin, D. 1997. Economic Impact Associated with Respiratory Disease in Beef Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13; p367-377.

Guzmán-Brambila, C *et al.* 2012. Two Outer Membrane Lipoproteins from *H. somni* are Immunogenic in Rabbits and Sheep and Induce Protection against Bacterial Challenge in Mice. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(11):1826-1832.

Huston, W. M., Jennings, M. P., McEwan, A. G. 2002. The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition. *Molecular Microbiology*. 45(6):1741-1750.

Kahler, C. *et al.* 1996. *IglF* and *RfaK* constitute the lipooligosaccharide *ice* (inner core extension) biosynthesis operon of *N. meningitidis*. *J. Bacteriology*. Dec. 6677-6684.

Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I. F., and Diep, D. B. 2010. The Abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *Journal of Bacteriology*. 192(8):2068-2076.

Korczak *et al.* 2004. Phylogeny of the Family Pasteurellaceae based on *rpoB* sequences. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 54; p 1393-1399.

Liu, T. *et al.* 2008. Immunological responses against *S. enterica* serovar Typhimurium Braun lipoprotein and lipid A mutant strains in Swiss-Webster mice: Potential use as live-attenuated vaccines. *Microbial Pathogenesis*. 44(3):224-237.

Perera, I. C. and Grove, A. 2010. Molecular Mechanisms of Ligand-Mediated Attenuation of DNA Binding by MarR Family Transcriptional Regulators. *JMCB*. 2(5):243-254.

O'Toole *et al.* 2009. Diagnostic Exercise: Myocarditis due to *Histophilus somni* in Feedlot and Backgrounded Cattle. *Veterinary Pathology*. 46; p1015-1017.

Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Trinidad Gallegos, M., Brennan, R., and Tobes, R. 2005. The TetR family of Transcriptional Repressors. *MMBR*. 69:326-356.

Ribble *et al.* 1988. Efficacy of Immunization of Feedlot Cattle with a Commercial *Haemophilus somnus* bacterin. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 52; p191-198.

Schäfer, A *et al.* 1994. Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergenic conjugation with *E. coli*. *J. Bacteriology*. 176(23):7309-7319.

Ward *et al.* 2006. *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) in Bighorn Sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 70; p. 34-42.

Изобретение будет теперь дополнено следующими неограничивающими примерами.

Примеры

В литературе сообщалось о ряде факторов вирулентности *H. somni*. Ни один из факторов вирулентности, как представляется, не играет доминирующей роли в возбудителе, но вместо этого, несколько факторов, по всей видимости, действуют согласованно, придавая вирулентность конкретному изоляту. Было выявлено семь факторов вирулентности: DR2 (прямой повтор, содержащий консервативный цитотоксический Fc-мотив в домене IbrA, вовлеченном в устойчивости к сыворотке), hst-I (CMP-Neu5Ac- β -Gal- α -(2-3)-сиалилтрансфераза, в случае которой было показано, что сиалилирование липоолигосахарида (LOS) ингибирует связывание антитела), lob2b (кодирующий гликотрансферазу, участвующую в синтезе LOS), NAN-лиаза (N-ацетилнейраминат лиаза, участвует в обмене веществ сиаловой кислоты), NAN-эпимераза (N-ацетилманнозамин-6-фосфат-2-эпимераза, участвует в транспорте и обмене углеводов), luxS (участие в ощущении кворума у бактерий AI-2) и uspE (универсальный стрессовый белок, необходим для подвижности клеток и агрегации при формировании биопленки). Конструировали праймеры для амплификации каждого из этих генов и оптимизировали параметры реакции ПЦР.

Для скрининга отобрали пятьдесят изолятов. Критерии отбора изолятов заключались в том, что они должны были быть выделены в течение примерно одного года после начала исследования и должны были быть из разных географических мест или из случаев, представляющих особый интерес с высоким возможным генотипическим разнообразием. Цель этого заключалась в том, чтобы посмотреть на наиболее актуальные изоляты, которые являются знаковыми для *H. somni* в данной области, а также попробовать и подвергнуть скринингу как можно больше вариабельностей. Изоляты оценивали по их росту и внешнему виду колоний, в дополнение к проведению ПЦР-реакций, проводимых для каждого представляющего интерес фактора вирулентности. Реакции ПЦР визуализировали в 1% агарозном геле. После отбора изолятов, основанном на росте, внешнем виде колоний и результатах ПЦР, для оценки представляющих интерес изолятов были идентифицированы и использованы модели на животных.

Пример 1. Разработка провокационной модели *H. Somni* на мышах.

На основе роста, географического разнообразия, а также информации о последовательности выбрали 21 изолят для оценки на мышах (табл. 1).

Таблица 1

Изоляты оценивали на предмет природных вакцинных кандидатов *H. Somni*

Изолят #	Случай #	Место нахождения	SEQ ID NO:
TK #1	12-0137-7	Гранд Вью, Айдахо	
TK #2	12-0137-8	Гранд Вью, Айдахо	
TK #3	12-0137-9	Гранд Вью, Айдахо	
TK #4	12-0137-4	Гранд Вью, Айдахо	1
TK #5	12-0137-6	Гранд Вью, Айдахо	
TK #14	12-0137-13	Гранд Вью, Айдахо	
TK #15	12-0137-11	Гранд Вью, Айдахо	
TK #21	11-4134-1	Маршалл, Миннесота	2
TK #22	11-4601-1	Грэйт Бенд, Канзас	
TK #24	11-2909-2	Карлайл, Кентукки	
TK #28	11-0125-1	Плейнвью, Техас	3
TK #30	11-3169-2	Лас Анимас, Колорадо	
TK #33	11-3454-4	Фэрмонт, Миннесота	
TK #34	11-3452-2	Фэрмонт, Миннесота	5
TK #37	12-0370-1	Креско, Айова	
TK #40	11-0012-1	Геттисберг, Южная Дакота	
TK #41	11-4378-2	Геттисберг, Южная Дакота	
TK #42	11-0141-1	Паркстон, Южная Дакота	4
TK #44	11-0263-1	Мескиг, Невада	
TK #47	11-4312-1	Сиу Сентер, Айова	
2336	2336	Открытый дикий тип (Контроль)	6

Изоляты, хранившиеся при -80°C , рассеивали штрихом на планшетах со средой Columbia с 5% овечьей кровью (CSBA) (Weston Dickinson, Франклин Лейке, Нью-Джерси). Чашки инкубировали при 37°C при 5% CO_2 . Через 18 ч после начала культивирования планшеты промывали 2 мл DPBS и полученный раствор разбавляли дополнительными DPBS и смешивали 1:1 культуру и FBS (предварительно нагретую до комнатной температуры) для того, чтобы получить конечную концентрацию от 5×10^8 до 1×10^9 КОЕ/дозу. После добавления FBS культуры инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре для того, чтобы положительно регулировать факторы вирулентности *H. somni*, а затем помещали на лед.

Каждой группе из десяти 18-20 г NSA: мышей CF-1 (Harlan Sprague Dawley)/изолят вводили 0,5 мл внутрибрюшинно (IP) заданного изолята. Контрольная группа из десяти мышей получала DPBS + FBS. Фильтрующие крышки размещали на верхней части каждой из мышинных клеток, при этом одной клетке соответствовало десять мышей/изолят. Изоляты разводили и высевали и планшеты инкубировали при

37°C с 5% CO₂ в течение двух дней. Планшеты подвергали счёту и фактическую КОЕ/дозу определяли для каждого изолята. Кроме того, пяти мышам инъецировали п.к. изоляты 2336 или ТК #33 для того, чтобы определить, является ли этот путь введения жизнеспособной альтернативой (для оценки вирулентности) относительно внутрибрюшинного пути. После заражения наблюдали ежедневно смертность у мышей.

Большинство изолятов дали в среднем и верхнем диапазоне 8 log КОЕ/дозу. Способ п.к. оказался неудачным способом заражения мышей. Изоляты ТК #4, ТК #24, ТК #14, контроль и 2336 привели к наименьшему проценту смертности, в то время как изоляты ТК #1, ТК #2, ТК #21, ТК #28 и ТК #30 привели к наибольшему проценту смертности (табл. 2).

Таблица 2

Процент смертности у 18-20 г мышей, зараженных изолятами, выращенными в планшетах

Изолят #	Путь	КОЕ/дозу	(%) Смертности
ТК #33	п.к.	3,7 x 10 ⁸	0
Контроль	в.б.	0	0
2336	в.б.	1,7 x 10 ⁹	0
2336	п.к.	1,7 x 10 ⁹	0
ТК #4	в.б.	7,6 x 10 ⁸	10
ТК #14	в.б.	8,7 x 10 ⁸	10
ТК #24	в.б.	5,5 x 10 ⁸	10
ТК #34	в.б.	7,2 x 10 ⁸	20
ТК #42	в.б.	5,9 x 10 ⁸	20
ТК #5	в.б.	6,2 x 10 ⁸	30
ТК #15	в.б.	7,5 x 10 ⁸	30
ТК #33	в.б.	3,7 x 10 ⁸	30
ТК #37	в.б.	7,3 x 10 ⁸	30
ТК #41	в.б.	9,9 x 10 ⁸	30
ТК #3	в.б.	8,6 x 10 ⁸	40
ТК #22	в.б.	8,0 x 10 ⁸	40
ТК #40	в.б.	9,9 x 10 ⁸	40
ТК #44	в.б.	9,0 x 10 ⁸	40
ТК #47	в.б.	7,0 x 10 ⁸	40
ТК #1	в.б.	8,0 x 10 ⁸	50
ТК #2	в.б.	8,7 x 10 ⁸	50
ТК #28	в.б.	7,1 x 10 ⁸	50
ТК #30	в.б.	4,8 x 10 ⁸	50
ТК #21	в.б.	5,1 X 10 ⁸	80

Провокационная модель. Два исследования были проведены для определения идеального соотношения КОЕ/дозу и получения провокационной культуры для мышей, которые в исследованиях вакцинации/провокации были бы больше, чем в предыдущем исследовании (т.е. с учетом трехнедельного роста между вакцинацией и провокацией). Для первого исследования использовали сорок 25-30 г NSA: мышей CF-1 (Harlan Sprague Dawley). Изолят H. somni ТК #21 рассеивали штрихом на CSBA. После ~24 ч роста при 37°C с 5% CO₂ изолят пересевали на дополнительные CSBA и выращивали в тех же самых условиях в течение 18-20 ч. Каждый планшет промывали 2 мл DPBS и собирали жидкость. Разведения смыва оригинального планшета делали для создания двух дополнительных растворов с различными КОЕ/дозу. Каждое разведение смешивали 1:1 с FBS для достижения конечных концентраций жидкостей для заражения в диапазоне от низких 8 log до низких 9 log/дозу. Контрольные жидкости получали с помощью 1:1 DPBS и FBS. Все культуры с добавленной FBS инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, а затем помещали на лед. Мышей заражали 0,5 см³ в.б. и отслеживали смертности после заражения. Провокационные культуры разводили и высевали для определения идеального соотношения КОЕ/дозу, необходимого для достижения максимальной смертности.

Затем провокационную культуру ТК #21 выращивали на планшетах и использовали мышей большей массы (25-30 г) для учета их ожидаемого размера через три недели после вакцинации, наибольший процент смертности был достигнут при 5,7×10⁸ КОЕ/дозу (табл. 3).

Таблица 3

Процент смертности при заражении 25-30 г мышей изолятами выращенными на планшетах

Группа	Изолят	КОЕ/дозу	(%) Смертности
1	ТК #21	$1,6 \times 10^9$	9,1
2	ТК #21	$5,7 \times 10^8$	27,3
3	ТК #21	$4,2 \times 10^8$	20
4	контроль	0	0

Окончательное провокационное исследование проводили с тридцатью 25-30 г мышами NSA: CF-1 (Harlan Sprague Dawley) для того, чтобы сравнить разницу между культурой, растущей в планшетах (как это обычно делается в литературе) или в жидкой питательной среде. Аналогично с вышеописанным изолятом ТК #21 удаляли из замороженного хранения и рассеивали на дополнительных планшетах. Для культуры в жидкой питательной среде планшет промывали 2 мл жидкой среды Columbia и 50 мкл добавляли к 25 мл предварительно подогретой жидкой среды Columbia. Культуру энергично перемешивали после добавления смыва культуры и затем помещали в шейкер при 37°C и 250 об/мин. Рост культуры контролировали и остановили, когда мы решили, что конечная провокационная культура со всеми добавленными жидкостями должна содержать среднее значение 8 log/дозу. Кроме того, провокационную культуру готовили промывкой планшета, как указано выше, с разведением DPBS до той же концентрации, что и культура в жидкой среде. Как культуру в жидкой среде, так и культуру с планшета смешивали в отношении 1:1 с FBS и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре перед размещением на льду. Одиннадцать мышей/способ заражали по 0,5 см³ в.б. смыва с планшета или жидкой среды, и 10 мышей служили в качестве контролей, получая смесь равных частей жидкой среды Columbia и DPBS, которую затем смешивали 1:1 с FBS. Наблюдали за смертностью мышей после заражения и разведения и высевания проводили для определения КОЕ/дозу.

Большая смертность мышей 25-30 г имела место, когда мышей заражали изолятом #21, выращенным в жидкой среде, по сравнению с тем же изолятом, выращенным на планшетах (табл. 4). Этот результат был неожиданным, особенно учитывая литературу, согласно которой специалист в данной области не должен использовать для выращивания *H. somni* жидкую питательную среду для применения в исследовании вирулентного заражения (Berghaus et al., 2006; Geertsema et al., 2008; Gershwin et al., 2005).

Таблица 4

Процент смертности 25-30 г мышей, зараженных изолятами, выращенными на планшетах/в жидкой питательной среде

Способ выращивания	Изолят	КОЕ/дозу	(%) смертности
Планшеты	ТК #21	$5,3 \times 10^8$	36,4
Жидкая питательная среда	ТК #21	$4,8 \times 10^8$	54,5
----	Контроль	----	0

Сто тридцать мышей NSA: CF-1, массой 18-20 г были приобретены у Harlan Sprague Dawley. Пять изолятов *H. somni* (ТК #42, #14 ТК, ТК #4, #24 ТК и ТК #34) выбирали из предыдущих исследований в качестве вакцинных кандидатов. Эти изоляты удаляли из хранилища и рассеивали штрихом на CSBA, на которой их инкубировали в течение ~24 ч при температуре 37°C и 5% CO₂. Изоляты переносили на новую CSBA и рассеивали на поверхности планшета, где им позволяли расти в течение ~18 ч. Планшеты промывали 2 мл жидкой среды Columbia. На основании предыдущих исследований, включавших выращивание этих изолятов, для изолятов ТК #42 и ТК #34 100 мкл смыва с планшета добавляли к 25 мл жидкой среды Columbia, а для изолятов ТК #4, ТК #14 и ТК # 24 50 мкл смыва с планшета добавляли к 25 мл жидкой среды Columbia.

Культуры инкубировали при 37°C и 200 об/мин. Рост изолятов контролировали и культуры удаляли из инкубации и разбавляли жидкой средой Columbia до около 1×10^8 КОЕ/дозу и разводили 1:10 для оценки еще одной вакцины при 1×10^7 КОЕ/дозу для каждого изолята. Контрольную группу вакцинировали стерильной жидкой средой Columbia, а другой контрольной группе прививали коммерчески доступный SOMUBAC® (Zoetis, инактивированная вакцина *Histophilus*, с адьювантом гидроксидом алюминия, Каламазу, Мичиган).

Каждую вакцину выдерживали на льду после приготовления, и каждая группа состояла из 10 мышей, за исключением контрольной группы с Columbia, которая включала 6 мышей. Вакцину доставляли п.к. в 0,5 см³. После вакцинации вакцины разводили и высевали для определения фактической КОЕ/дозу и мышей контролировали ежедневно на предмет побочных реакций и/или смерти. Эндотоксин, имеющийся в каждой вакцине, определяли с помощью набора *Limulus Amebocyte Lysate kit* (Lonza, Аллендейл, Нью-Джерси).

Через девятнадцать дней после вакцинации мышей заражали изолятом ТК #21 *H. somni*. Дикий тип получали для роста в жидкой питательной среде аналогично тому, как описано выше, за исключением того, что использовали 150 мкл смыва с планшета для инокуляции каждой из 2 колб, содержащих по 75 мл предварительно подогретой жидкой среды Columbia. Колбы инкубировали при 37°C и 250 об/мин. Культуру удаляли из инкубации, разводили и смешивали 1:1 с FBS комнатной температуры до значения

в середине 8 log/дозу. Культуру инкубировали с FBS при комнатной температуре в течение 5 мин и помещали на лед. Продукт для заражения расценивали при разбавлении для определения совпадения КОЕ/дозу с нашими оценками до заражения и после заражения. Мышам вводили 0,5 мл в.б. культуры для заражения и ежедневно отслеживали смертность.

У мышей, вакцинированных SOMUBAC® (Zoetis, инактивированная вакцина против *Histophilus* с адьювантом гидроксидом алюминия), а также изолятами ТК #34 и ТК #22, при 8 log развивались красные реакции в месте инъекции. Все изоляты, за исключением ТК #22, обеспечивают некоторую защиту мышей перед заражением по сравнению с контрольной группой. Изолят ТК #4 был эффективен в обеих дозах вакцины, однако изолят ТК #34 был лучшим при 8 log, а изоляты ТК #24 и ТК #42 были лучшими при 7 log. В обеих дозах изолят ТК #14 обеспечивал некоторую защиту, но меньшую, чем другие (табл. 5). В случае изолятов ТК #24 при 8 log и ТК #42 при 8 log умерла только одна мышь из 10 после вакцинации до заражения.

Таблица 5

Процент смертности у мышей, вакцинированных изолятом с низкой вирулентностью и зараженных изолятом с высокой вирулентностью

Изолят	Вакцина КОЕ/дозу	Вакцина ЕУ/дозу*	Заражение КОЕ/дозу	(%) смертности
ТК #4	$1,8 \times 10^7$	----	$5,1 \times 10^8$	10
ТК #4	$1,8 \times 10^8$	31,559	$5,1 \times 10^8$	20
ТК #14	$1,8 \times 10^7$	----	$5,1 \times 10^8$	40
ТК #14	$1,8 \times 10^8$	30,287	$5,1 \times 10^8$	40
ТК #22	$1,3 \times 10^7$	----	$5,1 \times 10^8$	60
ТК #22	$1,3 \times 10^8$	54,451	$5,1 \times 10^8$	80
ТК #24	$1,3 \times 10^7$	----	$5,1 \times 10^8$	10
ТК #24	$1,3 \times 10^8$	38,372	$5,1 \times 10^8$	33
ТК #34	$1,6 \times 10^7$	----	$5,1 \times 10^8$	40
ТК #34	$1,6 \times 10^8$	28,107	$5,1 \times 10^8$	0
ТК #42	$1,3 \times 10^7$	----	$5,1 \times 10^8$	10
ТК #42	$1,3 \times 10^8$	33,648	$5,1 \times 10^8$	33
SOMUBAC [®]	-----	-----	$5,1 \times 10^8$	10
Контроль	0	2,307	$5,1 \times 10^8$	67

* ЕУ/дозу = единиц эндотоксина/дозу; ЕУ/дозу определяли только для 8 log вакцин.

Пример 2. Провокация телят *H. somni*.

До начала тестирования вакцин-кандидатов необходимо было разработать провокационную модель на телятах. Для этого исследования были использованы двадцать голштинских бычков. Телят заражали в возрасте 54 дней с использованием либо изолята ТК #21, либо 153-3 (полученных из телят с подтвержденной клинической картиной заболевания из-за *H. somni*). Провокационную культуру готовили в жидкой питательной среде, аналогичной описанной выше. Для оценки КОЕ/дозу провокационной культуры ранее полученную стандартную кривую ($Y = -5 \cdot 10^{-8} \times +92,017$ ($x = \text{КОЕ/мл}$ и $y = \% \text{ T (540 нм)}$)) использовали для определения разведений, необходимых для достижения конечной концентрации заражения $\sim 2,5 \times 10^8$ и $2,5 \times 10^9$ КОЕ/дозу для каждого изолята. Культуру разбавляли EBSS с последующим добавлением в соотношении 1:1 FBS? после чего культуры инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Провокационные культуры помещали на лед вместе с дополнительным EBSS для внесения провокационной дозы. Для каждого из 4 телят на изолят и дозу 20 см^3 провокационной пробы назначали транс-трахеально и помещали в легкие с 60 см^3 EBSS. Четверо животных оставались в качестве незараженных контролей, которые были даны в 1:1 EBSS и FBS. Провокационную культуру разводили и высевали до и после заражения для определения фактического введенного КОЕ. Клинические признаки оценивались и регистрировались ежедневно одним и тем же лицом следующим образом.

Критерии оценки клинических признаков провокации у телят

Поведение	
Рейтинг	Критерии
0	Норма
1	Подавленное
2	Умеренно Подавленное
3	Тяжело Подавленное
Анорексия	
Рейтинг	Критерии
0	Норма
1	Незначительная мотивация к питанию
2	Отсутствует мотивация к питанию
3	Нет мотивации к питанию или взаимодействию → гуманное усыпление
Частота дыхания	
Рейтинг	Критерии
0	Норма
1	Повышенная частота дыхания
2	Затрудненное дыхание
3	Затрудненное дыхание и хрипы
Выделения из носа	
Рейтинг	Критерии
0	Норма
1	Небольшое количество одностороннего выделения
2	Двустороннее, чрезмерное выделение слизи
3	Обильное двустороннее выделение
Кашель	
Рейтинг	Критерии
0	Норма
1	Одиночный кашель
2	Иногда спонтанный кашель или повторный кашель
3	Повторный спонтанный кашель
Способность подниматься или ходить	
Рейтинг	Критерии
0	Норма
1	Подъем к приманке и мотивация к хождению
2	Подъем к приманке и отсутствие мотивации к хождению
3	Отсутствие мотивации к подъему/хождению → гуманное усыпление

Общий клинический показатель был рассчитан для каждого животного путем суммирования оценок, определенных для каждой категории. Если животное было найдено мертвым или отвечает критериям эвтаназии, то осуществляли некропсию и удаляли легкие. Лечащий ветеринар оценивал легкие на % площади поражений, и ткани подвергали анализу. Через 4 дня остальных животных подвергали эвтаназии и некропсии, как указано выше. Легочные поражения арксинус-трансформировали и анализировали с помощью функции "JMP Fit Y by X" и средние были отделены с помощью критерия Стьюдента.

Двадцать четыре голштинских бычка были разделены на пяти огороженных площадках, содержащих по пять животных для каждой вакцинации и 4 животных для невакцинированного контроля. Кроме того, четверем животным из незаражаемой группы провокационной модели, которых сохранили живыми после исследования вакцинация/заражение на телятах, назначили заражение на следующей неделе. Они содержались в отдельной огороженной площадке. Эти животные, упоминаемые как контроли из провокационной модели, были дополнительным экспериментальным контролем для того, чтобы убедиться, что нахождение в том же скотном дворе, но не на той же самой огороженной площадке, что и зараженные животные, может повлиять на результаты заражения этих животных. Вакцины были приготовлены как для мышей с использованием изолятов ТК #28, #42 ТК, ТК #4 и ТК #34. Вакцинные культуры готовили подобно вышеприведенной провокационной культуре без добавления FBS. По оценке вакцины содержали 5×10^8 КОЕ/дозу и доза составляла 2 см³, при этом по 1 см³ вводили в каждую ноздрю теленка.

Вакцины разводили и высевали для определения фактического КОЕ/дозу до вакцинации и после вакцинации. Здоровье животных после вакцинации контролировали. Мазки из носа и образцы крови забирали у животных в день -17 (один день после прибытия), 0 день (дата вакцинации, возраст телят = 35 дней), 14 день, 21 день и 33 день (дата заражения). Мазки из носа отправляли в диагностическую лабораторию Newport Laboratories для оценки бактериальных культур, а образцы крови сохраняли для возмож-

ной серологии. Всех животных с добавлением 4 контрольных животных из исследования провокационной модели заражали так же, как и выше с приблизительно 5×10 КОЕ/дозу. Клинические признаки, некропсии, поражения легких, бактериальную культуру, ПЦР на микоплазму и статистические данные проводили, как указано выше с общим клиническим баллом, а поражения легких также анализировали с помощью JMP Fit Y by X.

Для провокационного исследования фактическая КОЕ/дозу выращенных в планшетах была очень близкой к приблизительно $2,5 \times 10^9$ или $2,5 \times 10^8$ КОЕ/дозу, которые были спрогнозированы. Животные, зараженные изолятом ТК #21, дали $3,9 \times 10^9$ КОЕ/дозу для группы 9 log и $2,9 \times 10^8$ КОЕ/дозу для группы 8 log. Животные, зараженные изолятом 153-3, давали $1,8 \times 10^9$ КОЕ/дозу для группы 9 log и $1,7 \times 10^8$ КОЕ/дозу для группы 8 log.

Больше клинических признаков заболевания наблюдали у животных, зараженных изолятом ТК #21 при 9 log, чем у любой другой провокационной группы (табл. 7).

Кроме того, наблюдали более тяжелые поражения легких у животных, зараженных изолятом ТК #21, чем в любой другой провокационной группе (фиг. 1). У большинства телят, у которых имелись пневмонические поражения, из легочной ткани извлекали *H. somni*. На протяжении всего исследования *P. multocida* выделялись из носовых мазков и легочной ткани, но они по всей видимости не являются предрасполагающей причиной симптомов болезни, поскольку животные не демонстрировали клинические признаки пневмонии до периода после заражения. Кроме того, было подтверждено, что многие из животных положительные по *M. bovis* в легочной ткани или у них они подозревались. Как и следовало ожидать, *M. bovoculi* не детектировались.

Таблица 7

Средняя сумма клинических признаков, определенных в ходе исследования модели заражения

Изолят	Средний клинический балл*
153-3 (9 logs)	0,75
153-3 (8 logs)	0,25
Контроли	0,00
ТК #21 (9 logs)	7,00
ТК #21 (8 logs)	1,75

* Из последнего рейтинга, полученного из животных до смерти

Фактическая концентрация бактерий, используемых для вакцинации, была близка к примерно 5×10^8 КОЕ/дозу. *H. somni* извлекали только после вакцинации живыми бактериями из двух-трех животных в каждую из дат сбора носовых мазков в день 14, день 21 и день 33 после вакцинации. Носовые мазки показали, что *H. somni* могут оставаться жизнеспособными в носовых проходах в течение 21-33 дней, если не больше (табл. 8).

Таблица 8

Концентрация бактерий и эндотоксина, которые вводились телятам, вакцинированным интраназально изолятами ТК #28, #42 ТК, ТК #4 и ТК #34, и число изолятов *H. somni*, извлеченных из вакцинированных животных на протяжении всего исследования

Вакцинный изолят	Фактическое КОЕ/дозу	Единиц эндотоксина/мл	Выделение из носового мазка (день взятия) *
ТК #28	$3,90 \times 10^8$	27800	2 теленка (d21) 1 теленок (d33)
ТК #42	$4,40 \times 10^8$	31700	1 теленка (d14)
ТК #4	$7,80 \times 10^8$	25800	1 теленка (d21)
ТК #34	$6,20 \times 10^8$	42000	2 теленка (D14); 1 теленок (d33)
Контроль	0	<10000	Нет

Концентрация изолята ТК #21, даваемого каждому теленку в момент заражения, составила $7,39 \times 10^9$ КОЕ/дозу. Провокация была эффективной в определении эффективности вакцин и определении наиболее эффективного вакцинного кандидата.

Клинические признаки и процент поражения легких показывают, что изолят ТК #4 был наиболее эффективной вакциной, а изолят ТК #34 был наименее эффективным, в то время как изоляты ТК #28 и ТК #42 расположились между (табл. 9; фиг. 2). *H. somni* извлекали из легких всех телят в исследовании, за исключением 3 телят, все из которых были привиты изолятом ТК #4, что указывает на то, что причина смерти и/или болезни у животных с поражением легких была связана с провокационным изолятом. В ходе исследования из носовых проходов некоторых телят извлекали *P. multocida*, во все большем количестве по мере прогресса исследования. После заражения, *P. multocida* извлекали из ткани легкого 9 из 28 телят, а *M. bovis* были обнаружены в легких трех животных. Вакцинация, как представляется, не коррелирует с наличием или отсутствием *P. multocida* или *M. bovis*. Кроме того, контроли модели заражения были не столь чувствительны к заражению по сравнению с контрольными животными из данного исследования. Так как контроли модели заражения размещали в том же скотном дворе, что и зараженные жи-

вотные, они, возможно, приобрели некоторый иммунитет из-за предыдущей экспозиции (табл. 9).

Таблица 9

Клинические баллы животных, вакцинированных интраназально и зараженных *H. somni* дикого типа

Изолят	Средний клинический балл*
ТК #28	5,80 BC
ТК #42	6,00 BC
ТК #4	1,40 C
ТК #34	11,80 A
Контроли	10,50 AB
Контроли из провокационной модели	3,50 C

* означает средние клинические баллы из последнего рейтинга, полученного для животных перед смертью. Клинические баллы с разными буквами, существенно различаются в зависимости от критерия Стьюдента.

Обсуждение.

Поскольку данные в мышинной модели коррелируют с результатами, полученными на телятах, авторы предложили новый и полезный инструмент для отбора кандидатов вакцины/провокации для крупного рогатого скота. Изолят ТК #21 является отличным провокационным изолятом из-за вирулентности и воспроизводимости результатов. Идеальная провокационная доза, как представляется, составляет около среднего или вокруг от среднего до высокого 9 log на дозу у крупного рогатого скота при интраназальном введении.

При использовании в виде интраназальной вакцины изолят ТК #4 обладал большими защитными свойствами против последующего заражения *H. somni* (4 из 5 телят). Клинические признаки и поражения легких значительно отличались от невакцинированных животных. Изоляты ТК #28 и ТК #42 индуцировали некоторую защиту у вакцинированных телят, но эффективность была ниже (2 из 5 телят).

Пример 3. Сравнительный геномный анализ вирулентных и авирулентных изолятов *H. somni*.

Как уже говорилось выше, различные изоляты *H. somni* имели разные уровни вирулентности у мышей и крупного рогатого скота. Один, в частности ТК #4, оказался многообещающим в качестве кандидата интраназальной вакцины для крупного рогатого скота (пример 2). Кроме того, ТК #21 оказался весьма вирулентным провокационным изолятом для крупного рогатого скота и мышей, обладающий фенотипом, типичным для провокационных изолятов, используемых в литературе (2336 и HS91). Для того чтобы лучше понять факторы, влияющие на эту вирулентность, а также определить, является ли недавно полученные изоляты аналогичными старым изолятам, восемь изолятов *H. somni* были подвергнуты полногеномному секвенированию. Было обнаружено, что четыре гена, а именно белок семейства гликозидгидролаз, липопротеин, оксидаза 3 типа с множеством атомов меди и транскрипционный регулятор семейства TetR, отсутствуют в ТК #4, но присутствуют в ТК #21. Кроме того, недавно выделенные *H. somni* утратили от 211 до 316 генов, присутствующих в 2336, диком типе, выделенном в 1985 г. HS91, изолят 1991 г., утратил только 15 генов по сравнению с 2336. Данные свидетельствуют о том, что генотип ТК #4 способствует его авирулентному фенотипу, и что существует генетический дрейф в пределах популяции *H. somni* с течением времени. Результаты демонстрируют генетическое объяснение ослабления ТК #4 и потребность текущей вакцины и провокационных изолятов в поддержании эффективности ответа на естественный генетический дрейф.

Для того чтобы понять генетическую и молекулярную основу дифференциальной вирулентности, проводили 9-сторонний сравнительный анализ генома между ТК #4, ТК #21, ТК #34, ТК #28, ТК #42, HS91, 2336 (высоковирулентный штамм, по меньшей мере, по данным литературы), 129PT (известный авирулентный штамм в GenBank) и 153-3 (умеренно вирулентный штамм), против изолята GenBank 2336. Этот анализ также улучшит наше понимание возможного генетического дрейфа и позволит разграничить гены, участвующие в механизме вирулентности/авирулентности.

Материалы и методы.

Подготовка образцов для секвенирования.

Восемь изолятов *H. somni* были идентифицированы как разнообразный набор изолятов, которые могут дать полезную информацию при полногеномном секвенировании (табл. 10). Эти изоляты были из разных мест, имели широкий спектр вирулентности и были выделены из животных в разные годы. Все эти изоляты выращивали в жидкой питательной среде Columbia (BD Ref #294420; лот № 0292713, Франклин Лейке, Нью-Джерси) и после выращивания к ним добавляли 10% глицерин для замораживания культур в криогенных флаконах (Fisher Scientific Cat #10-500-26., Waltham, MA) в отделе научных исследований и разработок Newport Laboratories (Worthington, MN) в морозильной камере на -80°C. Изоляты удаляли из морозильной камеры и рассевали штрихом на планшетах со средой Columbia с агаром и овечьей кровью (CSBA) (BD Ref #22165/221263; лот № 2227132 2012 11 13, Франклин Лейке, Нью-Джерси). Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Через 24-26 ч планшеты вынимали из инкубатора и использовали для засева дополнительной CSBA для роста в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. После 16-18 ч инкубации планшеты промывали 2 мл подогретой жидкой среды Columbia и использовали

100 мкл или 150 мкл для получения культур в 25 мл жидкой среды Columbia для каждой из культур, с использованием одного матраса для каждого количества инокулята. Культуры в жидкой среде встряхивали при 200 об/мин и контролировали процент пропускания (% T) (540 нм) до тех пор, пока культура не достигала 15-20% T. Культуры в жидкой среде вынимали из инкубатора, осаждали три раза в той же самой микроцентрифужной пробирке откручиванием 1,5 мл культуры каждый раз в течение 2 мин при 15000 об/мин и геномную ДНК выделяли с использованием набора "Bacterial Genomic DNA Purification Kit" (Edge Biosystems, Гейтерсберг, Мэриленд), следуя рекомендациям производителя с небольшими модификациями. ДНК экстрагировали в трех повторах, из трех параллельных открученных осадков, полученных для каждой из культур. Модификация рекомендуемого процесса экстракции ДНК заключалась в том, что ДНК ресуспендировали в 100 мкл TE и инкубировали в течение 15 мин при 37°C для того, чтобы способствовать растворению осадка ДНК без фрагментации ДНК. Три экстракции затем объединяли, сравнивали на 1% агарозном геле, количественно оценивали и проверяли чистоту на NanoDrop. Количество ДНК было рассчитано для того, чтобы обеспечить необходимую общую ДНК для секвенирования в центре коллективного использования университета Айдахо (Москва, Айдахо).

Таблица 10

Перечень изолятов *H. somni*, использованных для сравнительного геномного анализа

Название изолята	Случай #	Место нахождения	Фенотип
TK #34	11-3452-2	Фэрмонт, Миннесота	Снижение смертности у мышей, но неспособность редуцировать пневмонию у крупного рогатого скота будучи использованным в виде вакцины а
HS91	НД	Эймс, Айова	Дикий тип 1991 года
TK #21	11-4134-1	Маршалл, Миннесота	Высоковирулентный у мышей и телят в провокационных исследованиях
TK #42	11-0141-1	Паркстон, Южная Дакота	Имели сниженную вирулентность у мышей и оказывают некоторую защиту в качестве вакцины для мышей и крупного рогатого скота
2336	НД	д-р Briggs	Промышленный стандарт для вирулентных <i>H. somni</i> ; Тем не менее, мы нашли непоследовательность при провокации, в результате чего возникает вопрос о возрасте и количестве пассажей
TK #28	11-0125-1	Плейнвью, Техас	Обеспечивает некоторую защиту крупного рогатого скота
TK #4	12-0137-4	Гранд Вью, Айдахо	Сниженная вирулентность у мышей, защита мышей и крупного рогатого скота от заражения
153-3	НД	Уэртингтон, Миннесота	Полученный недавно дикий тип, по всей видимости, ответственный за смерть телят. В титриметрическом анализе заражения телят не был таким же вирулентным, как TK #21.

Фильтрация высококачественных ридов и охват последовательности.

Для сравнения 129РТ из базы данных NCBI, учетный номер #CP000436, против 2336, учетный номер #CP000947, необходимо применять подход, схожий с полевыми изолятами. Таким образом, псевдо-риды были получены из 129РТ с помощью программного обеспечения для симуляции ридов ART (<http://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/biostatistics/art/>). ART запускали с помощью следующей командной строки: `artillumina -i Hs129PT.fasta -p -l 250 -f 60 -m 500 -s 10 -na -o Hs129PT_sim`, что соответствует `-p` = спаренные, `-l` = 250 п.о., `-f` = 60x охват, `-m` = средний размер фрагментов ДНК, `-s` = 10 стандартное отклонение размера фрагмента ДНК. Затем все риды изолята фильтровали по качеству с адаптерами Illumina TruSeq с использованием SeqClean, которая представляет собой программу для очистки ридов, разработанную в университете штата Айдахо (доступна на веб-сайте). Эта программа удаляет адаптеры для секвенирования и низкокачественные риды, которые содержат 5 или более оснований с Q-значением <20, тем самым устраняя ошибки во время чтения оснований и повышая точность.

Картирование ридов.

Результаты геномной ДНК были нанесены на карту против 2336 в базе данных NCBI, учетный номер #CP000947, с использованием параметров по умолчанию bowtie2. Фильтрацию с помощью пользовательского сценария для MAPQ <10 использовали для удаления многократно картированных ридов. Ожи-

далось, что идентичные изоляты имели коэффициент выравнивания >95%.

Охват генов.

Использовали Samtools для расчета охвата картирования для каждой позиции по отношению к эталону 2336. Программа была использована для того, чтобы вычислить процент оснований, который имел покрытие для каждого гена. Гены, которые содержали менее 80% оснований, были обозначены как отсутствующие для этого конкретного изолята. Два анализа были проведены по недостающим генам против 2336. Первый по сравнению с HS91 (из аналогичной эпохи с 2336), ТК #21, ТК #4, 153-3 и 129РТ. Второй по сравнению ТК #34, ТК #42, 2336 (для подтверждения соответствия нашего 2336 с базой данных), ТК #28 и 129РТ.

Острова патогенности (PI, Pathogenicity Islands) и интегративные и конъюгативные элементы (ICE, Integrative and Conjugative Elements).

Результаты полногеномного секвенирования HS91, ТК #21, ТК #4, 153-3 и 129РТ сравнивали с 2336. Острова патогенности (PI) и интегративные конъюгативные элементы (ICE) искали на основании наличия последовательностей фланкирующих сигнатур, таких как рекомбиназы, интегразы, транспозазы, геликазы и фаговые повторы. Геномные области, содержащие кластер из этих предполагаемых последовательностей, были идентифицированы как потенциальные PI или ICE.

Результаты.

Очищенные последовательности имели приблизительный охват 100х для всех изолятов. Степень покрытия дает нам уверенность в качестве выявленных оснований (табл. 11).

Таблица 11

Качество необработанных ридов и расчетное покрытие оснований для каждого секвенированного изолята

Библиотека	PE Риды	Секвенированные Основания	Расчетное необработанное покрытие	Очищенные PE риды	Основания, сохраняемые после очистки	Расчетное Очищенное Покрытие
ТК #34	454197	235274046	103,93	460095	210850732	93,14
HS91	554783	287377594	126,94	527851	243734387	107,66
ТК #21	583750	302382500	133,57	541644	249871771	110,37
ТК #42	527632	273313376	120,73	493941	228248524	100,82
2336	848512	439529216	194,15	809986	378965750	167,40
ТК #28	544568	282086244	124,60	520290	241511214	106,68
ТК #4	606064	313941152	138,68	570358	261675306	115,59
153-3	463065	239867670	105,96	441209	202578292	89,48

Выравнивание выявило различия между изолятами и эталонным штаммом. Изолят GenBank был на 99,67% идентичен геному 2336, секвенированному Newport Labs, что указывает на достоверность и точность сравнения между геномами на основании нашей карты. Из этих сравнений сходства других изолятов с 2336 были сделаны со вторым по значению сходством с HS91. Кроме того, комменсальный 129РТ (учетный номер #CP000436) в базе данных NCBI сравнивали с 2336 из базы данных в качестве эталонного сравнения (табл. 12).

Таблица 12

Процент данных секвенирования, которые выравнены с 2336 из GenBank, учетный номер #CP000947.

Изоляты перечислены от самого высокого до самого низкого процента выравнивания

Изолят	Степень выравнивания (%)
HS91	99,71
2336	99,67
153-3	96,11
ТК #34	92,11
ТК #4	91,30
ТК #21	88,35
129РТ*	87,92
ТК #42	83,84
ТК #28	83,33

* Учетный номер #CP000436

Среди данных изолятов 129РТ утратил множество вирулентных и связанных с вирулентностью генов по сравнению с 2336 дикого типа. Сравнительно недавно полученные изоляты утратили больше общих генов, чем более старые изоляты, если сравнивать с 2336 дикого типа (табл. 13).

Число генов, которые предположительно присутствуют или отсутствуют в каждом секвенированном изоляте по сравнению с 2336 с учетным номером #CP00947 в базе данных NCBI

Изолят	Присутствующие гены	Отсутствующие Гены
129РТ*	1593	472
ТК #34	1749	316
ТК #4	1758	307
ТК #21	1840	225
ТК #42	1848	217
153-3	1851	214
ТК #28	1854	211
2336	2048	17
HS91	2050	15

* Учетный номер #CP000436

При сравнении генов, которые отсутствуют в первом и втором анализе по сравнению с 2336, комменсал 129РТ утратил больше этих генов, ассоциированных с патогенностью и/или вирулентностью, чем любой другой сравниваемый изолят. В общей сложности 129РТ утратил 44 из всех 47 недостающих генов, скомпилированных из HS91, ТК #21, ТК #4, 153-3 и 129РТ (табл. 14). Также утрачены 44 из 47 полных недостающих генов, скомпилированных из ТК #34, ТК #42, 2336, ТК #28 и 129РТ (табл. 15). Было обнаружено, что изолят 2336 утратил только один идентифицированный как ассоциированный с патогенностью ген, присутствующий в базе данных NCBI. Этим геном является *YadA* домен-содержащий белок (табл. 15).

Вакцинный кандидат ТК #4 утратил в общей сложности 23 из возможных 47 отсутствующих генов в проанализированных изолятах. Этот кандидат утратил гены прикрепления и адгезии гемагглютинаина/гемоллизина, *YadA* домен-содержащих белков (в общей сложности отсутствует 5 повторов), и белка, содержащего гемагглютининовый домен. ТК #4 также утратил трансферрин-связывающий белок (для поглощения железа) и две изоформы оксидазы типа 3 с множеством атомов меди, которые обеспечивают способность к поглощению металлов, запасаемых хозяином. Гены, ответственные за колонизацию хозяина, такие как белок семейства гликозидгидролаз (колонизация носоглотки) и пептидазы S8/S53 субтилизина кексина седолизина также были утрачены в ТК #4. Кроме того, были утрачены гены, которые ответственны за лекарственную устойчивость или ответ на стресс-факторы, включая две изоформы транскрипционного регулятора семейства TetR, ацилтрансферазу 3, две изоформы транскрипционного регулятора семейства MarR, малый белок множественной лекарственной устойчивости, транскрипционный регулятор семейства MarR и белок стресс-зависимой системы рестрикции. И, наконец, ТК #4 утратил некоторые гены, которые влияют на способность патогена избегать защитных сил организма, такие как липоолигосахарид сиалилтрансфераза, липопротеин и белок семейства *Abi* (который участвует в собственном иммунитете от бактериоцинов) (табл. 14).

По сравнению с 2336 высокопатогенный ТК #21 также утратил сходные гены вирулентности, которые были обнаружены утраченными в ТК #4 (19 из 23 утраченных в ТК #4 генов), за исключением белка семейства гликозидгидролаз, липопротеина, одной изоформы оксидазы 3 типа с множеством атомов меди и одной изоформы транскрипционных регуляторов семейства TetR. Единственный ген, который утратил ТК #21, но который был у ТК #4, представляет собой один повтор *YadA* домен-содержащего белка (табл. 14).

HS91 был очень похож на 2336 и являлся эквивалентно вирулентным согласно опубликованной литературе. В HS91 не было обнаружено потери вирулентных или ассоциированных с вирулентностью генов, которые могли бы играть потенциальную роль в патогенезе (табл. 14).

Изолят 153-3 утратил многие потенциальные гены вирулентности, обнаруженные утраченными в ТК #4 (14 из 23 утраченных в ТК #4), но были утрачены некоторые дополнительные гены, которые присутствовали в ТК #4 (23 утраченных из в общей сложности 47 определенных во всех изолятах). В дополнение к ТК #4, 153-3 утратил белок внешней мембраны нитевидный гемагглютинин, адгезии, 10 повторов *YadA* домен-содержащего белка (по сравнению с 5 у ТК #4), белок семейства гликозилтрансфераз и ацетилтрансферазу. Гены, которые ТК #4 утратил, но которые присутствовали в 153-3, представляли собой белок стресс-чувствительной системы рестрикции, белок, содержащий гемагглютининовый домен, белок семейства гликозидгидролаз, липоолигосахарид сиалилтрансфераза, белок семейства *Abi*, липопротеин, одна изоформа оксидазы типа 3 с множеством атомов меди, одна изоформа транскрипционного регулятора семейства TetR и пептидаза S8/S53 субтилизин кексин седолизин (табл. 14).

Три последних изолята из второго анализа имели больше утраченных генов, чем другие изоляты.

ТК #34 утратил большинство генов последних изолятов, 22 из 47. Эти гены включали белок наружной мембраны нитевидный гемагглютинин, гемагглютинин/гемолизинподобный белок, адгезии, стресс-зависимая система рестрикции, 6 повторов YadA домен-содержащего белка, трансферрин-связывающий белок, две изоформы белка, содержащего гемагглютининовый домен, белок семейства гликозидгидролаз, транскрипционный регулятор семейства TetR, белок lob1, две изоформы транскрипционного регулятора семейства MerR, оксидазу 3 типа с множеством атомов меди, малый белок множественной лекарственной устойчивости, транскрипционный регулятор семейства MarR и пептид азу S8/S53 субтилизин кексин седолизин. Из 22 генов, отсутствующих в ТК #34, у ТК #42 была обнаружена утрата 12. К ним относятся гемагглютинин/гемолизинподобный белок, 5 повторов YadA домен-содержащего белка, одна изоформа транскрипционного регулятора семейства TetR, две изоформы транскрипционного регулятора семейства MerR, одна изоформа оксидазы 3 типа с множеством атомов меди, малый белок множественной лекарственной устойчивости и транскрипционный регулятор семейства MarR. В дополнение к 12 генам также отсутствующим в ТК #34, ТК #42 также утратил один повтор YadA домен-содержащего белка, белок семейства гликозилтрансфераз, вирулентность-ассоциированный белок D (VarD), ацилтрансфераза 3, липопротеин, другая изоформа оксидазы 3 типа с множеством атомов меди, а другая изоформа регулятора транскрипции TetR. Все гены, отсутствующие в ТК #42, также отсутствовали в ТК #28, без исключений (табл. 15).

Таблица 14

Гены, вовлеченные в вирулентность, которые отсутствуют в одном или нескольких из анализируемых геномов HS91, ТК #21, ТК #4, 153-3 и 129PT по сравнению с 2336 (учетный номер #CP00947)

NCBI Gene #	Где утрачен	Название гена	Функция гена
HSM_0052	129PT	Белок наружной мембраны транспортный белок P1	Может вовлекать порины, участвующие в транспорте иммуногенно важных белков и в уклонения от хозяина
HSM_0077	153-3 & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0164	129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Участие в передаче сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_0268	153-3 & 129PT	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	Опосредует прикрепление к эпителиальным клеткам, макрофагам и необходим для колонизации трахен
HSM_0270	ТК #21, ТК #4, 153-3, и 129PT	Гемагглютинин/гемолизин-подобный белок	Поверхностный гликопротеин, ответственный за прикрепление бактерий и проникновение в клетки -хозяева
HSM_0274	153-3 & 129PT	Адгезин	Участвует в прикреплении клеток
HSM_0338	ТК #21, ТК #4, 153-3, и 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0346	153-3 & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0377	ТК #21, ТК #4,	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с

	153-3, и 129PT		помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0394	153-3 & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0598	TK #21, TK #4, и 129PT	Белок системы стресс-чувствительной рестрикции	В состоянии стресса может позволить бактерии более легко подобрать чужеродную ДНК, например, ДНК фага (Schäferet. al. 1994)
HSM_0695	129PT	Щелочная фосфатаза	Способствует образованию биопленки
HSM_0708	TK #21, TK #4, 153-3, и 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0749	TK #21, TK #4 и 153-3	Трансферрин-связывающий белок	Позволяет бактерии захватить накопленное в хозяине железо, которое может повлиять на вирулентность
HSM_0844	129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0953	TK #21 & #4 TK	Белок, содержащий гемагглютининовый домен	Вовлечен в бактериальную адгезию
HSM_0975	129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_0977	153-3 & 129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_0978	129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_1089	129PT	Белок активации гемолизина/подобный белку секреции	Участие в лизисе эритроцитов
HSM_1090	129PT	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	Может быть вовлечен в секрецию адгезинов, которые облегчают адгезию к хозяину или другим клеткам, необходимым для колонизации хозяина
HSM_1160	TK #4 и 129PT	Белок семейства гликозидгидролаз	Может играть роль в деградации пептидогликана, а также в колонизации носоглотки и инвазии в эпителиальные клетки хозяина
HSM_1191	TK #21, TK #4, 153-3, и 129PT	Транскрипционный регулятор семейства TetR	Вовлечен в транскрипционный контроль выкачивающих насосов множественной лекарственной устойчивости, в пути биосинтеза антибиотиков, ответ на осмотический стресс и токсичные химические вещества, контроль катаболических путей, процессы дифференциации и патогенности (Ramos et. al. 2005)
HSM_1212	129PT	Белок, содержащий домен гемагглютинина	Вовлечен в бактериальную адгезию
HSM_1257	TK #21, TK #4, 153-3, и 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны

HSM_1426	TK #21, TK #4, и 129PT	липоолигосахарид сиалилтрансфераза	Влияет на орнаментацию липополисахарида и влияет на способность патогена уклоняться от защитных сил организма
HSM_1448	129PT	Участок вирулентность-ассоциированного белка D (YadD)	Локус токсина/антитоксина, может быть вовлечен в трансляцию во время стрессовых условий, арест трансляции позволяет улучшить выживаемость в хозяине и способствует хроническим инфекциям слизистой оболочки (Daines et. al. 2004)
HSM_1484	153-3 & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1542	153-3 & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1571	TK #21 & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1616	TK #21, TK #4, и 129PT	белок семейства Abi	Вовлечен в собственный иммунитет к бактериоцинам (Kjos et. al. 2010)
HSM_1624	TK #21, TK #4, 153-3 & 129PT	Ацилтрансфераза 3	Устойчивость к лекарственным средствам и другие ответы уклонения от хозяина может зависеть от наличия ацилтрансферазы
HSM_1647	129PT	белок FhaB	Может играть роль в связывании хозяин-клетка и инфекции
HSM_1651	129PT	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	Может быть вовлечен в секрецию адгезинов, которые облегчают адгезию к хозяину или другим клеткам, необходимым для колонизации хозяина
HSM_1667	129PT	Белок Lob1	Вовлечен в биосинтез липоолигосахаридов для уклонения или задержки распознавания хозяина (Cox et. al. 1998)
HSM_1669	153-3	Ацетилтрансфераза	Участие в уклонении от хозяйской иммунной системы, вирулентности и лекарственной устойчивости (Aubry et. al. 2011)
HSM_1714	TK #4 и 129PT	Липопротеин	Экспрессируется на поверхности клеток и может быть вовлечен в уклонении от хозяина и вирулентность
HSM_1726	TK #4 и 129PT	Оксидаза 3 типа с множеством атомов меди	Может быть вовлечен в захват железа (II) в условиях с низким содержанием кислорода из воспаленной ткани, например, при колонизации легкого хозяина (Huston et. al. 2002)
HSM_1728	TK #21, TK #4, 153-3, 129PT	Транскрипционный регулятор семейства MerR	Транскрипционный регулятор через неоптимальный промотор, который реагирует на стресс-факторы, такие как окислительный стресс, тяжелые металлы или антибиотики (Brown et. al. 2003)
HSM_1730	TK #21, TK #4, 153-3, 129PT	Оксидаза 3 типа с множеством атомов меди	Может быть вовлечена в захват железа (II) в условиях с низким содержанием кислорода из воспаленной ткани, например, при колонизации легкого хозяина (Huston et. al. 2002)
HSM_1734	TK #4, 129PT	Транскрипционный регулятор семейства TetR	Вовлечен в транскрипционный контроль выкачивающих насосов множественной лекарственной устойчивости, в пути биосинтеза антибиотиков, ответ на осмотический стресс и

			токсичные химические вещества, контроль катаболических путей, процессы дифференциации и патогенности (Ramos et. al. 2005)
HSM_1736	TK #21, TK #4, 153-3 & 129PT	Малый белок лекарственной устойчивости	Белок эффлюкса лекарственных средств, участвующий в резистентности к антибиотикам (Alekhun and Levy, 2007).
HSM_1737	TK #21, TK #4, 153-3 & 129PT	Транскрипционный регулятор семейства MarR	Регулирует активность генов, вовлеченных в устойчивость к антибиотикам, ответные реакции на стресс, вирулентность или катаболизм ароматических соединений (Perega and Grove, 2010)
HSM_1741	TK #21, TK #4, 153-3 & 129PT	Транскрипционный регулятор семейства MerR	Транскрипционный регулятор через неоптимальный промотор, который реагирует на стресс-факторы, такие как окислительный стресс, тяжелые металлы или антибиотики (Brown et. al. 2003)
HSM_1793	TK #21, TK #4, 153-3 & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1794	129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_1889	TK #21, TK #4, и 129PT	Пептидаза S8/S53 субтилизин кексин седолизин	Функционирует в качестве гидролазы, протеазы и сериновой протеазы, которая помогает с начальной колонизацией хозяина

Таблица 15

Гены, вовлеченные в вирулентность, которые отсутствуют в одном или нескольких из анализируемых геномов ТК #34, ТК #42, 2336, ТК #28 и 129PT по сравнению с 2336 (учетный номер #CP00947 в базе данных NCBI)

2336 NCBI Gene #	Утрачен в	Название гена	Функция гена
HSM_0052	129PT	Белок наружной мембраны транспортный белок P1	Может вовлекать порины, участвующие в транспорте иммуногенно важных белков и уклонении от хозяина
HSM_0077	TK #42, ТК #28, & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0164	129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_0268	TK #34 & 129PT	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	Опосредует соединение с эпителиальными клетками, макрофагами и необходим для колонизации трахен
HSM_0270	TK #34, ТК #42, ТК #28, & 129PT	Гемагглютинин/гемолизин-подобный белок	Поверхностный гликопротеин, отвечающий за прикрепление бактерий к и проникновение в

			клетки-хозяева
HSM_0274	TK #34 & 129PT	Адгезин	Вовлечен в прикрепление клеток
HSM_0338	129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0346	129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0377	129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0394	129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0598	TK #34 & 129PT	Белок системы стресс-чувствительной рестрикции	В состоянии стресса белок может позволить бактерии более легко подобрать чужеродную ДНК, например, ДНК фага (Schäfer et. al. 1994)
HSM_0695	129PT	Щелочная фосфатаза	Способствует образованию биопленки
HSM_0708	TK #34, #42 TK, TK #28, & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0749	TK #34	Трансферрин-связывающий белок	Позволяет бактерии захватить накопленное в хозяине железо, которое может повлиять на вирулентность
HSM_0844	129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_0938	TK #34	Белок, содержащий гемагглютининовый домен	Вовлечен в бактериальную адгезию
HSM_0975	TK #42, TK #28 и 129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_0977	129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_0978	129PT	Белок семейства	Вовлечен в перенос сахарной группы

		гликозилтрансфераз	на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_1022	TK #34	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1089	129PT	Белок активации гемолизина/подобный белку секреции	Участие в лизисе эритроцитов
HSM_1090	129PT	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	Опосредует соединение с эпителиальными клетками, макрофагами и необходим для колонизации трахеи
HSM_1160	TK #34 & 129PT	Белок семейства гликозидгидролаз	Может играть роль в деградации пептидогликана, а также в колонизации носоглотки и инвазии в эпителиальные клетки хозяина
HSM_1191	TK #34, TK #42, TK #28, & 129PT	Транскрипционный регулятор семейства TetR	Вовлечен в транскрипционный контроль выкачивающих насосов множественной лекарственной устойчивости, в пути биосинтеза антибиотиков, ответ на осмотический стресс и токсичные химические вещества, контроль катаболических путей, процессы дифференциации и патогенности (Ramos et. al. 2005)
HSM_1212	TK #34 & 129PT	Белок, содержащий гемагглютининовый домен	Вовлечен в бактериальную адгезию
HSM_1257	TK #34, TK #42, TK #28, & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1426	129PT	Липоолигосахарид сиалилтрансфераза	Влияет на орнаментацию липополисахарида и влияет на способность патогена уклоняться от защитных сил организма
HSM_1448	TK #42, TK #28 и 129PT	Участок вирулентность-ассоциированного белка D (VarD)	Локус токсина/антитоксина, может быть вовлечен в трансляцию во время стрессовых условий, арест трансляции позволяет улучшить выживаемость в хозяине и способствует хроническим инфекциям слизистой оболочки (Daines et. al. 2004)
HSM_1484	129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1542	TK #34, TK #42, TK #28, & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью

			коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1571	TK #34, TK #42, TK #28, & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1616	129PT	Белок семейства Abi	Вовлечен в собственный иммунитет к бактериоцинам (Kjos et. al. 2010)
HSM_1624	TK #42, TK #28 и 129PT	Ацилтрансфераза 3	Устойчивость к лекарственным средствам и другие ответы уклонения от хозяина может зависеть от наличия ацилтрансферазы
HSM_1647	129PT	Белок FhaB	Может играть роль в связывании хозяин-клетка и инфекции
HSM_1651	129PT	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	Может быть вовлечен в секрецию адгезинов, которые облегчают адгезию к хозяину или другим клеткам, необходимым для колонизации хозяина
HSM_1667	TK #34 & 129PT	Белок Lob1	Вовлечен в биосинтез липоолигосахарида для уклонения или задержки распознавания хозяина (Cox et. al. 1998)
HSM_1714	TK #42, TK #28, & 129PT	Липопротеин	Экспрессируется на поверхности клеток и может быть вовлечен в уклонение от хозяина и вирулентность
HSM_1726	TK #42, TK #28 и 129PT	Оксидаза 3 типа с множеством атомов меди	Может быть вовлечена в захват железа (II) в условиях с низким содержанием кислорода из воспаленной ткани, например, при колонизации легкого хозяина (Huston et. al. 2002)
HSM_1728	TK #34, #42 TK, TK #28, & 129PT	Транскрипционный регулятор семейства MerR	Транскрипционный регулятор через неоптимальный промотор, который реагирует на стресс-факторы, такие как окислительный стресс, тяжелые металлы или антибиотики (Brown et. al. 2003)
HSM_1730	TK #34, #42 TK, TK #28, & 129PT	Оксидаза 3 типа с множеством атомов меди	Может быть вовлечена в захват железа (II) в условиях с низким содержанием кислорода из воспаленной ткани, например, при колонизации легкого хозяина (Huston et. al. 2002)
HSM_1734	TK #42, TK #28 и 129PT	Транскрипционный регулятор семейства TetR	Вовлечен в транскрипционный контроль выкачивающих насосов множественной лекарственной устойчивости, в пути биосинтеза антибиотиков, ответ на осмотический стресс и токсичные химические вещества, контроль катаболических путей, процессы дифференциации и патогенности (Ramos et. al. 2005)
HSM_1736	TK #34, #42 TK, TK #28, & 129PT	Малый множественной лекарственной устойчивости белок	Белок эффлюкса лекарственных средств, участвующий в резистентности к антибиотикам (Alekshun and Levy, 2007)
HSM_1737	TK #34, #42	Транскрипционный	Регулирует активность генов,

	TK, TK #28, & 129PT	регулятор семейства MarR	вовлеченных в устойчивость к антибиотикам, ответные реакции на стресс, вирулентность или катаболизм ароматических соединений (Perera and Grove, 2010)
HSM_1741	TK #34, #42 TK, TK #28, & 129PT	Транскрипционный регулятор семейства MerR	Транскрипционный регулятор через неоптимальный промотор, который реагирует на стресс-факторы, такие как окислительный стресс, тяжелые металлы или антибиотики (Brown et. al. 2003)
HSM_1793	TK #34, #42 TK, 2336, TK #28, & 129PT	YadA домен-содержащий белок	Способствует патогенности и вирулентности в клетках-хозяевах через клеточную адгезию с помощью коллаген-связывающего белка наружной мембраны
HSM_1794	129PT	Белок семейства гликозилтрансфераз	Вовлечен в перенос сахарной группы на акцептор, отвечает за формирование важных факторов вирулентности, таких как липополисахариды (Kahler et. al. 1996)
HSM_1889	TK #34 & 129PT	Пептидаза S8/S53 субтилизин кексин седолизин	Функционирует в качестве гидролазы, протеазы и сериновой протеазы, которая помогает с начальной колонизацией хозяина

Из полногеномной компиляции были идентифицированы семь предполагаемых PI или ICE.

Первый из них расположен между HSM_R0009 около HSM_0254 (~28 тыс. п.о.), но в этой локации, по всей видимости, отсутствуют значимые вирулентные, вирулентность-ассоциированные гены или гены устойчивости к лекарственным средствам. HS91 и 2336 содержали все присутствующие гены; тем не менее, TK #21, TK #4, 153-3, 129PT и TK #34, по всей видимости, утратили большинство генов, расположенных в данных PI или ICE. TK #42 и TK #28 имеют часть этого первого PI или ICE.

Вторая локация была между HSM_0319 и HSM_0348 (~41 тыс. п.о.), и в этом месте было два повтора YadA домен-содержащих белков, один из которых утрачен в TK #21, TK #4, 153-3 и 129PT, а другой пропал в 153-3 и 129PT.

Третий PI был расположен между HSM_0638 и HSM_0692 (~45 тыс. п.о.). Изоляты 153-3, 129PT и TK #34 утратили многие из генов в этих потенциальных PI или ICE. Тем не менее, ни один не был идентифицирован в качестве предполагаемого вирулентного, вирулентность-ассоциированного гена или гена устойчивости к лекарственным средствам, так как многие из генов в PI были идентифицированы только как гипотетические белки.

Четвертая локация была PI был между HSM_0847 и HSM_0923 (~73 тыс. п.о.).

Опять же факторы вирулентности не были идентифицированы в пределах этого диапазона. Однако TK #21, TK #4, 153-3, 129PT и TK #34 утратили большинство генов, найденных в этом участке.

Пятая локация PI была между HSM_1115 и HSM_1167 (~51 тыс. п.о.). TK #4 утратил HSM_1129 к HSM_1146 и HSM_1149 к HSM_1167, этот отсутствующий участок включает белок семейства гликозид-гидролаз. Изолят 129PT утратил HSM_1131-HSM_1167, а TK #34 утратил HSM_1129-HSM_1144 и HSM_1149-HSM_1167, но у других изолятов большинство из этих генов присутствует. Присутствует также двухкомпонентный регулятор ответа в HSM_1124, который может быть вовлечен в оказание помощи бактерии воспринимать и реагировать на широкое разнообразие окружающей среды. Все секвенированные изоляты содержат эти двухкомпонентные регуляторы ответа.

Шестой предполагаемый PI или ICE находится в HSM_1615-HSM_1719 (~101 тыс. п.о.). В этом участке присутствует семейство белок Abi, ацилтрансфераза 3, белок FhaB, нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны, белок Lob1, ацетилтрансфераза и липопротеин. TK #21, TK #4, 153-3, 129PT, TK #28, TK #42 и TK #34 утратили некоторые из них (табл. 14 и 15), что вносит потенциальных вклад в их различные уровни вирулентности.

Последние потенциальные PI или ICE находится в HSM_1860-HSMR_0065 (~38 тыс. п.о.). Одним из ключевых генов, который отсутствует в TK #21, TK #4, 129PT и TK #34 в этом регионе, является пептидаза S8/S53 субтилизин кексин седолизин, которая важна для начальной колонизации хозяина. Есть другие гены, отсутствующие в TK #21, TK #4, 129PT, TK #34, TK #42 и TK #28, большинство из которых определены как гипотетические белки или транспозазы. HS91, 153-3, TK #42, 2336 и TK #28, как представляется, обладают большей частью или всем интактным участком.

Обсуждение.

TK #4, как представляется, достаточно ослаблен, хотя и способен еще вызывать адекватный иммунный ответ, делая штамм, сильным вакцинным кандидатом. TK #4 утратил некоторые гены, подобно другим изолятам, полученным в том же году; тем не менее, некоторые из отсутствующих генов являются

уникальными для ТК #4, в том числе белок семейства гликозидгидролаз (GHFP), липопротеин (LP), оксидаза 3 типа с множеством атомов меди и транскрипционный регулятор семейства TetR. Несколько генов, отсутствующих как в ТК #4, так и патогенных изолятах, могут вносить свой вклад в ослабленный фенотип, тем не менее, эти гены не представляются необходимыми для авирулентности.

С другой стороны, два гена однозначно отсутствуют в ТК #4 и присутствуют в патогенных штаммах - это белок семейства гликозидгидролаз и липопротеин, которые, как представляется, необходимы и достаточны для ослабленного фенотипа ТК #4.

Причинная связь между отсутствием экспрессии этих двух генов в ТК #4 и ослабленной вирулентности подтверждена ранее опубликованной работой, которая указывает на то, что белки GHFP и LP играют важную роль в колонизации и уклонении от защитных сил организма (Asgarali et al., 2009; Garbe and Collin, 2010; Liu et al., 2008; и Guzman-Brambila et al., 2012). Кроме того, данные показывают, что хотя ТК #4 не столь ослаблен, как 129PT, штамм обеспечивает защиту (от последующих вирулентных вызовов) как у крупного рогатого скота, так и у мышей.

ТК #34 также сильно ослаблены сходно с ТК #4; однако в ТК #4 отсутствует большее число генов, участвующих в уклонении от хозяина. ТК #4 и ТК #34 оба утратили различные изоформы или повторы белков, содержащих гемагглютининовый домен, YadA домен-содержащих белков соответственно. ТК #34 утратил нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны, адгезии и белок lob1, которые имеются у ТК #4. ТК #4 утратил липополисахарид сиалилтрансферазу, белок семейства Abi, ацилтрансферазу 3, липопротеин с множеством атомов меди 3 и регулятор транскрипции TetR, которые присутствуют в ТК #34. Результаты показывают, что сочетание недостающих факторов вирулентности вносит вклад в частично ослабленные бактерии, которые являются защитными для мышей и крупного рогатого скота (ТК #4) или в сильно ослабленные, но незащитные изоляты для мышей и крупного рогатого скота (ТК #34). Данные только в данном документе демонстрируют, что специалист в данной области не смог бы предсказать заранее, какие гены должны быть удалены для того, чтобы получить достаточно ослабленный, но при этом в достаточной степени защитный вакцинный штамм *H. somni*.

Наконец, в этом изоляте, по-видимому, не прошел горизонтальный перенос генов устойчивости, а также утрачены другие факторы вирулентности, которые, как представляется, ослабляли изолят в достаточной степени, чтобы сделать его неспособным вызвать заболевание. С другой стороны, наличие большего количества факторов вирулентности, чем у комменсального штамма, делает ТК #4 сильным вакцинным кандидатом (т.е. штамм может выжить достаточно долго для того, чтобы стимулировать гуморальный иммунный ответ хозяина и обеспечить долгосрочную защиту).

Было установлено, что ТК #21 представляет собой высоковирулентный изолят для мышей и крупного рогатого скота. Тем не менее, генетически он более похож на текущие изоляты, ТК #4 и 153-3 (менее вирулентные по отношению к ТК #21), при этом в то же время сильнее расходится с другими известными штаммами, 2336 и HS91. ТК #21 содержит белок семейства гликозидгидролаз, липопротеин, одну изоформу оксидазы 3 типа с множеством атомов меди и одну изоформу транскрипционного регулятора семейства TetR, которые утрачены ТК #4. Все эти 4 гена могут вносить свой вклад в ослабление ТК #4. Самые уникальные отсутствующие гены, которые не были найдены утраченными в разных изоформах, но утрачены в ТК #21, представляют собой гликозидгидролазу и липопротеин. Эти гены в комбинации, по-видимому, необходимы для того, чтобы стать причиной достаточной разницы между провокационным изолятом (имеет гены) и вакцинным кандидатом (гены отсутствуют). ТК #21 утратил YadA домен-содержащий белок, который имеется у ТК #4; тем не менее, это, по-видимому, не способствует утрате вирулентности. По всей видимости, вирулентность, ассоциированная с ТК #21, не является следствием дивергенции данного изолята от 2336, но вместо этого является следствием его тонких отличий с ТК #4.

Более поздние изоляты ТК #21, ТК #4, 153-3, ТК #34, ТК #42 и ТК #28, как представляется, похожи, но они заметно отличаются от 2336 и HS91 (табл. 15). Данные показывают, что популяция *H. somni* развивается с течением времени и что общепринятый провокационный изолят 2336 больше не релевантен с генным пулом *H. somni*, с которым в настоящее время сталкиваются телята. Это также является доводом в пользу поддержки ТК #4 в качестве вакцинного кандидата, поскольку его генетический состав имеет большую релевантность с штаммами, распространенными в настоящее время в комплексе респираторных заболеваний телят крупного рогатого скота. Коэффициент выравнивания подтверждает, что HS91 и 2336 очень тесно связаны между собой, и что ТК #21, ТК #4, 153-3, ТК #34, #42 ТК и ТК #28 тесно связаны между собой. Он также показывает, что нынешние изоляты генетически отличаются от тех, которые выделены в 1980-1990-х гг. Кроме того, при взгляде на генное отсутствие можно сказать, что более свежие изоляты утратили большее количество генов из 2336, чем из HS91, и текущие изоляты также, как правило, имеют тенденцию к утрате подобных генов. Это означает, что геномы естественно дрейфуют в *H. somni*. Кроме того, поскольку нынешние изоляты представляют собой различные состояния в пределах США, это означает, что генетический дрейф, представленный в данном документе, репрезентативен для текущей популяции *H. somni* в США.

В целом, эти данные показывают, что сочетание ряда генов, которые могут потребоваться для того, чтобы сделать изолят эффективным вакцинным или провокационным кандидатом, и потеря всего лишь нескольких генов может ослабить кандидата достаточно для того, чтобы спасти животное вместо того,

чтобы забрать его жизнь. Эти данные также предполагают, что популяция *H. somni* практически дрейфует в течение долгого времени, и что индустрия должна развиваться для того, чтобы поддерживать релевантные вакцины. Данные убедительно подтверждают важность аутогенных вакцин, а также периодической повторной оценки эффективности коммерческих вакцин.

Таблица 16

Идентифицированные варианты (по отношению к 2336, учетный номер #CP00947) для каждого изолята, проанализированного с помощью "SAMTools mpileup"

Образец	Общие Варианты	Отфильтрованные варианты
129PT	22 040	21 733
TK #34	23 386	23 179
HS91	132	12
HS91 Δ aroC	1 481	1 343
TK #21	25 840	25 157
TK #42	21 833	21 677
2336 (изолят заявителей)	134	15
TK #28	21 803	21 590
TK #4	25 868	25 176
153-3	21 260	20 750
HS91 Δ nanPU	1 468	1 330

В дополнение к множеству идентифицированных SNP (табл. 16) также были утрачены многочисленные гены (табл. 17-23). Более поздние изоляты (TK #21, TK #4, 153-3, TK #34, TK #42 и TK #28) и 129PT имели большинство SNP, в то время как HS91 дикого типа, мутанты HS91 и 2336 имели мало или не имели SNP для всех вирулентность-ассоциированных генов. Для генов биосинтеза или модификации LOS самый высокий процент SNP был обнаружен в генах гликозилтрансферазы и ацетилтрансферазы в обоих анализах и в lob2b при анализе 2-й группы. Изолят 129PT утратил большинство генов биосинтеза или модификации LOS. Для генов адгезии, колонизации и образования биопленки большинство SNP имеют место в YadA домен-содержащих белках и белках, содержащих гемагглютининовый домен. Многие гены адгезии, колонизации и образования биопленки отсутствовали в недавних изолятах. Гликозид-гидролазы в 1-й группе и некоторые из TonB-зависимых рецепторов в обеих группах имели наибольшее количество SNP для вторжения в хозяин или поглощения металлов. Многие из генов стресс-реакции, устойчивости к антибиотикам и эффлюкса лекарственных средств отсутствовали в большинстве новых изолятов. В тех, в которых присутствовали, процент SNP был довольно низким, за исключением транскрипционного регулятора семейства TetR в 1-й группе.

Для генов, участвующих в биосинтезе или модификации LOS, все изоляты за исключением 129PT имели 1 вставку-делецию в транспортном белке P1 OMP. TK #21 и TK #34 имели 1 и 2 вставки-делеции, соответственно, для lob2b. Все недавние изоляты имели 1 вставку-делецию BrgmB, но старшие изоляты HS91 и 2336 не имели. TK #42 и TK #28 имеют 1 делецию-вставку в белке семейства гликозилтрансфераз, и они имели 1 делецию-вставку в lob2a. Изолят 129PT имел вставку-делецию в Neua HS.

При анализе группы 1 не синонимичные вставки-делеции для вирулентность-ассоциированных генов, вовлеченных в адгезию, колонизацию и образование биопленки, TK #21 и TK #4 имели большинство вставок-делеций. Это произошло в YadA доменсодержащих белках (всего 26 вставок-делеций в TK #21 и всего 32 вставки-делеции в TK #4), нитевидном гемагглютинине белке наружной мембраны (всего 6 вставок-делеций в TK #21 и всего 5 вставок-делеций в TK #4), и 1 вставка-делеция в TK #21 в адгезине. Изолят 153-3 также имел некоторые вставки-делеции в 1-й группе, но утратил большинство проанализированных генов, почти также, как и в случае 129PT. Этими генами, представленными несинонимичными вставками-делециями были YadA-домен-содержащие белки (всего 6 вставок-делеций), нитчатый гемагглютинин белок наружной мембраны (3 вставки-делеции), и белок, содержащий гемагглютининовый домен (1 вставка-делеция; табл. 19). При анализе во 2-й группе адгезии, колонизации и образования биопленки, изоляты TK #34, #42 TK и TK #28 имели большинство вставок-делеций. Вставки-делеции присутствовали в YadA доменсодержащих белках (всего 24 вставки-делеции для TK #34, всего 31 вставка-делеция для TK #42 и всего 31 вставка-делеция для TK #28), нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны (всего 2 вставки-делеции для TK #34, всего 4 вставки-делеции для TK #42, и всего 4 вставки-делеции для TK #28) и 1 вставка-делеция для белка, содержащего гемагглютининовый домен для TK #34. Кроме того, 129PT имеет 7 вставок-делеций для YadA доменсодержащих белков YadA и 1 вставку-делецию для белка, содержащего гемагглютининовый домен, хотя в нем утрачены многие из проанализированных генов. И, наконец, HS91 Δ aroC и HS91 Δ Nanpu имели всего 3 и 2 вставки-делеции, соответственно, для нитчатого гемагглютинина белка наружной мембраны и 1 для YadA доменсодержащего белка (табл. 20).

Таблица 17

Количество вставок-делеций, присутствующих в изолятах 1 анализируемой группы вирулентность-ассоциированных генов, участвующих в биосинтезе или модификации липоолигосахаридов (LOS)

Число генов	Общее количество п.о.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций				
		HS91	TK #21	TK #4	153-3	129PT
HSM_0052	234	1	1	1	1	*
HSM_0164	1569	0	0	0	0	*
HSM_0204	1383	0	0	0	0	0
HSM_0397	930	0	0	0	0	0
HSM_0572	555	0	0	0	0	0
HSM_0840	588	0	0	0	0	0
HSM_0925	1431	0	0	0	0	0
HSM_0938	1167	0	0	0	0	0
HSM_0975	696	0	0	0	0	*
HSM_0977	834	0	1	0	*	*
HSM_0978	816	0	0	0	0	*
HSM_1062	1365	0	0	0	0	0
HSM_1063	888	0	0	0	0	0
HSM_1117	672	0	0	0	0	1
HSM_1118	1020	0	0	0	0	0
HSM_1256	1017	0	0	0	0	0
HSM_1426	903	0	*	*	0	*
HSM_1667	129	0	0	0	0	*
HSM_1669	876	0	0	0	*	0
HSM_1714	630	0	0	*	0	*
HSM_1794	936	0	0	0	0	*
HSM_1832	1656	0	1	1	1	1

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Таблица 18

Количество вставок-делеций, присутствующих в изолятах из 2 анализируемой группы вирулентность-ассоциированных генов, участвующих в биосинтезе или модификации липоолигосахаридов (LOS)

Номер гена	Всего п.н.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций						
		TK #34	HS91 ΔaroC	TK #42	2336	TK #28	HS91 ΔnanPU	129PT
HSM_0052	234	1	1	1	1	1	1	*
HSM_0164	1569	0	0	1	0	1	0	*
HSM_0204	1383	0	0	0	0	0	0	0
HSM_0397	930	0	0	0	0	0	0	0
HSM_0572	555	0	0	0	0	0	0	0
HSM_0840	588	0	0	0	0	0	0	0
HSM_0925	1431	0	0	0	0	0	0	0
HSM_0938	1167	*	0	0	0	0	0	0
HSM_0975	696	0	0	*	0	*	0	*
HSM_0977	834	2	0	0	0	0	0	*
HSM_0978	816	0	0	1	0	1	0	*
HSM_1062	1365	0	0	0	0	0	0	0
HSM_1063	888	0	0	0	0	0	0	0
HSM_1117	672	0	0	0	0	0	0	1
HSM_1118	1020	0	0	0	0	0	0	0
HSM_1256	1017	0	0	0	0	0	0	0
HSM_1426	903	0	0	0	0	0	0	*
HSM_1667	129	*	0	0	0	0	0	*
HSM_1669	876	0	0	0	0	0	0	0
HSM_1714	630	0	*	*	0	*	*	*
HSM_1794	936	0	0	0	0	0	0	*
HSM_1832	1656	1	0	1	0	1	0	1

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Количество вставок-делеций, присутствующих в изолятах из 1 анализируемой группы вирулентность-ассоциированных генов, участвующих в адгезии, колонизации или образовании биопленки

Номер гена	Всего п.н.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций				
		HS91	TK #21	TK #4	153-3	129PT
HSM_0077	12192	0	3	2	*	*
HSM_0268	7119	0	1	1	*	*
HSM_0270	3480	0	*	*	*	*
HSM_0274	1569	0	1	0	*	*
HSM_0338	7260	0	*	*	*	*
HSM_0346	4653	0	3	3	*	*
HSM_0377	9948	0	*	*	*	*
HSM_0394	9870	0	1	1	*	*
HSM_0695	924	0	0	0	0	*
HSM_0708	11025	0	*	*	*	*
HSM_0844	9417	0	6	6	1	*
HSM_0953	1227	0	*	*	1	1
HSM_1022	11250	0	4	4	1	6
HSM_1090	5268	0	3	3	3	*
HSM_1212	1170	0	0	0	0	*
HSM_1257	13971	0	*	*	*	*
HSM_1484	6540	0	3	4	*	*
HSM_1542	7158	0	6	8	*	*
HSM_1571	11772	0	*	4	4	*
HSM_1647	2124	0	0	0	0	*
HSM_1651	8235	0	2	1	0	*
HSM_1793	8277	0	*	*	*	*
HSM_1889	2193	0	*	*	0	*

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Таблица 20 (6)

Количество вставок-делеций, присутствующих в изолятах из 2 анализируемой группы вирулентность-ассоциированных генов, участвующих в адгезии, колонизации или образовании биопленки

Номер гена	Название гена	Всего п.н.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций						
			TK #34	HS91 ΔaroC	TK #42	2336	TK #28	HS91 ΔnanPU	129PT
HSM_0077	YadA домен-содержащий белок	12192	4	0	*	0	*	0	*
HSM_0268	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	7119	*	0	1	0	1	0	*
HSM_0270	Гемагглютинин/гемолизина-подобный белок	3480	*	0	*	0	*	0	*
HSM_0274	Адгезин	1569	*	0	0	0	0	0	*
HSM_0338	YadA домен-содержащий белок	7260	3	0	5	0	5	0	*
HSM_0346	YadA домен-содержащий белок	4653	7	0	5	0	5	0	*
HSM_0377	YadA домен-содержащий белок	9948	5	*	8	0	8	*	*
HSM_0394	YadA домен-содержащий белок	9870	0	1	0	0	0	1	*
HSM_0695	щелочная фосфатаза	924	0	0	0	0	0	0	*
HSM_0708	YadA домен-содержащий белок	11025	*	0	*	0	*	0	*
HSM_0844	YadA домен-содержащий белок	9417	1	0	5	0	5	0	*
HSM_0953	белок, содержащий гемагглютининовый домен	1227	1	0	0	0	0	0	1
HSM_1022	YadA домен-содержащий белок	11250	*	0	7	0	7	0	7
HSM_1090	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	5268	2	3	3	0	3	2	*
HSM_1212	белок, содержащий гемагглютининовый домен	1170	*	0	1	0	1	0	*
HSM_1257	YadA домен-содержащий белок	13971	*	0	*	0	*	0	*
HSM_1484	YadA домен-содержащий белок	6540	4	0	1	0	1	0	*
HSM_1542	YadA домен-содержащий белок	7158	*	0	*	0	*	0	*
HSM_1571	YadA домен-содержащий белок	11772	*	0	*	0	*	0	*
HSM_1647	Белок FhaB	2124	0	0	0	0	0	0	*
HSM_1651	Нитевидный гемагглютинин белок наружной мембраны	8235	0	0	0	0	0	0	*
HSM_1793	YadA домен-содержащий белок	8277	*	*	*	*	*	0	*
HSM_1889	Пептидаза S8/S53 субтилизин кексин седолизин	2193	*	*	0	0	0	*	*

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Таблица 21

Количество вставок-делеций, присутствующих в изолятах 1 анализируемой группы вирулентности-ассоциированных генов, вовлеченных во вторжение в хозяина или поглощение металла

Номер гена	Итого п.н.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций				
		HS91	TK #21	TK #4	153-3	129PT
HSM_0047	2754	0		2	0	1
HSM_0749	1989	1	*	*	*	1
HSM_0750	2916	0	2	2	2	4
HSM_0931	1779	0	0	0	1	0
HSM_1089	1353	0	0	0	0	*
HSM_1160	537	0	0	*	0	*
HSM_1168	3111	0	0	0	0	1
HSM_1176	261	0	1	1	0	2
HSM_1726	1548	0	0	*	0	*
HSM_1730	1605	0	0	0	0	0
HSM_1962	2607	0	0	0	0	0

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Таблица 22

Количество вставок-делеций, присутствующих в изолятах из 2 анализируемой группы вирулентности-ассоциированных генов, вовлеченных во вторжение в хозяина или поглощение металла

Номер гена	Всего п.н.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций						
		TK #34	HS91 ΔaroC	TK #42	2336	TK #28	HS91 ΔnanPU	129PT
HSM_0047	2754	2	0	1	0	1	0	1
HSM_0749	1989	*	0	1	1	1	0	1
HSM_0750	2916	2	0	2	0	1	0	3
HSM_0931	1779	0	0	0	0	0	0	0
HSM_1089	1353	0	0	1	0	1	0	*
HSM_1160	537	*	0	0	0	0	0	*
HSM_1168	3111	0	0	0	0	0	0	1
HSM_1176	261	2	0	0	0	0	0	2
HSM_1726	1548	0	*	*	0	*	*	*
HSM_1730	1605	0	0	0	0	0	0	0
HSM_1962	2607	0	0	0	0	0	0	0

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Таблица 23

Количество вставок-делеций присутствующих в изолятах из 1 анализируемой группы вирулентность-ассоциированных генов, участвующих в реакции на стресс, устойчивость к антибиотикам и эффлюксе лекарственных средств

Номер гена	Всего п.н.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций				
		HS91	TK #21	TK #4	153-3	129PT
HSM_0598	1890	0	*	*	0	*
HSM_1191	573	0	*	*	*	*
HSM_1448	282	0	0	0	0	*
HSM_1616	981	0	*	*	0	*
HSM_1624	1029	1	*	*	*	*
HSM_1728	405	0	*	*	*	*
HSM_1734	624	0	0	*	0	*
HSM_1736	333	0	*	*	*	*
HSM_1737	450	0	*	*	*	*
HSM_1741	399	0	*	*	*	*

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Таблица 24

Количество вставок-делеций присутствующих в изолятах из 2 анализируемой группы вирулентность-ассоциированных генов, участвующих в реакции на стресс, устойчивость к антибиотикам и эффлюксе лекарственных средств

Номер гена	Всего п.н.	# присутствующих несинонимичных вставок-делеций						
		TK #34	HS91 ΔaroC	TK #42	2336	TK #28	HS91 ΔnanPU	129PT
HSM_0598	1890	*	0	0	0	0	0	*
HSM_1191	573	*	0	*	0	*	0	*
HSM_1448	282	0	0	*	0	*	0	*
HSM_1616	981	0	0	0	0	0	0	*
HSM_1624	1029	2	2	*	1	*	2	*
HSM_1728	405	*	*	*	0	*	*	*
HSM_1734	624	0	*	*	0	*	*	*
HSM_1736	333	*	*	*	0	*	*	*
HSM_1737	450	*	*	*	0	*	*	*
HSM_1741	399	*	*	*	0	*	*	*

* Указывает на обнаружение утраты гена конкретным изолятом

Имеет место значительное сходство в плане отсутствия вставок-делеций среди последних изолятов и 129PT по вирулентность-ассоциированным генам, вовлеченным во вторжение в хозяина и поглощение металла. Эти гены включают TopV-зависимый рецептор (2 вставки-делеции для каждого из TK #4 и TK #34, 1 вставка-делеция для TK #42, TK #28 и 129PT), TbpV (1 вставка-делеция для каждого из HS91, TK #42, 2336, TK #28 и 129PT), TbpA (2 вставки-делеции для #21, TK #4, 153-3, TK #34 и TK #42, 3 или 4 вставки-делеции для 129PT) (эти два анализа приводят к различным оценкам по вставкам-делециям этого изолята) и 1 вставка-делеция для TK #28), TbpA2 (1 вставка-делеция для 153-3), активация гемолиза/белок, подобный белку секреции (1 вставка-делеция для каждого из TK #42 и TK #28), TopV-

зависимый гемоглобин/трансферрин/рецептор семейства лактоферрина (1 вставка-делеция для 129PT) и белок рецептора гимина внешней мембраны (1 вставка-делеция для ТК #21 и ТК #4, 2 вставки-делеции для ТК #34 и 129PT). Единственный ген среди генов ответа на стресс, устойчивость к антибиотикам и эффлокса лекарственных средств, который имел какие-либо вставки-делеции, представляет собой ацил-трансферазу 3. Была 1 несинонимичная вставка-делеция в HS91 и 2336 и было 2 в ТК #34, HS91 ΔaroC и HS91 ΔnanPU.

Имея, таким образом, подробно описанные предпочтительные воплощения настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение, определенное указанными выше пунктами, не должно быть ограничено конкретными подробностями, изложенными в приведенном выше описании, поскольку множество явных вариаций его возможны без ухода от духа и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ослабленный штамм *Histophilus somni* (*H. somni*), который способен обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у животных подсемейства бычьих против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*, депонированный в АТСС под номером РТА-121029 (ТК #4).

2. Ослабленный штамм *H. somni*, который способен обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у животных подсемейства бычьих против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*, депонированный в АТСС под номером РТА-121030 (ТК #42).

3. Способ исследования изолята *H. somni* на предмет того, представляет ли он собой ослабленный штамм *H. somni*, который способен обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у животных подсемейства бычьих против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*; где штамм идентифицируют как ослабленный штамм, если штамм утратил в своей геномной последовательности минимальное количество генов, кодирующих факторы вирулентности, по сравнению с эталонным вирулентным штаммом *H. somni*; и где этот относительный дефицит генов, кодирующих факторы вирулентности, делает ослабленный штамм неспособным вызвать инфекцию у животных подсемейства бычьих, причем указанное минимальное количество генов сформировано за счет того, что, по меньшей мере, следующие гены полностью удалены или мутированы для устранения способности гена экспрессировать родственный продукт гена дикого типа HSM_1160 (белок семейства гликозидгидролаз) и HSM_1714 (липопротеин).

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что эталонный вирулентный штамм включает последовательность геномной ДНК, которая кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% или 100% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 2; и

где ослабленный штамм экспрессирует какой-либо ген фактора вирулентности на уровне, примерно равном или ниже (включая недетектируемый уровень), чем уровень соответствующего гена вирулентности, экспрессируемого ослабленным штаммом, имеющим в своем геноме последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что штамм идентифицируют как ослабленный штамм, если он кодирует и экспрессирует по меньшей мере 100% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что штамм идентифицируют как ослабленный штамм, если он кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1; и

если штамм экспрессирует какой-либо ген фактора вирулентности на уровне, примерно равном или ниже (включая недетектируемый уровень), чем уровень соответствующего гена вирулентности, экспрессируемого ослабленным штаммом, имеющим в своем геноме последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

7. Способ по п.3, отличающийся тем, что штамм идентифицируют как ослабленный штамм, если он кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 3; и

если штамм экспрессирует какой-либо ген фактора вирулентности на уровне, примерно равном или ниже (включая недетектируемый уровень), чем уровень соответствующего гена вирулентности, экспрессируемого ослабленным штаммом, имеющим в своем геноме последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

8. Способ по п.3, отличающийся тем, что штамм идентифицируют как ослабленный штамм, если он кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 4; и

если штамм экспрессирует какой-либо ген фактора вирулентности на уровне, примерно равном или ниже (включая недетектируемый уровень), чем уровень соответствующего гена вирулентности, экспрессируемого ослабленным штаммом, имеющим в своем геноме последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

9. Способ по п.3, отличающийся тем, что ослабленный штамм кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 5; и

если штамм экспрессирует какой-либо ген фактора вирулентности на уровне, примерно равном или ниже (включая недетектируемый уровень), чем уровень соответствующего гена вирулентности, экспрессируемого ослабленным штаммом, имеющим в своем геноме последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

10. Способ по п.3, отличающийся тем, что штамм идентифицируют как ослабленный штамм, если он утратил по меньшей мере 99% таких же генов, что и штамм #4 *H. somni*, относительно штамма 2336 *H. somni*; где штамм 2336 содержит геномную последовательность, которая кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 6; и

где штамм #4 содержит геномную последовательность, которая кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% таких же генов, как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1.

11. Способ по п.3, в котором штамм идентифицируют как ослабленный штамм, если он кодирует и экспрессирует по меньшей мере 99% таких же генов, что и штамм, депонированный в АТСС под номером РТА-121029 (ТК #4) или РТА-121030 (ТК #42).

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что штамм, идентифицированный как ослабленный, является тем же штаммом, что и депонированный в АТСС под номером РТА-121029 (ТК #4).

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что штамм, идентифицированный как ослабленный, является тем же штаммом, что и депонированный в АТСС под номером РТА-121030 (ТК #42).

14. Иммунологическая композиция, способная обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у животных подсемейства бычьих против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*, содержащая или состоящая, по существу, из ослабленного штамма по любому из пп.1, 2 или штамма, который, как установлено с помощью способа по любому из пп.3-13, является ослабленным штаммом *H. somni*.

15. Композиция по п.14, дополнительно содержащая фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

16. Композиция по п.14, отличающаяся тем, что композиция вызывает у животного подсемейства бычьих защитный иммунный ответ против последующего воздействия по меньшей мере одного вирулентного штамма *H. somni*, и тем, что композиция не содержит адъювантов.

17. Композиция по п.14, дополнительно содержащая по меньшей мере один или более дополнительный антиген, который способен индуцировать у животного подсемейства бычьих патоген-специфичный иммунный ответ.

18. Композиция по п.17, в которой антиген вызывает у животного подсемейства бычьих иммунный ответ, достаточный для защиты животного от последующего воздействия патогена, из которого был получен антиген.

19. Композиция по п.17, в которой по меньшей мере один или более дополнительный антиген способен индуцировать у животного подсемейства бычьих иммунный ответ против комплекса респираторных заболеваний бычьих (BRDC), бычьего респираторно-синцитиального вируса (BRSV), бычьей вирусной диареи (BVD), бычьего парагриппа 3 (PI3), инфекционного ринотрахеита бычьих (IBR), бычьего вируса герпеса-1 (BHV-1), вируса блютанг (BTV) или любого другого возбудителя, способного инфицировать и вызывать заболевание или восприимчивость к болезни у животного подсемейства бычьих.

20. Способ выработки защитного иммунитета у животного подсемейства бычьих, нуждающегося в этом, против последующей инфекции вирулентными *H. somni*, включающий стадию введения указанному животному подсемейства бычьих композиции по п.14.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что последующие вирулентные *H. somni* представляют собой естественную инфекцию, передаваемую друг другу животными подсемейства бычьих, которые инфицированы по меньшей мере одним вирулентным штаммом *H. somni*.

22. Способ по п.20, отличающийся тем, что вакцинация является интраназальной, подкожной или внутримышечной.

23. Способ по п.20, отличающийся тем, что композиция содержит ослабленный штамм, утративший или не экспрессирующий гены белка семейства гликозидгидролаз (HSM_1160) и липопротеина (HSM_1714).

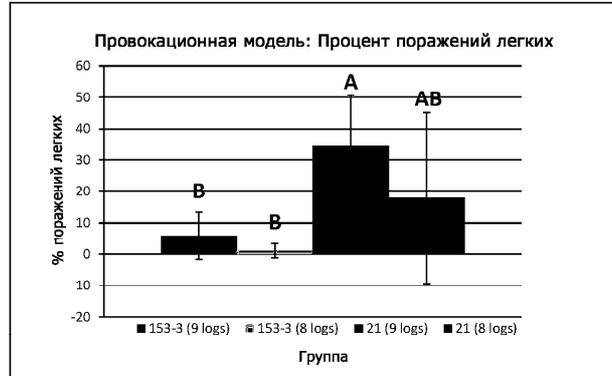
24. Способ по п.23, отличающийся тем, что ослабленный штамм дополнительно не утратил или не экспрессирует гены оксидазы 3 типа с множеством атомов меди (HSM_1726) и транскрипционного регулятора семейства TetR (HSM_1734).

25. Генетически сконструированный, не встречающийся в природе ослабленный штамм *H. somni*, который способен обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у животных подсемейства бычьих против *H. somni*, пригодный для применения в составе безопасной и эффективной вакцины, и в котором, по меньшей мере, следующие гены полностью удалены или мутированы для устранения способности гена экспрессировать родственный продукт гена дикого типа HSM_1160 (белок семейства гликозидгидролаз) и HSM_1714 (липопротеин), которые формируют минимальное количество генов, кодирующих факторы вирулентности, дефицит которых по сравнению с эталонным вирулентным штаммом *H. somni* делает ослабленный штамм неспособным вызывать инфекцию у животных подсемейства бычьих.

26. Генетически сконструированный ослабленный штамм *H. somni* по п.25, имеющий, по меньшей мере, мутации следующих генов, в том числе и полное удаление генов для устранения способности гена

экспрессировать родственный продукт гена дикого типа: HSM_0270, HSM_0338, HSM_0377, HSM_0598, HSM_0708, HSM_0749, HSM_0953, HSM_1160, HSM_1191, HSM_1257, HSM_1426, HSM_1616, HSM_1624, HSM_1714, HSM_1728, HSM_1730, HSM_1734, HSM_1736, HSM_1737, HSM_1741, HSM_1793 и HSM_1889.

27. Вакцинная композиция, способная обеспечить безопасный и эффективный иммунный ответ у животных подсемейства бычьих против *H. somni* или заболеваний, вызванных *H. somni*, содержащая штамм по п.25.



Фиг. 1



Фиг. 2

