

Вербицкий А. А., кандидат ветеринарных наук, доцент*
Сергеев Г. В., научный сотрудник**

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины», г. Витебск

**Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* КМИЭВ В-120, ГЕНОВ *16S rRNA*, *CYA*, *FHA*, *BFRZ*

Резюме

Проанализирована и обобщена информация отечественных и зарубежных исследователей о генах *16S rRNA*, *CyaA*, *fhaB*, *BfrZ* *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120 в сравнении с референс штаммами *Bordetella bronchiseptica* strain RB50 и *Bordetella bronchiseptica* 253. Представлены данные о наличии мутаций в генах *16S rRNA*, *CyaA*, *fhaB*, *BfrZ*, отвечающие за вирулентные свойства бактерии, определены дальнейшие перспективы изучения механизмов взаимодействия бордетелл в системе «паразит-хозяин» и генетического контроля их патогенности.

Summary

Analysed and summarised information of domestic and foreign researchers on *16S rRNA* genes, *CyaA*, *fhaB*, *BfrZ* *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120VAC compared with reference strains *Bordetella bronchiseptica* strain RB50 and *Bordetella bronchiseptica* 253. There are presented the data on the presence of mutations in the genes of the *16S rRNA*, *CyaA*, *fhaB*, *BfrZ* responsible for virulent properties bacteria, determined the further prospects of studying the mechanisms of interaction бордетелл in system «parasite-owner» and the genetic control of their pathogenicity.

Поступила в редакцию 10.01.2014 г.

ВВЕДЕНИЕ

Уже в 1931 году Лесли и Гарднер отметили, что при выращивании штаммов *Bordetella* в пробирке на обычной питательной среде со временем выращенные штаммы спонтанно теряли свои вирулентные свойства и в большинстве случаев необратимо. Это явление называется вариационной фазой (*phase variation*) (Лесли и Гарднер, 1931). Авирулентные бактерии можно также получить, изменяя условия роста, и это явление было названо фенотипической модуляцией (*phenotypic modulation*) (Lacey, 1960). Фенотипические модуляции у бактерий можно получить под воздействием различных стимуляторов, таких как сульфат ионов, никотиновой кислоты или культивировании бактерий при температуре, сопоставимой с температурой тела восприимчивых животных или человека. Проведенный генетический анализ показывает, что так называемый *bvg* локус отвечает за регуляцию таких явлений. Вставки транспозонов в локус *bvg* приводит к

формированию авирулентных вариантов *B. bronchiseptica*. Показано, что локус *bvg* содержит делеции (Monack и др., 1989; Weiss и Falkow, 1984). Кроме того, фенотипические модуляции не происходят как у вирулентных, так и авирулентных штаммов, содержащих мутации по *bvg* локусу (Gross and Rappuoli, 1989; Miller et al., 1992). Локус *bvg* кодирует синтез двух молекул белка, BvgA и BvgS, принадлежащих большому семейству двухкомпонентной системы передачи сигнала от раздражителя к бактерии (Aricò et al., 1989; Gross et al., 1989; Stibitz and Yang, 1991).

В прошлых наших публикациях были показаны основные гены – двухкомпонентной *vag* системы регуляции, отвечающие за вирулентные свойства бактерии (*PTX*, *CYA*, *FHA*, *FIM*, *PRN*, *TcfA*, *BrkA*, *Bfr*) [1].

Целью настоящих исследований явилось изучение генов *16S rRNA*, *CyaA*, *fhaB*, *BfrZ* *Bordetella bronchiseptica* КМИЭВ В-120, в сравнении с референс штаммами *Bordetella bronchiseptica* strain RB50

и *Bordetella bronchiseptica* 253 (NCBI).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбранные праймеры были синтезированы в ОДО «Праймтех» (г. Минск).

Амплификация осуществлялась на амплификаторе «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), учет реакции ПЦР на приборе Gel Doc XR при помощи программного обеспечения imageLab Software, BIO-RAD (США). Анализ секвенс продуктов проводили на приборе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (POP7 polymer, capillary length 36 cm).

Все реакции проводили по стандартным протоколам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн нуклеотидных последовательностей проводили по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ – Национального института генетики Японии и PDB – базы данных белковых последовательностей при помощи поисковой системы

Entrez Национального центра биотехнологической информации США.

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на варибельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров, проводили с помощью программы Vector NTI и BLAST on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

В работе использовали нуклеотидные последовательности штамма *B. bronchiseptica* **КМИЭВ В-120**, кодирующие различные составляющие бактериальной клетки.

Локализация нуклеотидной последовательности *CyaA*, кодирующей оксидоредуктазу (аденилатциклазу, расположенную в цитоплазматических мембранах клеток) в геноме бактериальной клетки, соответствует позиции с 166 762 до 167856 нуклеотида. Данные представлены по последовательности полного гена штамма *Bordetella bronchiseptica* strain *RB50*, complete genome; segment 1/16, GenBank: BX640437.1 – номер в базе данных электронного ресурса NCBI [2], таблица 1–2.

Таблица 1 – Описание гена мишени *Bordetella bronchiseptica* (*CyaA*)

Наименование гена	«bplA»
Локус мишень	«BB0155»
Функция	Окислительно-восстановительные реакции полная гомология с <i>Bordetella pertussis</i> (BX470248) bplA
Продукт	оксидоредуктаза
Протеин_id	AER28047.1

Таблица 2 – Основные параметры сконструированных праймеров

Праймер	Последовательность, 5'-3'	Температура плавления (T _m), °C	GC, %	Ампликон, п.о.
<i>CyaA</i> (f)	GTGGCTGGCCTGGTTCATGA	59.4	57.1	1072
<i>CyaA</i> (r)	CGTTGTAAAACAGCGACGCCAACG	64.1	54.2	

Локализация нуклеотидной последовательности *16S rRNA1* и *16S rRNA 2*, кодирующей 16s субъединицу рибосомальной РНК в геноме бактериальной клетки, соответствует позиции с 233 727 до 234 438 и с 233 555 до 234 070 нуклеотида соответственно. Весь ген, кодирующий 16s субъединицу рибосомальной РНК *Bordetella bronchiseptica*, расположен в геноме бакте-

риальной клетки от 233 547 до 235 078 нуклеотида. Следует отметить также, что расположение *16S rRNA* гена в геноме бактерий, относящихся к роду *Bordetella*, будет различным, однако нуклеотидный состав будет одинаковым у всех представителей рода, что нами и будет использоваться в процессе конструирования диагностической тест-системы.

Данные представлены по последовательности полного гена штамма *Bordetella bronchiseptica strain RB50*, complete genome; segment 6/16, GenBank: BX640442.1 – номер в базе данных электронного ресурса NCBI [3], таблица 3 – 4.

Таблица 3 – Описание гена мишени *Bordetella bronchiseptica* (16S rRNA1 и 16S rRNA 2)

Наименование гена	«16S rRNA»
Продукт	16s субъединица рибосомальной РНК

Таблица 4 – Основные параметры сконструированных праймеров

Праймер	Последовательность, 5'-3'	Температура плавления (Tm), °C	GC, %	Ампликон, п.о.
16S rRNA1 (f)	CTACGGGGGAAAGCGGGGGA	63.6	70.0	711
(r)	GACCGTACTCCCCAGGCGGT	59.7	70.0	
16S rRNA 2 (f)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	48.3	50.0	520
2 (r)	GCGGCTGCTGGCACG	55.1	80.0	

Локализация нуклеотидной последовательности *BfrZ*, кодирующей предшественник рецептора сидерофора в геноме бактериальной клетки, соответствует позиции с 174 032 до 174 348 нуклеотида. Сидерофоры – железопереносящие белки (белки, связывающие железо для дальнейшего переноса внутрь клеток). Весь ген

BfrZ расположен в геноме бактериальной клетки от 173 085 до 175 667 нуклеотида. Данные представлены по последовательности полного гена штамма *Bordetella bronchiseptica strain RB50*, complete genome; segment 15/16, GenBank: BX640451.1 – номер в базе данных электронного ресурса NCBI [4], таблица 5 – 6.

Таблица 5 – Описание гена мишени *Bordetella bronchiseptica* (*BfrZ*)

Наименование гена	«bfrZ»
Локус мишень	«BB0155»
Функция	Транспорт железа
Продукт	Рецептор сидерофора
Протеин_id	CAE 35107.1

Таблица 6 – Основные параметры сконструированных праймеров

Праймер	Последовательность, 5'-3'	Температура плавления (Tm), °C	GC, %	Ампликон, п.о.
<i>BfrZ</i> (f)	GGACGACCAGGATCACATCTTCC	58.3	56.5	298
<i>BfrZ</i> (r)	GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAGG	58.0	56.5	

Локализация нуклеотидной последовательности *fhaB*, кодирующей фактор адгезии в геноме бактериальной клетки, соответствует позиции с 849 503 до 849 801 нуклеотида. Адгезины – разнообразные по строению белковые молекулы, обуславливающие высокую

специфичность микроорганизмов, которая проявляется в способности прикрепляться к клеткам эпителия дыхательных путей. Весь ген *fhaB* расположен в геноме бактериальной клетки от 838 806 до 849 728 нуклеотида.

Данные представлены по последовательности полного гена штамма *Bordetella bronchiseptica* 253 complete genome, GenBank: HE965806.1 – номер в базе данных электронного ресурса NCBI [5], таблица 7 – 8.

Таблица 7– Описание гена мишени *Bordetella bronchiseptica* (*fhaB*)

Наименование гена	« <i>fhaB</i> »
Функция	Прикрепление к слизистому эпителию
Продукт	адгезин
Протеин_id	AAB94077.2

Таблица 8 – Основные параметры сконструированных праймеров

Праймер	Последовательность, 5'-3'	Температура плавления (Tm), °C	GC, %	Ампликон, п. о.
<i>fhaB</i> (f)	ggaaaagtctgaattcccgcg	60.3	60.5	338
<i>fhaB</i> (r)	CGGTGCAATGCTCGCTCACGG	61.0	56.5	

Проведение ПЦР осуществляли, используя программу амплификации: 1. 95°C 3 мин; 2. 94°C 30сек; 58°C 1,0 мин; 72°C 30сек – 40 циклов, 3. 72°C 6 мин; 4. 10°C хранение. Результаты ПЦР реакции реги-

стрировали путем проведения ДНК электрофореза в 2% агарозном геле (рисунок 1 – 2). Из образцов, которые показала наличие искомого фрагмента, были выделены ДНК и проведена реакция секвенирования.

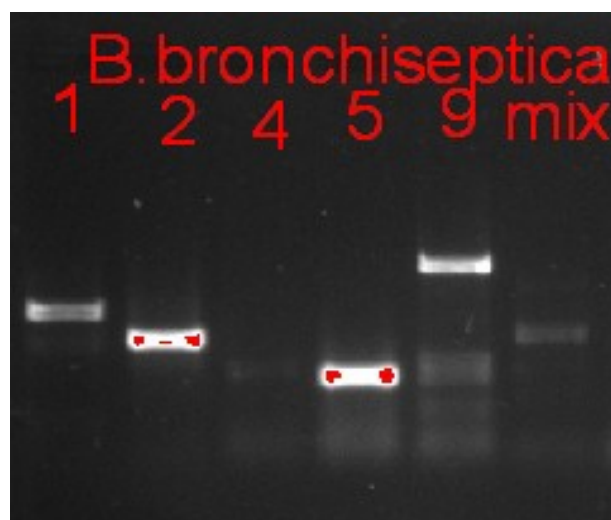
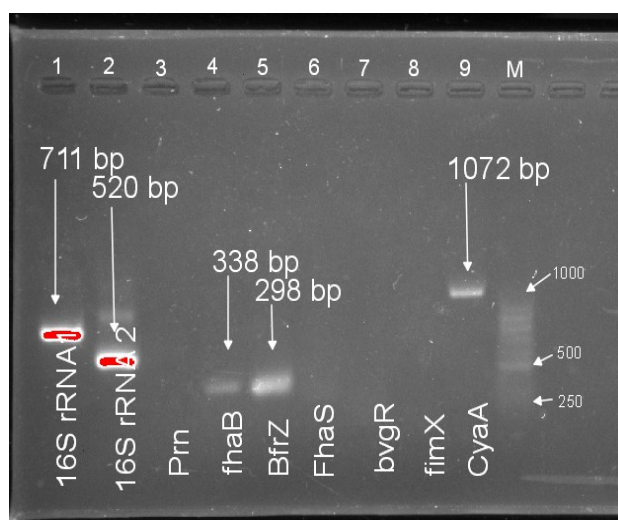


Рисунок 1,2 – Результаты электрофоретической детекции по результатам ПЦР у штамма *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120, генов. 1. *16S rRNA1* – ген, отвечающий за формирование 16 S субъединицу рибосомы; 2. *16S rRNA 2* – ген, отвечающий за формирование 16 S субъединицу рибосомы; 4. *fhaB* – ген, отвечающий за синтез адгезина; 5. *BfrZ* – ген отвечающий за формирование рецептора сидерофора; 9. *CyaA* – ген, отвечающий за синтез белка аденилатциклазы; М – маркер длины амплифицируемого фрагмента (50 bp)

Постановку реакции секвенирования осуществляли, используя набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Секвенирование каждого образца проводили с прямым (F) и обратным (R) праймерами. Очистку се-

квенс-продуктов проводили, используя набор Applied Biosystems BigDye XTerminator Purification Kit. Анализ секвенс продуктов проводили на приборе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (POP7 polymer, capillary length 36 cm).

В результате проведенного секвенс анализа было установлено, что Образец 1 (16S RNA) – участком ДНК, кодирующий последовательность рибосомальных РНК, он является высококонсервативным, что подтверждается сиквенсом участка 16S RNA (711 п. н.) исследуемого

образца и последующим сравнением полученной последовательности с референсной последовательностью *Bordetella* sp. AU3139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (NCBI). Мутации не обнаружены, (рисунок 3).

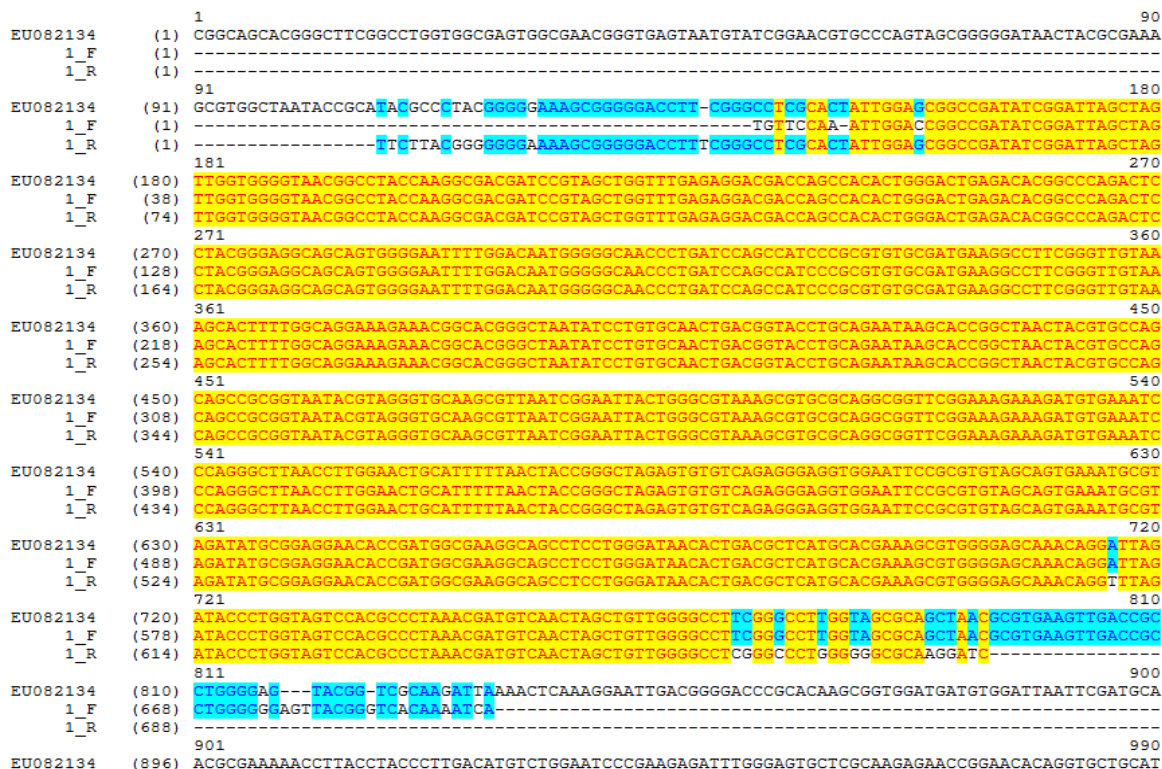


Рисунок 3 – Результаты секвенс анализа участка гена 16S RNA-1, *B. bronchiseptica* КМИЭВ B-120

Как видно на рисунке 3, желтым цветом обозначен высококонсервативный участок ДНК *B. bronchiseptica* длиной 711 п.н., не имеющий в своем составе каких-либо мутаций, что может быть рекомендовано для использования именно этого фрагмента и этих праймеров для детекции представителей рода *Bordetella* в ПЦР. Синим цветом и участок, не имеющий цвета, обозначен фрагмент ДНК в местах прикрепления праймера (F, R).

При анализе праймеров, предназначенных для амплификации участка длиной 520 п.н. гена 16S RNA, было показано, что они способны связываться с целевой областью 16S RNA *B. bronchiseptica* (NC_019382), а также *Bordetella pertussis* CS strain (NR_103933).

Однако при анализе нуклеотидных последовательностей были выявлены множественные различия между полученными последовательностями *B. bronchiseptica* КМИЭВ B-120 и референтными штаммами бордетелл. Использование программы BLAST (NCBI) продемонстрировало гомологию полученных секвенсов с последовательностью KF182272 в пределах 97 – 98%, в то время как гомология со штаммами бордетелл составила 79 – 80%. Последовательность KF182272 получена из бактериального штамма невыясненной природы (Uncultured bacterium clone SL28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence). Такие последовательности были получены

различными учеными мира при изучении микробных сообществ, обитающих в поверхностных слоях почв, а также почв вокруг месторождений нефти и природного газа, так называемые метан-окисляющие бактерии, а также бактерий, обитающих в кишечнике тараканов и термитов, что натолкнуло исследователей на заключение о родстве этих насекомых. (KF182272,

AF379698, JN408238, JX276502, AB497911, JN408238, KF182272, JN680573) European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) [6].

Таким образом, использование праймеров 16S RNA 2 (f)/(r) не всегда может гарантировать выявление ДНК *Bordetella* sp. в исследуемом образце (рисунок 4).

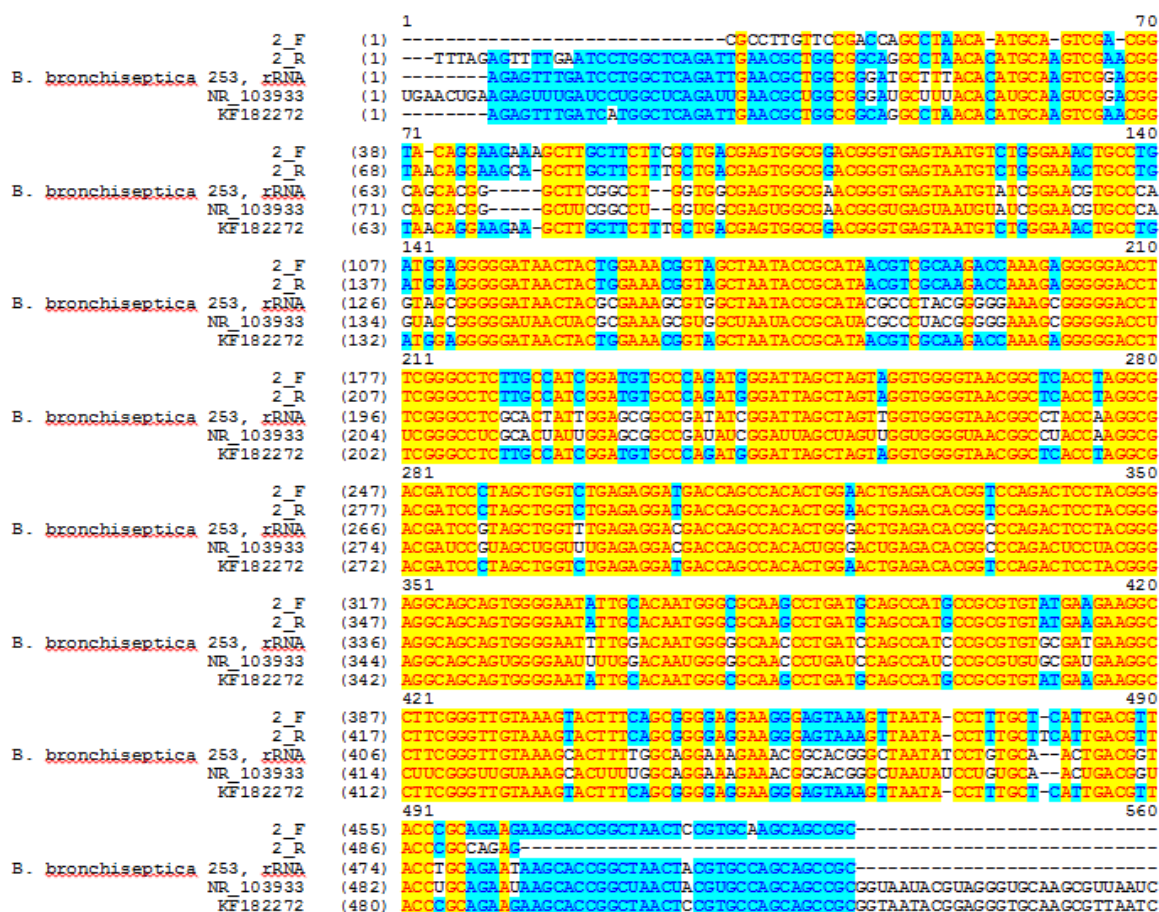


Рисунок 4 – Результаты секвенс анализа участка гена 16S RNA-2, *B. bronchiseptica* КМИЭВ B-120

Сопоставление последовательностей, полученных с помощью праймеров fhaB(f) и fhaB(r) с референтным геномом *B. bronchiseptica* (NC_019382), показало почти полное соответствие с участком 849827-850166 генома *B. bronchiseptica* (NC_019382). Была обнаружена однонуклеотидная замена A/G (849975, NC_019382) в нетранслируемой области (рисунок 5). Большинство генов прокариот,

кодирующих белки, не имеют интронов (нетранслируемые области), поэтому у них сплайсинг пре-мРНК встречается редко. Очень часто нетранслируемые области у эукариот содержат в своем составе открытые рамки считывания, с которых, возможно, идет синтез пептидов длиной не более 15 аминокислот. Однако эта область геномных исследований еще очень молодая и требует более детального изучения.

			301			350
	4_F (1)		-----			
	4_R (1)		-----			GG
B. bronch. 253 part. genome	(301)		CGACGATACGGGCATGAGTACTGCTAAACAGTATCCTACACCCAAATAGG			
			351			400
	4_F (1)		-----			GGGGAACGGGT
	4_R (4)		AAAACTCTGAATCCCGCCGCGCGCCGCGGCGAGCCAGGGGAGCGGGT			
B. bronch. 253 part. genome	(351)		AAAACTCTGAATCCCGTCCGCGCGCCGCGGCGAGCCAGGGGAGCGGGT			
			401			450
	4_F (28)		TGTCGGCGCGTG--CCATGCGTGCCGCACAAGGTTTGATGGTTGGTATAAG			
	4_R (54)		TGTCGGCGCGTGCCATGCGTGCCGCACAAGGTTTGATGGTTGGTATAAG			
B. bronch. 253 part. genome	(401)		TGTCGGCGCGTGCCATGCGTGCCGCACAAGGTTTGATGGTTGGTATAAG			
			451			500
	4_F (77)		AATTTTCCTACAAGA--CCCTGCAGAAATATCCGCTGATGGATGGGCGTATC			
	4_R (104)		AATTTTCCTACAAG--CCCTGCAGAAATATCCGCTGATGGATGGGCGTATC			
B. bronch. 253 part. genome	(451)		AATTTTCCTACAAG--CCCTGCAGAAATATCCGCTGATGGATGGGCGTATC			
			501			
550						
	4_F (127)		TACTGACTGACGAAGTGTGAGGTTTATCCAGACTACTCGCTGGATTTC			
	4_R (152)		TACTGACTGACGAAGTGTGAGGTTTATCCAGACTACTCGCTGGATTTC			
B. bronch. 253 part. genome	(499)		TACTGACTGACGAAGTGTGAGGTTTATCCAGACTACTCGCTGGATTTC			
			551			600
	4_F (177)		AAAACCTAAAACGAGCAGGCCGATAACGGATTCTGCCGATTACTTCACCTT			
	4_R (202)		AAAACCTAAAACGAGCAGGCCGATAACGGATTCTGCCGATTACTTCACCTT			
B. bronch. 253 part. genome	(549)		AAAACCTAAAACGAGCAGGCCGATAACGGATTCTGCCGATTACTTCACCTT			
			601			650
	4_F (227)		CGCTGGTCGGAATATGAACACGAACCTGTATAGGCTGTCTTCAGCCATG			
	4_R (252)		CGCTGGTCGGAATATGAACACGAACCTGTATAGGCTGTCTTCAGCCCTT			
B. bronch. 253 part. genome	(599)		CGCTGGTCGGAATATGAACACGAACCTGTATAGGCTGTCTTCAGCCCTT			
			651			700
	4_F (277)		TTCCGGC--			AA-----
	4_R (302)		TTCCGGC--			
B. bronch. 253 part. genome	(649)		TTCCGGC--			TCGGAAACACC

Рисунок 5 – Результаты секвенс анализа участка гена, *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120, с помощью праймеров fhaB(f) и fhaB(r)

Праймеры bfrZ f/r амплифицируют участок (3961277-3961592, *B. bronchiseptica*, NC_019382) гена *bfrZ*, отвечающего за образование рецептора сидерофора. При секвенировании была обнаружена мутация, приводящая к замене в 338 положении аспарагина на серин (AAC/AGC) (рисунок 6).

			1			50
B. bronch. 253, bfrZ gene	(1)		GGACGACCAGGATCACATCTTCCAGGAGCCCAAGACGTAATTT--GGCAGCG			
bordetella(13.9)_R	(1)		GGACGACCAGGATCACATCTTCCAGGAGCCCAAGACGTAATTT--GGCAGCG			
bordetella(13.9)_F	(1)		-----			GGCAGCG
bordetella(9.8)_F	(1)		-----			GGCAGCG
			51			100
B. bronch. 253, bfrZ gene	(49)		-GTTGACG-TACG-CACCAACCCCGCTTCGACACCCACGCTGACCTACG			
bordetella(13.9)_R	(49)		-GTTGACG-TACG-CACCAACCCCGCTTCGACACCCACGCTGACCTACG			
bordetella(13.9)_F	(19)		CGTTGAAGTTACCGGCAACCAAGTCCCGCTTCGACACCCACGCTGACCTACG			
bordetella(9.8)_F	(15)		GTTGAC-TTACGG-GCCAGTCCCGCTTCGACACCCACGCTGACCTACG			
			101			150
B. bronch. 253, bfrZ gene	(96)		AACGCATGGAATATG--AGCGGTGCCGGAGCAGGAGAACCAACATGCGCA			
bordetella(13.9)_R	(96)		AACGCATGGAATATG--AGGCGGTGCCGGAGCAGGAGAACCAACATGCGCA			
bordetella(13.9)_F	(69)		AACGCATGGAATATG--AGGCGGTGCCGGAGCAGGAGAACCAACATGCGCA			
bordetella(9.8)_F	(63)		AACGCATGCCCCG--AGGCGGTGCCGGAGCAGGAGAACCAACATGCGCA			
			151			200
B. bronch. 253, bfrZ gene	(144)		TCAGCAACCCGGAACAGCCCGTACTACGGTCAGTACTATCCGGTGCCGCGCG			
bordetella(13.9)_R	(144)		TCAGCAACCCGGAACAGCCCGTACTACGGTCAGTACTATCCGGTGCCGCGCG			
bordetella(13.9)_F	(119)		TCAGCAACCCGGAACAGCCCGTACTACGGTCAGTACTATCCGGTGCCGCGCG			
bordetella(9.8)_F	(111)		TCAGCAACCCGGAACAGCCCGTACTACGGTCAGTACTATCCGGTGCCGCGCG			
			201			250
B. bronch. 253, bfrZ gene	(194)		GACTTCTTCTGGGGCA--GCCTCAACGACCGCGCGGTACCCGAAACCGACAC			
bordetella(13.9)_R	(194)		GACTTCTTCTGGGGCA--GCCTCAACGACCGCGCGGTACCCGAAACCGACAC			
bordetella(13.9)_F	(169)		GACTTCTTCTGGGGCA--GCCTCAACGACCGCGCGGTACCCGAAACCGACAC			
bordetella(9.8)_F	(161)		GACTTCTTCTGGGGCA--GCCTCAACGACCGCGCGGTACCCGAAACCGACAC			
			251			300
B. bronch. 253, bfrZ gene	(244)		TTTGCTATGGGACGCCAGGTGGCGGCC--A--GCGAGCGCTTCAACCTCAA			
bordetella(13.9)_R	(244)		TTTGCTATGGGACGCCAGGTGGCGGCC--A--GCGAGCGCTTCAACCTCAA			
bordetella(13.9)_F	(219)		TTTGCTATGGGACGCCAGGTGGCGGCC--A--GCGAGCGCTTCAACCTCAA			
bordetella(9.8)_F	(211)		TTTGCTATGGGACGCCAGGTGGCGGCC--A--GCGAGCGCTTCAACCTCAA			
			301			327
B. bronch. 253, bfrZ gene	(292)		CGCCTACGCCAACTACCAGGAAAGC--			
bordetella(13.9)_R	(286)		-----			
bordetella(13.9)_F	(267)		CGCCTACGCCAACTACCAGGAAAGC--			
bordetella(9.8)_F	(259)		CGCCTACGCCAACTACCAGGAAAGC--			

Рисунок 6 – Результаты секвенс анализа участка гена *bfrZ*, *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120

Праймеры СуаА амплифицируют участок генома бордетеллы, содержащий 5' область гена СуаА (3506179-3507272, NC_019382). В ходе секвенирования представленных образцов, мутаций в данной области обнаружено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Нами были определены последовательности участков генома *B. bronchiseptica*, различных ее генов, с целью изучения их наличия, расположения тех или иных генов в геноме бактерии, а так же выявления тех или иных мутаций у штамма *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120.

2 В результате исследований было установлено наличие высококонсервативных областей, таких как 16S RNA-1, СуаА, fhaB, что позволяет сделать заключение о возможности применения этих областей, с

целью диагностики заболевания вызываемого бактериями *B. bronchiseptica*.

3 В ходе исследований с применением последовательностей bfrZ, была обнаружена мутация, приводящая к замене в 338 положении аспарагина на серин (AAC/AGC), что указывает на значительную вариабельность рецептора сидерофора, а так же связанную с этим различную вирулентность микроорганизмов.

4 При исследовании ДНК *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120 с праймерами 16S RNA-2, была обнаружена гомология в пределах 97–98% с бактериальными штаммами невыясненной природы, штаммами SL28 16S ribosomal RNA, поэтому данные последовательности не могут быть использованы для диагностики заболевания и требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1 А.П. Лемиш, Е.Л. Красникова, А.А. Вербицкий, С. В. Великий Применение теоретических и теоретических приемов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, основанных на молекулярно-генетических методах / Материалы международной научно-практической конференции «Основные направления развития ветеринарной науки», // Минск, 24 – 25 октября 2013 г., С. 158 – 166.

2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BX640437.1>.

3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BX640442.1>.

4 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BX640451.1>.

5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HE965806.1>.

6 [http://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi/query=Uncultured + bacterium+ clone + SL28&submit=Search & db=allebi &requestFrom=ebi_index](http://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi/query=Uncultured+bacterium+clone+SL28&submit=Search&db=allebi&requestFrom=ebi_index).



ПРОДУКТЫ ПЧЕЛОВОДСТВА В ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЕ

П.А. Красочко, Н.Г. Еремия; науч. ред. П.А. Красочко. –
Минск: ИВЦ Минфина, 2013. – 670 с.

В монографии приведены современные данные по биологии пчелиной семьи, требования к производству, хранению продуктов пчеловодства, данные об их использовании в ветеринарной медицине.

Издание предназначено для ветеринарных врачей, зооинженеров, студентов ветеринарных и сельскохозяйственных вузов.