

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8363
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 619:616.98 – 076:579.843.95

Suppression of cellular immunity factors by toxic fraction of supernatant of broth culture *Pasteurella haemolytica*

T.V. Masur, O.V. Yablonska

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 29.01.2018
Received in revised form
01.03.2018
Accepted 08.03.2018

National University of
Life and Environmental
Sciences of Ukraine,
Polkovnik Potechin str., 16,
Kyiv, 03048, Ukraine.
Tel.: +38-097-512-90-05
E-mail: doktorvet67@ukr.net

Masur, T.V., & Yablonska, O.V. (2018). Suppression of cellular immunity factors by toxic fraction of supernatant of broth culture *Pasteurella haemolytica*. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(83), 314–319. doi: 10.15421/nvlvet8363

In the etiology of many infectious animal diseases, *Pasteurella haemolytica* belongs to a specific place. An important factor in the pathogenicity of this microorganism, like the *Pasteurella multocida* serotype D, is the thermostable exotoxin. It can be obtained from bacterial-purified culture fluid. Although the study of toxin formation among microorganisms is quite popular, however, the features of toxin formation in hemolytic pasteurals, depending on the virulence of the pathogen, the nature of the toxic effects of these objects in vivo remain unclear. Materials for research were 16 isolates of *Pasteurella haemolytica*, isolated from pathological and biological material obtained during the outbreaks of respiratory pathology in farm animals. Initially, the nature of the research concerned the establishment of the potential for toxin formation in the isolates obtained. The method provided for a comparative analysis of the DNA nucleotide sequences of each of the investigated isolates *P. haemolytica* and information obtained from the international database. Another part of the work concerned the actual allocation of the major groups of toxic components of *Pasteurella haemolytica* by extraction to determine their biochemical nature. Exotoxin isolation was carried out from the *Pasteurella* spp. The components of the sediment and supernatant were separated by ion exchange chromatography on TSK gels. In order to detect the harmful effects of toxin hemolytic pasteurals on the body, they used the method of determining the opsonic index (the ratio of the phagocytic number in the mixture without the products of toxic fractions to the mixture with the toxin-containing fraction). It has been established that an important factor of the pathogenetic effect in *Pasteurella haemolytica* is the toxic fraction. Electrophoregram analysis of the results of DNA amplification in a comparative aspect with the data of standard samples helped to determine the presence of elements of the genome, which indicate the potential for toxin formation in isolated hemolytic pasteurized isolates from the test material. Toxic fractions isolated from *Pasteurella haemolytica* broth culture supernatant are substances of protein-carbohydrate nature. The isolated peak toxicogenic fractions of dialysate of a bacterial culture sieve contained protein and carbohydrates within the limits of 12.5–20 µg / ml and 0–20 µg/ml, respectively. In the dialysate of the broth culture supernatant, where 5 groups of toxicogenic fractions were identified, the content of protein and carbohydrates in them varied, respectively, in the range from 20 to 95 µg/ml and from 3.3 to 26.62 µg/ml. At reproduction of opsono-phagocytic reaction with participation of toxicogenic fractions of hemolytic pasteurals, a sufficiently expressed immunosuppressive effect of these complexes on the body of warm-blooded substances with an opsonic index of 3 ± 0.03 was established. During further research it is planned to determine the dermal necrotic and lethal effects of the isolated toxicogenic fractions of hemolytic pasteurals on the body of warm-blooded ones.

Key words: *Pasteurella haemolytica*, toxic fraction, broth culture supernatant, DNA, opsonic index.

Супресія клітинних факторів імунітету токсичною фракцією супернатанту бульйонної культури *Pasteurella haemolytica*

Т.В. Мазур, О.В. Яблонська

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

Встановлено, що важливим фактором патогенетичного впливу у *Pasteurella haemolytica*, є токсична фракція. Аналіз електрофореграми результатів ампліфікування ДНК в порівняльному аспекті з даними стандартних зразків допомогли встановити наявність елементів геному, які вказують на потенційну здатність до токсиноутворення у виділених з досліджуваного матеріалу ізолятів гемолітичної пастерели. Токсичні фракції, виділені із супернатанту бульйонної культури *Pasteurella haemolytica*, являють собою речовини протеїново-вуглеводної природи. Виділені пікові токсигенні фракції діалізату осаду бактерійної культури містили в собі білок та вуглеводи в межах відповідно 12,5–20 мкг/мл та 0–20 мкг/мл. В діалізаті супернатанту бульйонної культури, де було визначено 5 груп токсигенних фракцій, вміст в них білка та вуглеводів коливався відповідно в межах від 20 до 95 мкг/мл та 3,3 до 26,62 мкг/мл. При відтворенні опсоно-фагоцитарної реакції за участі токсигенних фракцій гемолітичної пастерели встановлена достатньо виражена імносупресивна дія цих комплексів на організм теплокровних при опсонічному індексі $3 \pm 0,03$.

Ключові слова: *Pasteurella haemolytica*, токсична фракція, супернатант бульйонної культури, ДНК, опсонічний індекс.

Вступ

В етіології багатьох інфекційних хвороб тварин певне місце належить *Pasteurella haemolytica* (Abdullah et al., 1990; Whiteley et al., 1990; Sharif et al., 2005; Poyelson et al., 2007). Важливим фактором патогенності цього мікроорганізму, подібно як і у *Pasteurella multocida* серотипу Д, є термостабільний екзотоксин. Його можна отримати з очищеної від бактерій культуральної рідини.

Для ізолятів, що типуються як *Pasteurella multocida* серотипу Д, виявлена корелятивна залежність між синтезом токсинів та вірулентністю штаму. Токсин проявляє дермонекротичну дію при внутрішньошкірному тесті у поросят-відлученців, токсичну дію на культурі клітин легень ембріонів ВРХ та летальну дію при внутрішньочеревинному введенні білим мишам. Крім того, відомо, що термолабільний екзотоксин *P. multocida* типу Д після введення тваринам на 14-ту добу здатен викликати зміну картини крові і пригнічувати синтез β -лімфоцитів, відповідальних за формування гуморальної імунної відповіді. Також встановлено, що термолабільний токсин серотипу Д пастерел складається з 3-х компонентів, один з яких імунологічно подібний до аналогічного термостабільного токсину *B. bronchiseptica* (Clinkenbeard et al., 1989; Majury and Shewen, 1991; Abdullah et al., 1992; Clinkenbeard et al., 1994; Basaraba et al., 1999; Sun et al., 1999; Radi et al., 1999; Shevtsov et al., 2007).

Бактеріальні токсини у вражаючих концентраціях здатні викликати значну запальну реакцію шкіри, гіперемію селезінки, некроз лімфоїдних елементів, а в судинах – тромбоз та інвазуючу коагуляцію, колапс та збагачення гемоглобіном їх стінок (Townsend et al., 2000; Poermadjaja and Frost, 2000).

Окрім дослідники на підставі визначення дії токсинів пастерел на альвеолярні макрофаги свиней роблять висновок, що вони не відіграють вирішальну роль в патогенезі ензоотичної пневмонії у цих тварин (Schboss, 1987; Reinhold et al., 2002). Хоча дослідження питання токсиноутворення серед мікроорганізмів є досить популярним, проте особливості токсиноутворення у гемолітичної пастерели в залежності від вірулентності збудника, характеру прояву токсичної дії цих об'єктів *in vivo* залишаються не з'ясованими.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом для досліджень були 16 ізолятів *Pasteurella haemolytica*, виділені з патологічного та біоло-

гічного матеріалу, отриманого при спалахах патології респіраторного характеру у сільськогосподарських тварин. Спочатку характер досліджень стосувався встановлення в отриманих ізолятів потенційної здатності до токсиноутворення. Метод передбачав проведення порівняльного аналізу нуклеотидних послідовностей ДНК кожного з досліджуваних ізолятів *P. haemolytica* та інформації, отриманої з міжнародної бази даних за допомогою програмного забезпечення «Vector NT 1» v. 8.0. (Informax). Праймери, використані в дослідженнях, були виготовлені фірмою «Лі-тех».

При розрахунку специфічних олігонуклеотидних праймерів були використані послідовності ДНК пастерел, які зареєстровані в міжнародній базі даних сиквенсів генів GenBank. Він є частиною міжнародного проекту International Nucleotide Sequence Database Collaboration.

Матеріал з ДНК польових ізолятів пастерел отримували наступним чином. У пробірки об'ємом 1,5 мл (типу «еппENDORF») вносили по 100 мкл промитої ЗФР 36-ти годинної бульйонної культури бактерій. В усі пробірки, за допомогою окремих наконечників з аерозольним бар'єром, додавали по 300 мкл лізуючого буферу, що містив 6М гуанідинтіоціанату, та ретельно перемішували на вортексі. Пробірки прогрівали 5 хв. при 65 °С, їх вміст ретельно перемішували на вортексі до повного розчинення матеріалу та центрифугували при 5×10^3 об/хв. протягом 5 секунд. У кожну пробірку вносили по 30 мкл сорбенту силікагелю, знову перемішували на вортексі 10–15 секунд та залишали при кімнатній температурі на 2 хвилини до повного осадження сорбенту, після чого ще раз перемішували і відстоювали 5 хвилин.

Сорбент осаджували у пробірках за допомогою мікроцентрифуги при 5×10^3 об/хв протягом 30 секунд та тричі промивали один раз лізуючим розчином по 300 мкл і двічі по 500 мкл відмиваючим розчином (70% етанол, 100 мМ NaCl і 10 мМ Tris-HCl, pH 8.0). Після видалення супернатанту, осад сорбенту висушували при відкритих кришках пробірок у термостаті при 65°C протягом 5–7 хв. (до повного випаровування спирту) та до кожної пробірки вносили по 50 мкл ТЕ-буферу (pH 8,0) для елюювання ДНК. Елюювання проводили в термостаті при 65 °С протягом 5–6 хвилин, ретельно перемішуючи на вортексі кожну хвилину. Після елюювання сорбент осаджували центрифугуванням при 12×10^3 об/хв протягом 1–2 хвилин та відбирали супернатант, який містив необхідну для подальшої роботи очищену ДНК.

Для відтворення власне ПЛР готували так звані «верхню» та «нижню» реакційні суміші. Для приготування «нижньої» реакційної суміші в одній пробірці змішували по 2,5 мкл. праймерів та нуклеотидів (кінцева концентрація кожного праймеру – 25–30 рМоль/зразок) на кожну пробу з урахуванням контрольних проб. Після змішування на вортексі, в мікропробірці об'ємом 0,5 см³ розкапували по 5 мкл суміші нуклеотидів з праймерами, обережно нашарували по 10 мкл. розтопленого при температурі 95° воску до повного покриття всієї поверхні.

Для приготування «верхньої» реакційної суміші, компоненти змішували в об'ємах з урахуванням кількості дослідних проб, включаючи контрольні. Набір та кількість використаних на одну пробу компонентів подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Об'єм компонентів «верхньої» ПЛР суміші на одну пробу

Компонент ПЛР-суміші-2	Об'єм розчину, мкл
5-х ПЛР буфер	10,0
50 мМ MgSO ₄	3,0
H ₂ O	6,0
Тaq-полімераза	1,0

На поверхню застиглому воску вносили по 10 мкл. «верхньої» реакційної суміші та по дві краплі вазелінової олії. Під олію, у відповідності до маркування пробірок, вносили по 10 мкл. дослідних або контрольних ДНК. В якості негативного контролю ампліфікації використовували ДНК *Escherichia coli*, ДНК *Salmonella typhimurium* та ДНК соматичних клітин свині, вівці та великої рогатої худоби.

ПЛР проводили на термоциклері «Терцик» в режимі активного регулювання згідно програми.

Інша частина роботи стосувалась власне виділення основних груп токсичних компонентів *Pasteurella haemolytica* шляхом екстрагування для з'ясування їх біохімічної природи.

Виділення екзотоксину проводили з культуральної рідини *Pasteurella spp.* Культуру вирощували на м'ясному бульйоні протягом 18 год. Клітини видаляли шляхом центрифугування при 5000 г протягом 30 хв. З одержаного супернатанту білки осаджували сульфатом амонію, додаючи суху сіль до 60% насичення під контролем рН. Витримували суміш протягом ночі при 4 °С. Потім суміш центрифугували при 5000 г протягом 30 хв. Осад збирали та розчиняли у триразовому об'ємі 3 М сульфату амонію. У супернатанті та осаді визначали кількість білка. Було підготовлено 5 зразків: культуральна рідина, супернатант (5,15 мг/мл), супернатант діалізований (1,025 мг/мл), осад (0,575 мг/мл) та осад діалізований (0,25 мг/мл). Білок визначали методом Лоурі. Складові компоненти осаду та супернатанту розділяли шляхом іонообмінної хроматографії на TSK-гелях.

Іонообмінну хроматографію осаду проводили на колонці (2×35 см) Fractogel DEAE-650-s «Merck», Німеччина, урівноважену 0,01 М Трис-НCl буфером рН 7,0. Зразок (12 мл, 30 мг білка) наносили на колонку, елюцію проводили лінійним градієнтом NaCl (0–1 М, по 150 мл) зі швидкістю 24 мл/год (рис. 1). Об'єднували фракції двох одержаних піків та перевіряли їх токсичну дію. З метою виявлення шкодочинного впливу токсину гемолітичної пастерели на організм скористались методикою визначення опсонічного індексу (відношення фагоцитарного числа у суміші без продуктів токсичних фракцій до суміші з токсиномісною фракцією).

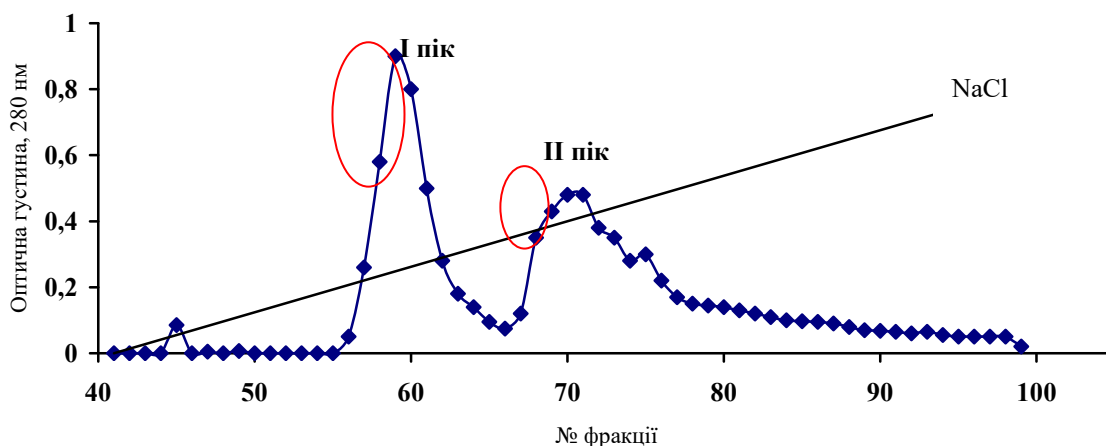


Рис. 1. Іонообмінна хроматографія осаду на Fractogel DEAE-650-s у градієнті NaCl 0 – 1 М

В стерильні центрифужні пробірки наливали і ретельно перемішували 0,1 мл 2%-го розчину цитрату натрію та 0,1 мл крові кроля. Далі до цієї суміші компонентів додавали 0,1 мл 2 млрд. зависі агарової культури бактерій *Pasteurella haemolytica*. В іншу про-

бірку з подібними компонентами додавали 0,1мл певної фракції токсиномісних речовин, виділених із супернатанту бульйонної культури *Pasteurella haemolytica*. Суміші обох пробірок витримували 30 хвилин в термостаті при 37 °С, а потім центрифугува-

ли, відбирали піпеткою верхній шар осаду, що складався з лейкоцитів.

На достатньо знежирених скельцях готували мазки, висушували їх, фіксували сумішшю Нікіфорова протягом 20 хвилин, потім фарбували за методом Романовського-Гімза. Під мікроскопом підраховували кількість бактерій, фагоцитованих нейтрофілами в кількох полях зору у пробах за присутності фракцій з токсинами так і без них.

Іонообмінну хроматографію супернатанту проводили на колонці (3,5×40 см) Fractogel DEAE-650-m «Merck», Німеччина, урівноважену 0,01 М Трис-НСІ буфером рН 7,0. Зразок (15 мл, мг білка) наносили на колонку, елюцію проводили лінійним градієнтом NaCl (0–1 М, по 150 мл) зі швидкістю 30 мл/год (рис. 2).

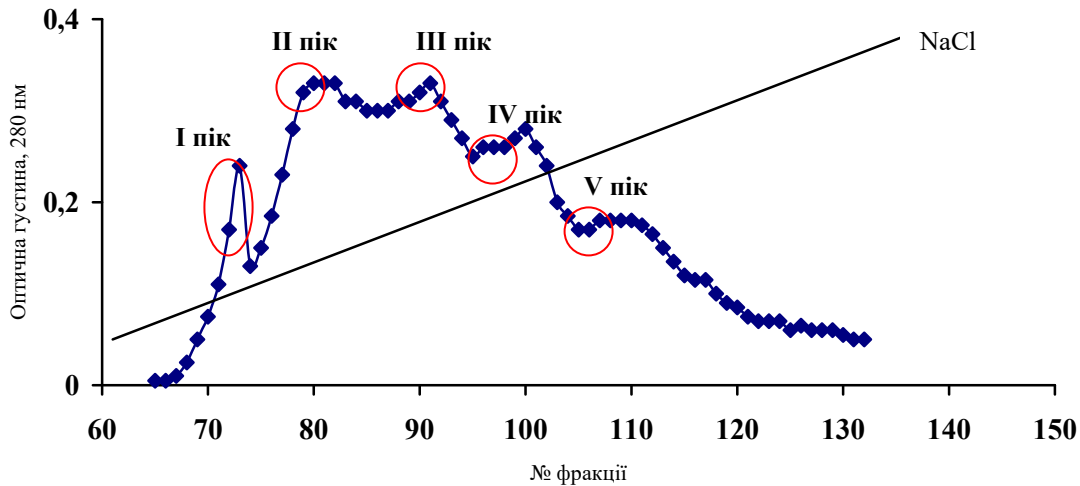


Рис. 2. Іонообмінна хроматографія супернатанту на Fractogel DEAE-650-m у градієнті NaCl 0–1 М

Об'єднували фракції одержаних піків та перевіряли їх токсичну дію в опсоно-фагоцитарних реакціях.

Результати та їх обговорення

З метою встановлення факту схильності до токсинування в ізолятів гемолітичної пастерели за допомогою ПЛР було проведено пошук осередків геному, які кодують дану властивість бактерії.

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей ДНК досліджених штамів пастерел і розрахунок олігонуклеотидних праймерів виконували за допомогою програмного забезпечення «Vector № TI» v.8.0 (Infor Max).

Запуск програми та встановлення пробірок проводили після досягнення термоциклером температури 93°C («гарячий старт»). Дослідження та аналіз продуктів ампліфікації проводили методом розділення фрагментів ДНК в 1,5% гелі агарози «ІА». До розпавленої агарози, охолодженої до 55–60 °С додавали 25 мкл. розчину бромистого етидію та перемішували. Отриманий гель заливали у форму (товщиною 5–6 мм) та за допомогою гребінок робили лунки для внесення зразків (табл. 2).

У випадках, коли реакційна суміш ПЛР вже містила гліцерин та ксиленціанол в якості маркерного барвника, зразки, що досліджувались, вносили безпосередньо в лунки. Смуги гелю розміщували в електрофоретичній камері лунками в напрямку до негативного електроду та в середні лунки вносили по 10,0 мкл

ампліфікованих зразків, а в крайні – по 3 мкл маркерів.

Електрофорез проводили у градієнті напруги 10 В/см до того моменту, як барвник (ксиленціанол) проходив приблизно половину довжини гелю. Дослідження результатів ампліфікування ДНК на електрофореграмах здійснювали візуально за допомогою трансільюмінатора в ультрафіолетовому світлі. Електрофореграми фотографували за допомогою цифрового фотоапарату з використанням жовтогогарячого світлофільтру.

Таблиця 2

Програма температурного режиму ампліфікатора для проведення ПЛР

Праймери tox A F 5'-CTTAGAGAGGGACAAGG-3'		
tox A L 5'-GAATGCCACACCTCTATAG-3'		
Етап	Режим	Кількість циклів
1	94 °С – 4 хв	1
2	94 °С – 30 с	5
	55 °С – 30 с	
	72 °С – 30 с	
3	94 °С – 30 с	30
	55 °С – 30 с	
	72 °С – 30 с	
4	72 °С – 4 хв	1
5	10 °С	зберігання

Фотографічне відображення результатів подано на рис. 3. Аналіз електрофореграми результатів ампліфікування ДНК в порівняльному аспекті з даними стандартних зразків допомогли встановити наявність елементів геному, які вказують на потенційну здатність до токсиноутворення у виділених з досліджуваного матеріалу ізолятів гемолітичної пастерели.

Дані про кількісний та якісний біохімічний склад зразків елементів супернатанту ізолятів гемолітичної пастерели, що підлягали перевірці, подано в таблиці 3.

Облік результатів двох паралельно виконуваних досліджень з матеріалами, отриманими з кожного польового ізоляту гемолітичної пастерели, продемонстрував наступне. Рівень фагоцитованих бактерійних клітин (фагоцитарне число) у пробах сумішей 1-ї групи (6 повторностей) становив 630 ± 12 (мікробних клітин)/ 100 лейкоцитів, що дорівнює $6,3 \pm 0,12$.

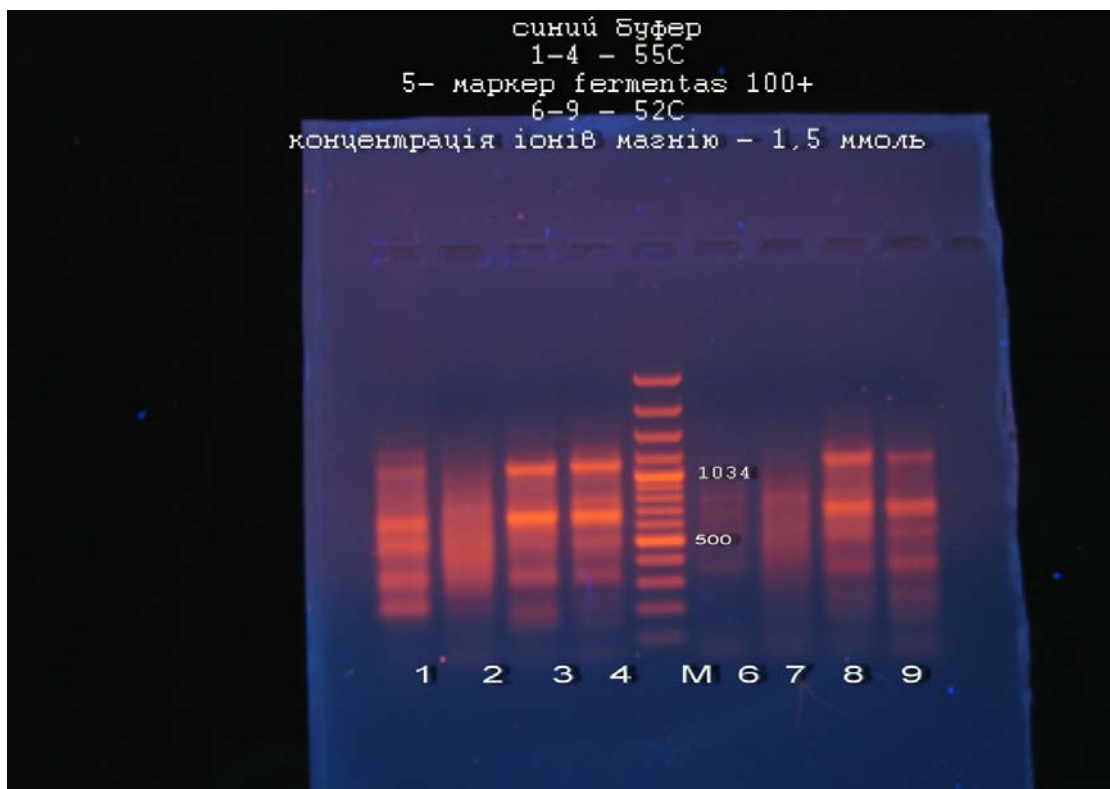


Рис. 3. Електрофореграма результатів ампліфікування ДНК *Pasteurella haemolytica*

Фагоцитарне число у пробах сумішей 2-ї групи (6 повторностей) становило 210 ± 4 (мікробних клітин)/ 100 лейкоцитів, що дорівнює $2,1 \pm 0,04$.

Опсонічний індекс (I_o) за результатами фагоцитарних чисел 1-ї та 2-ї груп експерименту становив:

$$I_o = \frac{6,3 \pm 0,12}{2,1 \pm 0,04} = 3 \pm 0,03$$

Приведені дані свідчать, що токсичні фракції являють собою речовини протеїново-вуглеводної природи. Виділені пікові фракції осаду бактерійної маси та супернатанту бульйонної культури демонстрували достатню імуносупресивну дію за наслідками опонофагоцитарної реакції. Це свідчить про виражену токсичність виділених компонентів.

Висновки

В результаті порівняльної генетичної експертизи ДНК виділених ізолятів гемолітичної пастерели доведена наявність в них ділянки геному, відповідального за формування токсигенних властивостей. Встановлена залежність токсигенності штаму *Pasteurella haemolytica* від концентрації токсичного білку в діалізованому осаді її бульйонної культури понад 250 мкг/мл. Сумарна кількість білку токсигенної фракції діалізованого супернатанту досліджуваних ізолятів гемолітичної пастерели становила 262,5 мкг/мл. Визначений біохімічний кількісно – якісний склад токсичних фракцій бактерійної маси та супернатанту гемолітичної пастерели та їх імуносупресивний вплив

Таблиця 3

Компонентний склад препаратів сумішей фракцій

Проба	Кількість білка, мкг/мл	Кількість вуглеводів, мкг/мл
Осад (діалізований)	250	75
I пік	20	25
II пік	12,5	0
Супернатант (діалізований)	262,5	80,0
I пік	27,5	26,6
II пік	95	23,3
III пік	75	6,6
IV пік	30	3,3
V пік	20	8,3

на організм теплокровних шляхом блокування опсо-но-фагоцитарної реакції з опсонічним індексом 3 ± 0,03.

Перспективи подальшого дослідження. При подальших дослідженнях планується визначення дермо некротичного та летального впливу виділених токсигенних фракцій гемолітичної пастерели на організм теплокровних.

References

- Poyelson, L.L., Reynert, T.M., & Send, R.L. (2007). Rasprostraneniye gemolyticheskoyh mangelnykh sredi klinicheskoyh zdorovykh ovets v Norvegii. Rossiyskiy veterinarniy zurnal. 3, 25 (in Russian).
- Shevtsov, A.A., Rysalev, V.S., Shiryayev, F.A., Potechin, A.V. (2007). Ekonomicheskoye znachimie bakterialnykh bolezni sviney i borba s nimi. Rossiyskiy veterinarniy zurnal. 3, 17 (in Russian).
- Abdullah, K.M., Lo, R.Y., & Mellors, A. (1990). Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. Biochem. Soc. Trans. 18(5), 901–903. doi: 10.1042/bst0180901.
- Abdullah, K.M., Udoh, E.A., Shewen, P.E., & Mellors, A. (1992). A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. Infect Immun. 60(1), 56–62. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729196>.
- Basaraba, R.J., Byerly, A.N., Mosier, D.A. et al. (1999). Actin polymerization enhances *Pasteurella haemolytica* leukotoxicity. Veter. Microbiol. 64(4), 307–321. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10063536>.
- Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A., Timko, A.L., & Confer, A.W. (1989). Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on cultured bovine lymphoma cells. Am J Vet Res. 50(2), 271–275. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2719393>.
- Reinhold, P., Rabeling, B., Gunther, H., & Schimmel, D. (2002). Comparative evaluation of ultrasonography and lung function testing with the clinical signs and pathology of calves inoculated experimentally with *Pasteurella multocida*. Veter. Rec. 150(4), 109–114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11838994>.
- Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J., & Ames, T.R. (1990). Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. Veterinary Pathology. 27(3), 150–161. doi: 10.1177/030098589002700302.
- Radi, Z.A., Register, K.B., Lee, E.K. et al. (1999). In situ expression of intercellular adhesion molecule – 1 (ICAM – 1) mRNA in calves with acute *Pasteurella haemolytica* pneumonia. Veter. Pathol. 36(5), 437–444. doi: 10.1354/vp.36-5-437.
- Majury, A.L., & Shewen, P.E. (1991). The effect of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxic culture supernate on the in vitro proliferative response of bovine lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol. 29(1–2), 41–56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1949582>.
- Sun, Y., Clinkenbeard, K.D., Clarke, C. et al. (1999). *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induced apoptosis of bovine lymphocytes involves DNA fragmentation. Veter. Microbiol. 65(2), 153–166. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10078599>.
- Clinkenbeard, K.D., Clarke, C.R., Hague, C.M. et al. (1994). *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced synthesis of eicosanoids by bovine neutrophils in vitro. Journal of Leukocyte Biology. 56(5), 644–649. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7964171>.
- Townsend, K.M., Hanh, T.X., O’Boyle, D. et al. (2000). PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. Veter. Microbiol. 72(1–2), 69–78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699504>.
- Poermadjaja, B., & Frost, A. (2000). Phagocytic uptake and killing of virulent and avirulent strains of *Pasteurella multocida* of capsular serotype A by chicken macrophages. Veter. Microbiol. 72(1–2), 163–171. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699512>.
- Schboss, P. (1987). Neues uber die Rhinitis atrophica des Schweines. Wien. Tierarztl. Mschr. 74(9), 301–305.
- Sharif, L., Obeidat, J. & Al-Ani, F. (2005). Risk factors for lamb and kid mortality in sheep and goat farms in Jordan. Bulg. J. Vet. Med. 8(2), 99–108.