

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 2, Number 320 (2017), 138 – 143

A. T. Daugalieva, A. K. Musayeva, N. N. Egorova

Kazakh research veterinary institute, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: aida1979@bk.ru, musaeva.1955@mail.ru

MOLECULAR-GENETIC TYPING OF GENE FRAGMENTS *rpsL* OF SALMONELLA STRAINS

Abstract. Genome of Salmonella consists of a single circular chromosome size 4.8 mln.p.n. and row plasmids from 3 kb to 100 kb with different copy number. The plasmid structure more or less specific for each serotype, although, judging by the restriction map, there is considerable homology between the virulence plasmids of different serotypes. The most studied low copy macromolecular plasmids encoding virulence factors. In *S. typhimurium* detected mutation gene *rpsL*, which cause resistance or dependence of streptomycin. The presence of mutations were determined by sequencing of the amplification *rpsL* gene. Genomic DNA was isolated from the strain Salmonella abortus-equi E - 841, which was used to identify mutations in the gene *rpsL*, encoding ribosomal protein S12 size 124 a/a. When comparing the sequenced nucleotide sequence of the gene *rpsL* tested strains, in the vaccine strain were found mutations in the 42 amino acid codon. In the field strain of Salmonella abortus-equi 7/1 in 42 amino acid codon of *rpsL* gene detected sequence AAA, which corresponds to amino acid Lys, which is also present in the sequence of the gene *rpsL* Salmonella typhimurium LT2.

Key words: genotyping, salmonellosis, a vaccine strain, a field strain, a *rpsL* gene.

УДК 619:616. 981.42-07

A. T. Даугалиева, А. К. Мусаева, Н. Н. Егорова

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», Алматы, Казахстан

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ *rpsL* ШТАММОВ САЛЬМОНЕЛЛ

Аннотация. Для определения генетических различий между вакцинным Salmonella abortus-equi E - 841 и полевым Salmonella abortus-equi 7/1 штаммами, относящимися к одному серовару, был применен подход выявления индивидуальных мутаций, обуславливающих резистентность вакцинного штамма к антибиотикам, так как известно, что аттенуированный штамм Salmonella abortus-equi E - 841 был получен селекцией в питательной среде с высокой концентрацией антибиотиков. Изучены нуклеотидные последовательности фрагментов гена *rpsL* вакцинного Salmonella abortus-equi E - 841 и контрольного Salmonella abortus-equi 7/1 штаммов сальмонелл с целью выявления индивидуальных мутаций. В гене *rpsL* штамма Salmonella abortus-equi E - 841 замена нуклеотида А на С приводит к замене аминокислоты Lys на Gln.

Ключевые слова: генотипирование, сальмонеллез, вакцинный штамм, полевой штамм, ген *rpsL*.

Введение Сальмонеллез (Salmonellosis) – полиэтиологическая инфекционная болезнь, вызываемая бактериями рода Salmonella семейства Enterobacteriaceae, характеризуется разнообразными клиническими проявлениями от бессимптомного носительства до тяжелых септических форм.

Геном сальмонелл состоит из одной кольцевой хромосомы размером 4,8 млн.п.н. и ряда плазмид от 3 т.п.н. до 100 т.п.н. с различным количеством копий. Плазмидный состав более или менее специфичен для каждого серотипа, хотя, судя по рестрикционным картам, отмечается зна-

чительная гомология между плазмидами вирулентности различных серотипов [1-3]. Наиболее изучены низкокопийные высокомолекулярные плазмиды, кодирующие факторы вирулентности [4-6].

В последнее десятилетие отмечается увеличение количества изолятов *Salmonella enterica*, обладающих резистентностью к отдельным антибиотикам, таким как ампициллин, хлорамфеникол и тетрациклин, или к их сочетанию [7-9].

Известны три механизма проявления резистентности бактерий к антимикробным агентам – инактивация препарата, выведение препарата из бактериальной клетки или ограничение его транспорта внутрь клетки и изменение мишени, на которую воздействует антибиотик, обусловленное мутациями [10].

Известно, что стрептомицин проявляет антимикробное действие, связываясь с белками малой субъединицы рибосом и нарушая процесс синтеза бактериальных белков, резистентность к стрептомицину чаще всего обусловлена мутациями в белке S12. У *S. typhimurium* обнаружены мутации гена *gprL*, являющиеся причиной резистентности или зависимости от стрептомицина. Показано, что мутации в гене *gprL* снижают скорость трансляции мРНК за счет ее замедления, что приводит к ослаблению вирулентности бактерий [11-13]. В то же время, если такие мутантные штаммы подвергать длительному пассированию на питательных средах, не содержащих стрептомицин, они могут приобретать компенсаторные мутации в этом же [14] или других локусах, повышающие эффективность трансляции, и тем самым, повышающие вирулентность при сохранении резистентности к стрептомицину [15].

Впервые снижение вирулентности сальмонелл с сохранением их иммуногенных свойств было установлено в связи с исследованием ауксотрофов, то есть бактерий, имеющих дефект ферментов метаболизма, обусловленный мутациями, и поэтому требующих для своего роста на минимальной среде добавления витаминов, аминокислот и нуклеотидов. Для увеличения частоты таких мутаций, спонтанно возникающих очень редко, используется обработка культур физическими и химическими мутагенами. В мировой практике используются *agoA*-мутанты *Salmonella enteritidis* и двойные мутанты с делециями в генах аденилат-циклазы и рецептора цАМФ *S.typhimurium* [16-18]. Для производства живых вакцин также используют штаммы, приобретшие резистентность к антибиотикам и сниженную вирулентность в результате мутации в генах, кодирующих рибосомальные белки и РНК-полимеразу. Производятся аттенуированные вакцины, изготовленные из стрептомицинзависимых мутантов [19, 20]. Для получения аттенуированных штаммов сальмонелл также используют метод инсерционного мутагенеза [21], основанный на свойстве транспозонов встраиваться в геном клеток реципиентов и, тем самым, нарушать функционирование генов, в последовательности которых произошла инсерция. Транспозируемая последовательность, как правило, содержит гены резистентности к антибиотикам, что является маркером отбора клонов со встроеной транспозируемой последовательностью.

Целью исследования являлась разработка сухой живой вакцины из аттенуированного коллекционного штамма против сальмонеллезного аборта кобыл. В процессе работы проводились исследования по изучению нуклеотидной последовательности фрагментов гена *gprL* вакцинного и контрольного штаммов сальмонелл с целью выявления индивидуальных мутаций в ДНК, обуславливающих вирулентность.

Методы исследования. Резистентность вакцинных штаммов сальмонелл к антибиотикам тестировалась на среде Хоттингера с 1,5 % агаром с добавлением стрептомицина (500 мкг/мл). Наличие мутаций определяли методом секвенирования фрагментов амплификации гена *gprL*. Из штамма *Salmonella abortus-equi* E - 841 была выделена геномная ДНК, которая использовалась для выявления мутаций в гене *gprL*, кодирующим рибосомальный белок S12 размером 124 а.к.

Для амплификации кодирующей области гена были выбраны праймеры, специфичные для рода *Salmonella*, на основе, опубликованной в Gene Bank последовательности гена *gprL* *Salmonella typhimurium* LT 2, следующего состава:

5' –cgt cct cat att gtg tga ggg -3' и 5' –gca tgg aaa tac tcc gtt gtt -3'

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10 рМ каждого праймера, и 10-50 нг ДНК.

ПЦР проводили по следующей программе: 95° С - 1 мин, 55° С - 30 сек., 72° С - 1 мин; количество циклов - 30.

Продукты реакции 544 п.о. анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5 % агарозном геле и 1x TAE буфере, содержащий бромистый этидий в концентрации 0,25 мкг/мл, с последующей регистрацией результатов системой гель-документирования.

Фрагменты генов *gprL* вакцинного *Salmonella abortus-equi* E - 841 и полевого *Salmonella abortus-equi* 7/1 штаммов затем были секвенированы. Секвенирование фрагментов амплификации проводилось с использованием циклического секвенирования по методу Сенгера на амплификаторе с набором ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V.1 (USA), с последующим анализом методом капиллярного электрофореза на ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Реакция секвенирования проводилась по следующей программе: 1 мин при 96° С, а затем 25 циклов: 96° С - 10 сек., 55° С - 5 сек., 60° С - 4 мин и хранение 4° С. В качестве праймеров для секвенирования использовались те же праймеры, которые были использованы в ПЦР.

Результаты исследований. При сравнении секвенированных нуклеотидных последовательностей гена *gprL* тестируемых штаммов, в вакцинном штамме были обнаружены мутации в 42 аминокислотном кодоне.

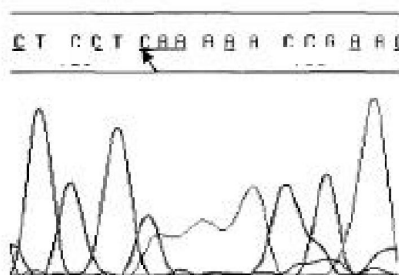


Рисунок 1 – Секвенограмма фрагментов нуклеотидных последовательностей гена *gprL* штамма *Salmonella abortus-equi* E – 841: Lys – 42 на Gln (AAA на CAA)

Подчеркнуты аминокислотные кодоны, в которых произошли мутации, приводящие к заменам аминокислот, положение мутантного нуклеотида показано стрелкой.

В гене *gprL* штамма *Salmonella abortus-equi* E - 841 замена нуклеотида А на С приводит к замене аминокислоты Lys на Gln.



Рисунок 2 – Секвенограмма фрагментов нуклеотидных последовательностей гена *gprL* штамма *Salmonella abortus-equi* 7/1: Lys – 42 (AAA)

В полевом штамме *Salmonella abortus-equi* 7/1 в 42 аминокислотном кодоне гена *gprL* обнаружена последовательность AAA, что соответствует аминокислоте Lys, которая также присутствует в последовательности гена *gprL* *Salmonella typhimurium* LT2.

Обсуждение результатов. Генетические исследования по изучению нуклеотидной последовательности фрагментов генов *groB* и *gprL* вакцинного и контрольного штаммов сальмонелл проведены с целью выявления индивидуальных мутаций в ДНК, обуславливающих остаточную вирулентность у вакцинного штамма *Salmonella abortus – equi* E-841, вирулентность у контрольного штамма сальмонелл *Salmonella abortus – equi* 7/1. Отработана методика, позволяющая

определять индивидуальные генетические особенности аттенуированных вакцинных штаммов и контролировать возникновение дополнительных компенсаторных мутаций, которые могут приводить к повышению уровня вирулентности новых серий вакцинных препаратов.

Аттенуированный вакцинный штамм сальмонелл *Salmonella abortus-equi* E-841, полученный селекцией на среде со стрептомицином в концентрации 500 мкг/мл, имеет мутацию в гене *gprL*, что обуславливает их сниженную вирулентность и резистентность к стрептомицину.

При этом в ДНК контрольного штамма сальмонелл *Salmonella abortus-equi* 7/1 мутации не обнаружены, следовательно, вирулентность не снижена и резистентности к антибиотикам не имеет.

Таким образом, впервые молекулярно - генетическими методами изучена генетическая структура вакцинного *Salmonella abortus-equi* E-841 и контрольного штаммов *Salmonella abortus-equi* 7/1. В результате генетических исследований обнаружены мутации в нуклеотидных последовательностях гена *gprL* ДНК вакцинного штамма, обуславливающие снижение вирулентности штамма.

Впервые в Казахстане составлены генетические паспорта производственных штаммов *Salmonella abortus-equi* E-841 с мутационными изменениями в гене ДНК вакцинного штамма. Вакцина изготовлена из аттенуированного вакцинного штамма *Salmonella abortus-equi* E-841 с изученными нуклеотидными последовательностями ДНК, с выявлением мутаций, обуславливающими стойкость аттенуации и предотвращающих реверсию.

Выводы. В результате генетических исследований обнаружены мутации в нуклеотидных последовательностях ДНК вакцинного штамма, обуславливающие возникновение антибиотикорезистентности и снижение вирулентности штамма, и таким образом, можно сделать предположение, что аттенуация вакцинных штаммов сальмонелл, подвергшихся селекции в среде с высокой концентрацией антибиотиков, может быть обусловлена накоплением мутаций в генах, кодирующих РНК-полимеразу и рибосомальные белки. Поэтому логично выбрать эти области генома для поиска предполагаемых мутаций, являющихся, возможно единственными, индивидуальными генетическими особенностями этих аттенуированных вакцинных штаммов сальмонелл.

Источник финансирования исследований. Министерство науки и образования РК, грантовое финансирование научных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Buisan M., Rodriguez- Pena J.M., Rotger R. Restriction map of *Salmonella enteritidis* virulence plasmid and its gemology with the plasmid of *Salmonella typhimurium*, *Microb Pathog*, 1994, Vol.16, P.165-169.
- [2] Williamson C.M., Baird G.D., Manning E.J. A common virulence region of plasmids from eleven serotypes of *Salmonella*, *J.Gen Microbiol*, 1988, Vol.134, P.975-982.
- [3] Woodward M.J., Mc Laren I., Wray C. Distribution of virulence plasmids within *Salmonella*, *J.Gen Microbiol*, 1989, Vol.135, P.503-511.
- [4] Fields P.I., Swanson R.V., Haidaris C.G., Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within macrophage are avirulent, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 1986, Vol.83, P.5189-5193.
- [5] Taira S., Rhen M. Molecular organization of genes constituting the virulence determinant on the *Salmonella typhimurium* 96 kilobase pair plasmid, *FEBS LETTERS*, 1989, Vol.257, P.274-278.
- [6] Williamson C.M., Pullinger G.D., Lax A.J. Identification of an essential virulence region of *Salmonella* plasmids, *Microbiol. Pathogenesis*, 1988, Vol.5, P.469-473.
- [7] Grob U., Tshape H., Bendarek I., Frosch M. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*, *Eur J.Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 1998, Vol.17, P.385-7.
- [8] Gallardo F., Ruiz J., Marco F., Towner K.J., Vila J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance, *J.Med Microbiol*, 1999.-Vol.48, P.367-74.
- [9] Mirelis B., Llovet T., Munoz C., Navarro F., Prats G. Resistance of *Salmonella* and *Campylobacter* species to antimicrobial agents, *Eur J.Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 1999, Vol.18.-P.312.
- [10] Maloy S.R., Stewart V.J., Taylor R.K. Genetic analysis of pathogenic bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, P. 55-60.
- [11] Zengel J.M., Young R., Dennis R.R., Nomura M. Role of ribosomal protein S12 in peptide chain elongation: analysis of pleiotropic, streptomycin-resistant mutants of *E. coli*, *J. Bacteriol*, 1977, Vol.129, P.1320-1329.
- [12] Bilgin N., Claesens F., Pahverk H., Ehrenberg M. Kinetic properties of *E. coli* ribosomes with altered forms of S12, *J.Mol.Biol*, 1992, Vol.224, P.1011-1027.
- [13] Bjorkman J., Samuelsson P., Andersson D.I., Hughes D. Novel ribosomal mutation affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella Typhimurium*, *J.Mol.Biol*, 1999, Vol.31,N, P.53-58.

- [14] Bjorkman J., Hughes D., Andersson D.I. Virulence and antibiotic resistance Salmonella Typhimurium, PNAS, 1998, Vol.95, P.3949-3953.
- [15] Schrag S., Perrot V. Reducing antibiotic resistance, Nature, 1996, Vol.381, P.120-121.
- [16] Cooper G.L., Venables L.M., Nicholas R.A., Cullen G.A., Hormaeche C.E. Further studies of the application of the live Salmonella enteritidis aroA vaccines in chickens, Vet.Rec, 1993, Vol.133, P.31-36.
- [17] Cooper G.L., Venables L.M., Nicholas R.A., Woodward M.J., Hormaeche C.E. Vaccination of chickens with strain CVL 30, a genetically defined Salmonella enteritidis aroA live oral vaccine candidate, Infect Immun, 1994, Vol.62, P.4747-4754.
- [18] Hassan J.O., Curtiss R. Development and evolution of an experimental typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous Salmonella serotype, Infect Immun, 1994, Vol.62, P.5519-5527.
- [19] Ленеv С.В., Малахов Ю.А. Профилактика и диагностика сальмонеллеза сельскохозяйственных животных, Сборник научных трудов ВГНКИ, 2001, Т.62.-С.52- 57.
- [20] Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических методов исследований. М., Медицина, 1968, С. 336-340.
- [21] Воложанцев Н.В., Светоч Э.А., Борзилов А.И. Получение вакцинных штаммов сальмонелл с помощью инсерционного мутагенеза, Ветеринария, 1997.№9, С.20-24.

REFERENCES

- [1] Buisan M., Rodriguez-Pena J.M., Rotger R. Restriction map of Salmonella enteritidis virulence plasmid and its gemology with the plasmid of Salmonella typhimurium, Microb Pathog, 1994, Vol.16, P.165-169.
- [2] Williamson C.M., Baird G.D., Manning E.J. A common virulence region of plasmids from eleven serotypes of Salmonella, J.Gen Microbiol, 1988, Vol.134, P.975-982.
- [3] Woodward M.J., Mc Laren I., Wray C. Distribution of virulence plasmids within Salmonella, J.Gen Microbiol, 1989, Vol.135, P.503-511.
- [4] Fields P.I., Swanson R.V., Haidaris C.G., Heffron F. Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within macrophage are avirulent, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 1986, Vol.83, P.5189-5193.
- [5] Taira S., Rhen M. Molecular organization of genes constituting the virulence determinant on the Salmonella typhimurium 96 kilobase pair plasmid, FEBS LETTERS, 1989, Vol.257, P.274-278.
- [6] Williamson C.M., Pullinger G.D., Lax A.J. Identification of an essential virulence region of Salmonella plasmids, Microbiol. Pathogenesis, 1988, Vol.5, P.469-473.
- [7] Grob U., Tshape H., Bendarek I., Frosch M. Antibiotic resistance in Salmonella enterica serotype Typhimurium, Eur J.Clin. Microbiol. Infect. Dis, 1998, Vol.17, P.385-7.
- [8] Gallardo F., Ruiz J., Marco F., Towner K.J., Vila J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of Salmonella enterica serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance, J.Med Microbiol, 1999.-Vol.48, P.367-74.
- [9] Mirelis B., Llovet T., Munoz C., Navarro F., Prats G. Resistance of Salmonella and Campilobacter species to antimicrobial agents, Eur J.Clin. Microbiol. Infect. Dis, 1999, Vol.18.-P.312.
- [10] Maloy S.R., Stewart V.J., Taylor R.K. Genetic analysis of pathogenic bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, P. 55-60.
- [11] Zengel J.M., Young R., Dennis R.R., Nomura M. Role of ribosomal protein S12 in peptide chain elongation: analysis of pleiotropic, streptomycin-resistant mutants of E. coli, J. Bacteriol, 1977, Vol.129, P.1320-1329.
- [12] Bilgin N., Claesens F., Pahverk H., Ehrenberg M. Kinetic properties of E. coli ribosomes with altered forms of S12, J.Mol.Biol, 1992, Vol.224, P.1011-1027.
- [13] Bjorkman J., Samuelsson P., Andersson D.I., Hughes D. Novel ribosomal mutation affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of Salmonella Typhimurium, J.Mol.Biol, 1999, Vol.31,N, P.53-58.
- [14] Bjorkman J., Hughes D., Andersson D.I. Virulence and antibiotic resistance Salmonella Typhimurium, PNAS, 1998, Vol.95, P.3949-3953.
- [15] Schrag S., Perrot V. Reducing antibiotic resistance, Nature, 1996, Vol.381, P.120-121.
- [16] Cooper G.L., Venables L.M., Nicholas R.A., Cullen G.A., Hormaeche C.E. Further studies of the application of the live Salmonella enteritidis aroA vaccines in chickens, Vet.Rec, 1993, Vol.133, P.31-36.
- [17] Cooper G.L., Venables L.M., Nicholas R.A., Woodward M.J., Hormaeche C.E. Vaccination of chickens with strain CVL 30, a genetically defined Salmonella enteritidis aroA live oral vaccine candidate, Infect Immun, 1994, Vol.62, P.4747-4754.
- [18] Hassan J.O., Curtiss R. Development and evolution of an experimental typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous Salmonella serotype, Infect Immun, 1994, Vol.62, P.5519-5527.
- [19] Ленеv С.В., Малахов Ю.А. Профилактика и диагностика сальмонеллеза сельскохозяйственных животных, Сборник научных трудов ВГНКИ, 2001, Т.62.-С.52- 57.
- [20] Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических методов исследований. М., Медицина, 1968, С. 336-340.
- [21] Воложанцев Н.В., Светоч Э.А., Борзилов А.И. Получение вакцинных штаммов сальмонелл с помощью инсерционного мутагенеза, Ветеринария, 1997.№9, С.20-24.

А. Т. Даугалиева, А. К. Мусаева, Н. Н. Егорова

Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринария институты, Алматы, Қазақстан

**САЛЬМОНЕЛЛАЛАРДЫҢ *gpsL* ГЕНДЕР ФРАГМЕНТІН
МОЛЕКУЛЯРЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘДІСПЕН ТИПТЕУ**

Аннотация. Бір сероварға жататын *Salmonella abortus-equi* E - 841 вакциналық штаммымен *Salmonella abortus-equi* 7/1 далалық штаммының генетикалық айырмашылығын табу үшін индивидуальды мутацияларын анықтау жолы таңдалып алынды. Мутациялар вакциналық штаммның антибиотиктерге төзімділігін шарттайды, өйткені аттенуирленген *Salmonella abortus-equi* E - 841 штамм антибиотиктердің жоғары концентрациясы бар қоректік ортада селекция жолымен алынған. Сальмонеллалардың *Salmonella abortus-equi* E - 841 вакциналық және бақылау *Salmonella abortus-equi* 7/1 штаммдарының *gpsL* гендерінің индивидуальды мутациялары зерттелді. *Salmonella abortus-equi* E - 841 штаммында А нуклеотиді С нуклеотидіне ауысқан, сондықтан Лυσаминқышқылы Глнаминқышқышылығымен алмастырылған.

Түйін сөздер: генотиптеу, сальмонеллез, вакциналық штамм, далалық штамм, *gpsL* гені.

Сведения об авторах:

А.Т. Даугалиева – кандидат вет. наук.

А.К. Мусаева – доктор биол. наук.

Н.Н. Егорова – кандидат вет. наук.

Товарищество с ограниченной ответственностью «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», Алматы, Казахстан, e-mail: kaznivialmaty@mail.ru