ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ И ИММУНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ/INFECTIOUS DISEASES AND ANIMAL IMMUNOLOGY

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.139

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ *E.COLI* С ВЫЯВЛЕНИЕМ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Научная статья

Терлецкий В.П.[1, *]

[1] Ленинградский государственный университет им. А. С. Пушкина, Санкт-Петербург, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (valterletskiy[at]gmail.com)

Аннотация

Эшерихиозы являются широко распространенным заболеваниями сельскохозяйственной птицы, включая индеек. Заболевание вызывается грамм-отрицательной условно-патогенной бактерией *E.coli*. Патогенность микроорганизма определяется наличием совокупности генов вирулентности. Выраженность клинической картины заболевания также определяется состоянием иммунной системы организма хозяина. В качестве мер профилактики инфекционных болезней птицы часто используются карантинные мероприятия, позволяющие изолировать больных особей. Научно обоснованные профилактические мероприятия включают генотипирование патогена, позволяющее оценить эпизоотический потенциал возбудителя, идентифицировать пути передачи бактерии и найти источник инфекции. В ходе проведенной работы выяснилось большее генетическое разнообразие изолятов *E.coli*, выделенных из материнской линии индеек. Ген птичьего гемолизина (*HlyF*) присутствовал в геноме всех изолятов данной бактерии, в то время, как ген птичьего фимбриального адгезина отсутствовал.

Ключевые слова: E.coli, бактериальный изолят, ген, вирулентность.

GENOTYPING OF *E.COLI* ISOLATES WITH IDENTIFICATION OF VIRULENCE GENES

Research article

Terletskiy V.P.[1, *]

[1] Pushkin Leningrad State University, Saint-Petersburg, Russian Federation

* Corresponding author (valterletskiy[at]gmail.com)

Abstract

Escherichiosis is a widespread disease of poultry, including turkeys. The disease is caused by the gram-negative opportunistic bacterium *E.coli*. The pathogenicity of the microorganism is determined by the presence of a set of virulence genes. The severity of the clinical picture of the disease is also determined by the state of the host's immune system. Quarantine measures are often used as preventive measures for infectious diseases of poultry, allowing to isolate sick individuals. Scientifically justified preventive measures include genotyping of the pathogen, which makes it possible to evaluate the epizootic potential of the pathogen, identify pathways of transmission of the bacterium and find the source of infection. In the course of this work, a greater genetic diversity of *E.coli* isolates extracted from the maternal line of turkeys was revealed. The avian haemolysin gene (*HlyF*) was present in the genome of all isolates of this bacterium, while the avian fimbrial adhesin gene was absent.

Keywords: E.coli, bacterial isolate, gene, virulence.

Введение

К числу условно-патогенной микрофлоры птиц относится широко распространенная в природе бактерия *E.coli* [1]. Обычно эта бактерия является частью микробиоты кишечника и не вызывает развития заболевания у птиц и млекопитающих. Однако, в определенных условиях, когда бактерия приобретает путем горизонтального переноса генетической информации участки ДНК с генами вирулентности, она становится патогенной для хозяина. Ситуацию отягощает скученное содержание птицы, неполноценное кормление, приводящие к снижению иммунитета [2], [3]. При контактах птицы в условиях индустриального выращивания создаются условия для распространения инфекции. Отследить этот процесс можно с использованием методов генотипирования бактерий [4], [5]. Широкому распространению генов резистентности к антибиотикам способствует использование последних в кормах [6]. Существует большое число методов генотипирования бактерий [7], среди которых выделяются методы, основанные на полимеразной цепной реакции, в частности, с использованием праймеров к повторяющемуся генетическому элементу в геноме энтеробактерий ERIC [8] и коротких праймеров к анонимным последовательностям в геноме RAPD [9]. По данным генотипирования *E.coli*, выделенных из различных источников, бактерии разделяют на несколько кластеров, в зависимости от хозяина, например, птичьи патогены именуются группой APEC [3], [10]. Цель работы заключалась в определении генетического разнообразия изолятов *E.coli*, выделенных из разных групп индеек и выявлении носительства генов вирулентности у бактерий. Эти вопросы на примере патогенов индеек, разводимых в условиях промышленных птицефабрик, раскрыты недостаточно, что и предопределило тему работы. Полученные данные могут быть использованы специалистами при планировании ветеринарно-санитарных профилактических мероприятий.

Методы и принципы исследования

Объектом исследования служили образцы геномной ДНК, выделенные из чистой культуры *E.coli*. Бактерии выращивались на бульоне в соответствии с общепринятыми в микробиологии правилами. В анализ были взяты 30

бактериальных изолятов, полученных из смывов клоаки индеек создаваемого среднего кросса (отцовская линия – образцы 1-10, материнская линия – образцы 11-20), а также 10 изолятов из разных органов (почки, легкие, сердце, печень и красный костный мозг) трех заболевших (павших) индеек. В момент взятия биоматериала не было найдено других индеек с клиническими признаками эшерихиоза. У павших особей диагноз «эшерихиоз» был установлен патологоанатомическим исследованием (характерная картина серозно-фибринозного перикардита, дуоденита, воспалительный процесс в тонком кишечнике, и затем подтвержден микробиологическим методом выращивания бактерии на дифференциально-диагностических средах (среда Эндо и XLD-агар).

Для выделения геномной ДНК клетки бульонной культуры *E.coli* осаждали центрифугированием при 3000g в микроцентрифуге, осадок суспендировали в буфере TES (50 мМ Трис-HCL, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCL, pH 8.0). Суспензия инкубировалась в течение 30 минут после внесения лизоцима (конечная концентрация 2 мг/мл) при 37°C. Затем клетки лизировали путем добавления в смесь додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. Геномную ДНК *E.coli* выделяли с использованием фенольно-хлороформенного метода. Количество и качество выделяемой ДНК оценивали в спектрофотометре NanoDrop 2000™.

Генотипирование проводили с помощью метода RAPD-PCR с использованием HotStart ДНК полимеразы и двух праймеров – 1254 и OPL-12. Выявление генов резистентности *HlyF* (птичий гемолизин) и *Yqi* (птичий фимбриальный адгезин) осуществляли с помощью специфических праймеров, окружающих участок соответствующего гена. Последовательности праймеров и условия амплификации изложены в таблице 1. Устанавливали количество циклов – 42, начальная денатурация ДНК и активация полимеразы 95°C в течение 5 минут, затем на каждом цикле продолжительность денатурации была 15 секунд при этой же температуре. По завершении всех циклов амплификации, проводили инкубацию при температуре 72°C в течение трех минут.

Таблица 1 - Последовательность нуклеотидов и условия проведения ПЦР с RAPD-праймерами 1254, OPL-12 и праймерами для детекции генов вирулентности HlyF и Yqi

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.139.1

Праймеры	Последовательность нуклеотидов	Температура отжига, °C	Температура элонгации, °C
1254	CCG CAG CCA A	37	72
OPL-12	GGGCGGTACT	37	72
HlyF	GGCCACAGTCGTTT AGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCAT TCCGATACTCAG	62	72
Yqi	CTGGTGGCAACATC AAATTG ATGCAATGGCAGTA CCCTTC	62	72

После проведения амплификации продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле с бромидом этидия в буфере 1xTAE. Устанавливали напряжение в 120 В, разделение фрагментов ДНК проводили в течение двух часов. По окончании электрофореза гель помещали в систему гель-документации и производили фиксацию результатов. Для оценки длины амплификатов использовали либо рестрикты фага лямбда либо лесенку GeneRuler (Thermo Fisher Sci™).

Основные результаты

В процессе проведенной научно-исследовательской работы были выявлены генетические профили изолятов *E.coli* (Рис.1).

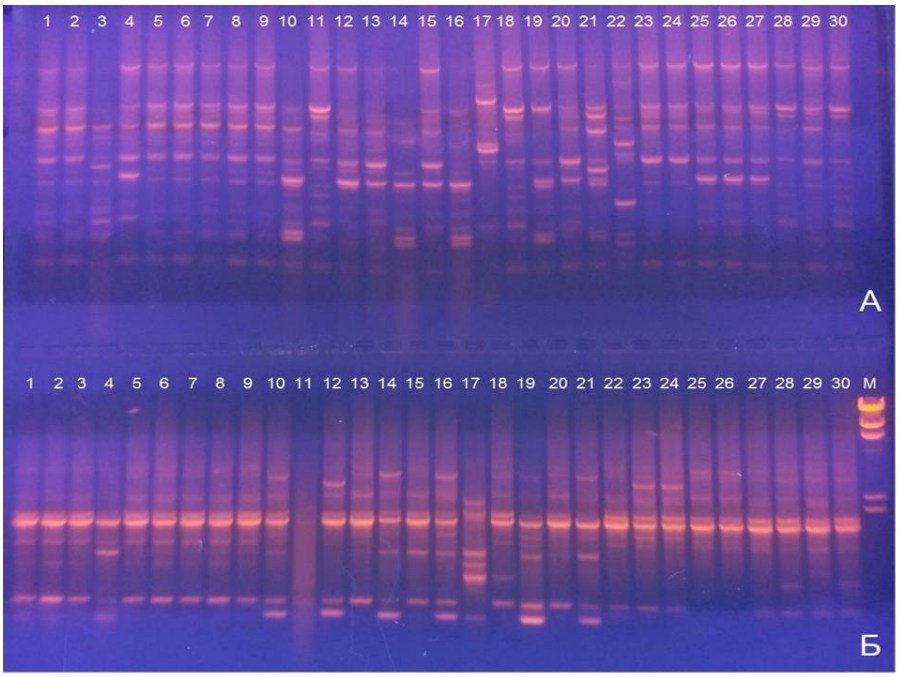

Рисунок 1 - Генетические профили 30 изолятов *E.coli*:
сверху (*а*) - праймер 1254; *снизу* (*б*) - праймер OPL-12; *дорожки 1-10* отцовская линия; *дорожки 11-20* материнская линия; *дорожки 21-30* патологический материал из индеек
DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.139.2

При анализе генетических профилей бактериальных изолятов, выделенных от индеек отцовской линии создаваемого среднего кросса (дорожки 1-10) становится очевидным генетическая гомогенность и только два изолята №3 и №10, значительно отличались от всех остальных в этой группе при использовании праймера 1254. Очевидно, у индеек отцовской группы доминирует один штамм *E.coli*, что предполагает передачу бактерии между особями. Таким образом, в отцовской группе установлено всего три различающихся генотипа. Штамм №10 был отличным от других также при использовании праймера OPL-12. Использование этого праймера дает отличающуюся картину для изолятов №4 и №10. Следовательно, можно с уверенностью утверждать, что штамм №3 был генетически отличающимся от остальных, что подтверждается данными одновременно по двум праймерам. Разрешающая способность RAPD-метода оказалась недостаточной для полного совпадения результатов по штаммам №3 и №4 при использовании двух праймеров.

Что касается данных генотипирования изолятов, выделенных от материнской линии, то здесь просматривается большее генетическое разнообразие. Праймер 1254 был более информативным в сравнении с праймером OPL-12 в плане идентификации генетических профилей. Было выявлено восемь различающихся генотипов, что превышает количество выявленных вариантов в отцовской линии (три генотипа).

В группе изолятов, выделенных из биоматериала павших индеек обращает на себя внимание выраженная дифференциация изолятов на отдельные кластеры. Например, один кластер включал изоляты в дорожках №23 и №24, другой – №25, №26 и №27, третий – №28 и №30, выявились также и уникальные штаммы – №21, №22 и №29.

Проведение эксперимента по выявлению двух генов вирулентности *HlyF* (птичий гемолизин) и *Yqi* (птичий фимбриальный адгезин) в бактериальных изолятах, выделенных от отцовской и материнской линий, показало, что во всех образцах присутствовал ген птичьего гемолизина, а ген фимбриального адгезина отсутствовал (Рис.2.). Размер амплифицируемого фрагмента ДНК соответствовал ожиданиям (450 пар оснований) и был немного меньше, чем ярко светящийся в электрофоретической дорожке маркерный фрагмент GeneRuler в 500 пар оснований. В дальнейшем планируется проведение аналогичной работы с двумя другими генами вирулентности – *Iss* (фактор, повышающий выживаемость клетки в сыворотке крови), и *OmpT* (поверхностный белок с протеазной активностью).

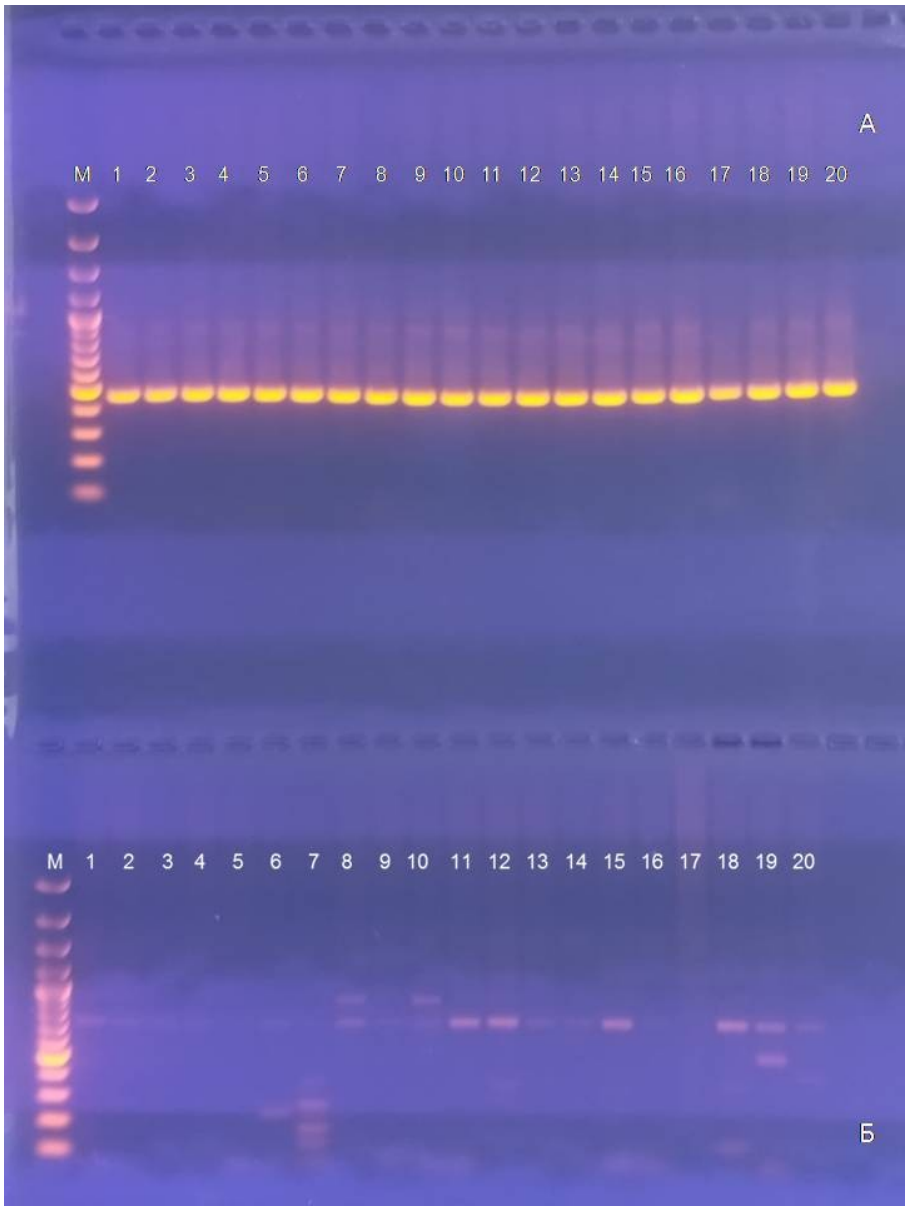

Рисунок 2 - Наличие генов вирулентности у изолятов *E.coli*:
дорожки 1-10 - смыв из клоаки индеек создаваемого среднего кросса, отцовская линия; *дорожки 11-20* - смыв из клоаки индеек создаваемого среднего кросса, материнская линия; *а* – праймер для выявления гена вирулентности *HlyF* (птичий гемолизин); *б* - праймер для выявления гена вирулентности *Yqi* (птичий фимбриальный адгезин)
DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.139.3

Эти гены согласно международной классификации принадлежат к группе птичьих патогенов APEC, вызывая клинические признаки колибактериоза у птиц [3], [10]. По данным клинического обследования индеек двух линий признаков заболевания не выявлено, что предполагает необходимость наличия одновременно большего числа генов вирулентности для проявления клинических признаков.

Заключение

Таким образом, доказано большее генетическое разнообразие изолятов в материнской группе изолятов с формированием восьми различающихся генотипов, в группе изолятов *E.coli* от клинически больных индеек методом RAPD-PCR удалось идентифицировать 4 генотипа. В группе изолятов от отцовской и материнской линий здоровых индеек выявлено присутствие гена вирулентности птичьего гемолизина (*HlyF*), в то же время четкой амплификации гена птичьего фимбриального адгезина (*Yqi*) не наблюдалось.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Литусов Н.В. Эшерихии. Иллюстрированное учебное пособие / Н.В. Литусов. — Екатеринбург: УГМА, 2016. — 36 с.
2. Новикова О.Б. О проблеме колибактериоза в птицеводстве / О.Б. Новикова, М.А. Павлова, А.А. Бартенев // Эффективное животноводство. — 2018. — № 6. — С. 64-66.
3. Поспелова Ю.С. Возбудители колибактериоза сельскохозяйственной птицы — носители генов, ассоциированных с вирулентностью экстраинтестинальных и кишечных Escherichia coli / Ю.С. Поспелова, Э.М. Старчич, М.В. Кузнецова // Сельскохозяйственная биология. — 2022. — № 2. — С. 356-370. — DOI: 10.15389/agrobiology.2022.2.356rus
4. Сколотнева Е.С. Методы генотипирования бактерий: фрагментный анализ / Е.С. Сколотнева, Р.А. Волкова, Е.В. Эльберт [и др.] // Биопрепараты. — 2014. —№ 2. — С. 13-21.
5. Щепеткина С.В. Современные принципы антибиотикотерапии в птицеводстве / С.В. Щепеткина, О.Б. Новикова, А.В. Забровская [и др.] — СПб.: ФГБОУ ВПО СПбГАВМ, 2015. — 160 с.
6. Eltai N.O. Antibiotic Resistance Profile of Commensal Escherichia coli Isolated from Broiler Chickens in Qatar / N.O. Eltai, E.A. Abdfarag, H. Al-Romaihi [et al.] // J. Food Prot. — 2018. — № 81. — P. 302-307.
7. Hussein A.H. Molecular and Phenotypic Characterization of Escherichia Coli Isolated from Broiler Chicken Flocks in Egypt / A.H. Hussein, I.A. Ghanem, A.A. Eid // Avian Dis. — 2013. — Vol. 57. — № 3. — P. 602-611.
8. Otokunefor K. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) as a Tool for Genetic Characterisation of Bacterial Isolates in Nigeria / K. Otokunefor, C.J. Ogugbue, B.U. Fajoyomi // Nigerian Journal of Biotechnology. — 2020. — № 37. — P. 122-128.
9. Lin W.J. A Novel Target Pathogen Identification and Tracking System Using Capillary Electrophoresis-Random Amplified Polymorphic DNA / W.J. Lin, C.Y. Tung, M.Y. Yen [et al.] // Sci. Rep. — 2018. — Vol. 8(1). — P. 15365. — DOI: 10.1038/s41598-018-33702-6.
10. Apostolakos I. Occurrence of Colibacillosis in Broilers and its Relationship with Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC) Population Structure and Molecular Characteristics / I. Apostolakos, A. Laconi, L. Mughini-Gras [et al.] // Front. Vet. Sci. — 2021. — Vol .8. — P. 737720. — DOI: 10.3389/fvets.2021.737720.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Litusov N.V. Esherihii. Illyustrirovannoe uchebnoe posobie [Escherichia. Illustrated textbook] / N.V. Litusov. — Yekaterinburg: USMA, 2016. — 36 p. [in Russian]
2. Novikova O.B. O probleme kolibakterioza v pticevodstve [About Problem of Collibacillosis in Poultry Farming] / O.B. Novikova, M.A. Pavlova, A.A. Bartenev // Effektivnoe zhivotnovodstvo [Effective Animal Husbandry]. — 2018. — № 6. — P. 64-66. [in Russian]
3. Pospelova YU.S. Vozbuditeli kolibakterioza sel'skohozyajstvennoj pticy — nositeli genov, associirovannyh s virulentnost'yu ekstraintestinal'nyh i kishechnyh Escherichia coli [The Causative Agents of Colibacillosis in Poultry: Carriers of Genes Associated with Extraintestinal and Interstinal Pathogenic Escherichia Coli] / Yu.S. Pospelova, E.M. Starchich, M.V. Kuznecova // Sel'skohozyajstvennaya biologiya [Agricultural Biology]. — 2022. — № 2. — P. 356-370. — DOI: 10.15389/agrobiology.2022.2.356rus [in Russian]
4. Skolotneva E.S. Metody genotipirovaniya bakterij: fragmentnyj analiz [Bacteria Genotyping Methods: Fragment Analysis] / E.S. Skolotneva, R.A. Volkova, E.V. El'bert [et al.] // Biopreparaty [Biopreparations]. — 2014. — № 2. — P. 13-21. [in Russian]
5. Shhepetkina S.V. Sovremennye principy antibiotikoterapii v pticevodstve [Modern Principles of Antibiotic Therapy in Poultry Farming] / S.V. Shhepetkina, O.B. Novikova, A.V. Zabrovskaja [et al.] — SPb.: FGBOU VPO SPbGAVM, 2015. — 160 p. [in Russian]
6. Eltai N.O. Antibiotic Resistance Profile of Commensal Escherichia coli Isolated from Broiler Chickens in Qatar / N.O. Eltai, E.A. Abdfarag, H. Al-Romaihi [et al.] // J. Food Prot. — 2018. — № 81. — P. 302-307.
7. Hussein A.H. Molecular and Phenotypic Characterization of Escherichia Coli Isolated from Broiler Chicken Flocks in Egypt / A.H. Hussein, I.A. Ghanem, A.A. Eid // Avian Dis. — 2013. — Vol. 57. — № 3. — P. 602-611.
8. Otokunefor K. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) as a Tool for Genetic Characterisation of Bacterial Isolates in Nigeria / K. Otokunefor, C.J. Ogugbue, B.U. Fajoyomi // Nigerian Journal of Biotechnology. — 2020. — № 37. — P. 122-128.
9. Lin W.J. A Novel Target Pathogen Identification and Tracking System Using Capillary Electrophoresis-Random Amplified Polymorphic DNA / W.J. Lin, C.Y. Tung, M.Y. Yen [et al.] // Sci. Rep. — 2018. — Vol. 8(1). — P. 15365. — DOI: 10.1038/s41598-018-33702-6.
10. Apostolakos I. Occurrence of Colibacillosis in Broilers and its Relationship with Avian Pathogenic Escherichia Coli (APEC) Population Structure and Molecular Characteristics / I. Apostolakos, A. Laconi, L. Mughini-Gras [et al.] // Front. Vet. Sci. — 2021. — Vol .8. — P. 737720. — DOI: 10.3389/fvets.2021.737720.