

УДК 636.09:577.21:579.842.1/.2:57.063.8

РУБЛЕНКО Н. М., провідний лікар вет. медицини
ДЕРЯБІН О. М., зав. відділу молекулярної біології та імунохімії
ГОЛОВКО А. М., д-р вет. наук, академік НААН
ПІНЧУК Н. Г., канд. вет. наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
rublenko@biocontrol.com.ua

ВИЯВЛЕННЯ ТА АНАЛІЗ ПОШИРЕННЯ ГЕНІВ ПОМІРНИХ БАКТЕРІОФАГІВ У ШТАМАХ *SALMONELLA ENTERICA*

Наведено дані щодо виявлення генів помірних бактеріофагів у польових штамів *Salmonella enterica*, що були виділені протягом 2014–2016 років у промислових птахогосподарствах на території України. А також у музейних штамів *Salmonella enterica* з колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів). Для дослідження було обрано 3 гени, що кодують фактори патогенності сальмонел та походять від помірних бактеріофагів з родин *Siphoviridae* та *Myoviridae*. Було встановлено, що ген *girA* наявний у 11 % усіх досліджуваних штамів; *sodC1* – у 25 %. Ген *sopE* було виявлено у 70,5 % штамів. Також встановлено, що серед польових штамів дані гени зустрічаються частіше.

Ключові слова: сальмонела, гени, бактеріофаги, фактори патогенності, штами, птахи.

Постановка проблеми. Щороку захворюваність на сальмонельоз зростає, що призводить до значних збитків у агропромислових господарствах. Переважно це стосується птахівництва, оскільки основним джерелом інфекції є куряче м'ясо, яйця та ячні продукти, внаслідок чого частішають випадки харчових токсикоінфекцій у людей, що споживають такі продукти [1, 2]. На фоні збільшення обсягів споживання продукції птахівництва постає питання пошуку шляхів ефективного контролю епізоотологічної ситуації щодо сальмонельозу. Класичним методом діагностики сальмонельозу є висів патологічного матеріалу на поживні середовища з подальшим виділенням чистої культури збудника та серологічним типуванням [3]. Однак з метою прискорення отримання результатів та мінімізації витрат на дослідження дедалі частіше застосовують молекулярно-біологічні методи. Одним із таких є полімеразна ланцюгова реакція. Метод є досить чутливим та дозволяє виявити збудник за значно коротший термін, ніж із застосуванням традиційних методів діагностики [4].

Також полімеразна ланцюгова реакція застосовується для диференціації та вивчення молекулярних основ патогенезу шляхом дослідження генів, які кодують фактори патогенності. Це дає можливість проаналізувати зв'язок між клінічною картиною та генетичними детермінантами факторів патогенності у сальмонел. До того ж різниця у комбінації генів може вказувати на різні популяції збудника, що циркулюють на одній території.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Факторами патогенності у сальмонел є білки, токсини, ферменти та інші специфічні речовини, що забезпечують колонізацію, адгезію, інвазію та механізми протидії фагоцитозу в клітинах хазяїна [5]. Гени, що їх кодують локалізуються на хромосомах або на великих плазмідах. Як правило, гени вірулентності взаємодіють між собою і мають взаємну регуляцію. Але, як відомо, геном бактерій є дуже мінливим, тому сальмонели можуть як набувати нові гени вірулентності, так і втрачати їх [6]. Це, відповідно, може бути причиною зниження патогенності, або навпаки – призводити до появи нових високопатогенних популяцій.

Набуття генів вірулентності може бути спричинено постійною циркуляцією бактерій у навколишньому середовищі. В цьому випадку позахромосомні спадкові елементи передаються шляхом так званого горизонтального переносу генів. Ще одним джерелом отримання нових генів, а отже, і нових властивостей є інфікування бактеріофагами.

Бактеріофаги – це віруси мікроорганізмів, які існують у двох основних формах: літичні та помірні. Принципова різниця між ними полягає у тому, що помірні фаги здатні, залежно від умов, лізувати бактерію або ж вбудовуватися в її геном і змінювати її фенотипові властивості [7]. Найчастіший результат інфікування бактерій помірними фагами – внесення в геном бактерії генів, що посилюють інвазивні та патогенні властивості. Типовим прикладом цього є інфіку-

вання сальмонел профагом sopEφ. Як відомо ключовим для інвазії та виживання для сальмонел всередині клітин є бактеріальна система секреції білків 3 типу T3SS1 [8]. Вона фактично є механізмом для транслокації білкових факторів патогенності із бактеріальної цитоплазми у цитоплазму клітини хазяїна і складається із не менше ніж 20 білків [8]. Ген sopE, який входить до T3SS1 і джерелом якого є профаг sopEφ (належить до родини Myoviridae), кодує однойменний білок, який взаємодіє з актиновим цитоскелетом, спричиняючи його перебудову. За втрати цього гена сальмонели можуть значною мірою зменшувати свою інвазивність [9].

Серед помірних фагів, у сальмонел часто зустрічаються профаги родини Siphoviridae (Gifsy-1, Gifsy-2). Обидва фаги здатні до індукції за дії УФ-випромінювання та Мітоміцину C [10]. Gifsy-1 вносить до геному бактерії потенційні гени вірулентності, основним з яких є girA. Експресія цього гена впливає на колонізацію тонкого кишечнику сальмонелами, а його делеція призводить до значної втрати вірулентності бактерії [9]. Такий значний вплив на вірулентність пояснюється тим, що за експресії girA бактерії мають здатність персистувати у Пейєрових пляшках [11, 12]. Подібний вплив на вірулентність бактерій має профаг Gifsy-2, який є носієм гена sodC1. Останній, викликаючи синтез супероксиддисмутази, є фактором патогенності та підвищує вірулентність штамів у п'ять разів [13].

Крім того, між цими двома бактеріофагами встановлена чітка взаємозалежність: за наявності у геномі сальмонели профага Gifsy 2, вплив Gifsy-1 не виявляється. Однак останній здатен підсилювати патогенність бактерій за відсутності профага Gifsy-2, але за умови, що ген sodC1 інтегрований у хромосому [14].

З огляду на наведені вище дані, гени помірних фагів здатні впливати на вірулентність сальмонел. Тому дослідження їх поширення серед штамів, що циркулюють у птахогосподарствах є важливим для пошуку шляхів контролю за епізоотологічною ситуацією із сальмонельозу.

Мета дослідження – виявити гени помірних бактеріофагів (sopE, sodC1, girA) у польових та музейних штамів бактерії роду *Salmonella*.

Матеріал і методика дослідження. Для дослідження було використано 30 польових штамів бактерії роду *Salmonella*, що виділено в кількох промислових птахогосподарствах, а також 14 штамів з колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) – *Salmonella* Abortusovis 372, *Salmonella* Adabraka 1, *Salmonella* Choleraesuis 370, *Salmonella* Choleraesuis 9, *Salmonella* Choleraesuis TC-177, *Salmonella* Gallinarum Pullorum K, *Salmonella* Gallinarum Pullorum 941, *Salmonella* Gallinarum Pullorum Петелинський, *Salmonella* Gallinarum Pullorum Ставропольський, *Salmonella* Typhimurium 371, *Salmonella* Typhimurium 141, *Salmonella* Typhimurium 144, *Salmonella* Typhimurium 3, *Salmonella* Dublin 373.

Ліофільно висушені штами, а також ті, що зберігалися у напіврідкому агарі культивували у м'ясо-пептонному бульйоні за температури 37 °C впродовж 24 годин. Після цього культури пересівали на чашки із твердим селективним середовищем XLD (Xylose Lysine Desoxycholate, Himedia, Індія).

Через 24 години відбирали 1-2 колонії з твердого середовища і виділяли ДНК за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-В» (Амплиценс, Росія). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на термоциклерах «Терцик» (ДНК-технологія, Росія) та «Т1» (Biometra, Німеччина).

Реакцію проводили в об'ємі 0,025 см³. З метою мінімізації утворення неспецифічних димерів праймер-матриця і їх ампліфікації, був використаний метод приготування реакційної суміші з фізичним розділенням компонентів ПЛР. Аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5 % гелі агарози (Sigma, США), аналіз смуг ДНК на отриманій електрофореграмі та їх реєстрацію виконували за допомогою «Molecular Image GelDoc XR+» (BioRad, США). Праймери для ПЛР були синтезовані в НВФ „ЛИТЕХ” (Росія) (табл. 1).

Таблиця 1 – Праймери, використані у дослідженні

Ген	Послідовність олігонуклеотидного праймеру (5'→3')	Розмір фрагмента ДНК (п.н.)	Автор
girA	ACGACTGAGCAGCGTGAGTTG GAAATGGTGACGGTAGAC	422	[15]
sopE	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG	398	[16]

	GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG CGGGCAGTGTGGACAAAT AAAGTGTGGGAATTGTGGAGTC		
sodC1		424	[15]
Термопрофіль ПЛР	95 °C 30 с	94 °C, 60 с	95 – 30 с
	85 °C 30 с	55 °C, 60 с	58 – 30 с
	72 °C 30 с	72 °C, 60 с	72 – 30 с

Основні результати дослідження. За результатами досліджень було ідентифіковано гени по-мірних бактеріофагів (*sopE*, *sodC1*, *girA*) як серед польових, так і серед музейних штамів.

Насамперед усі досліджувані культури було проаналізовано із загальнородовими прайме-рами щодо відповідності генетичного матеріалу сальмонел у полімеразній ланцюговій реакції.

На першому етапі досліджень виявляли наявність профагового гена *girA* (здатність персис-тувати у Пейерових бляшках). Серед досліджених штамів ($n = 14$) 28,5 % були позитивними: *S. Abortusovis* 372, *S. Choleraesuis* 370, *S. Dublin* 373, *S. Gallinarum Pullorum* K. Результати елек-трофорезу в агарозному гелі представлено на рисунку 1. За дослідження польових штамів ($n = 30$) позитивним виявився лише один – *S. Typhimurium* 061PN.

Ген *sopE*, який кодує синтез ефекторного білка, що бере участь в інвазії, був ідентифікований у 5 музейних штамів: *S. Dublin* 373, *S. Gallinarum Pullorum* 941, *S. Gallinarum Pullorum* K, *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський, *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський (рис. 2). Серед польових шта-мів 26 були позитивними щодо наявності гена *sopE*. Негативними ж виявилися 4: *S. Typhimurium* 061PN, *S. Infantis* PN та 2 нетипованих штами (*S. enterica* VM3, *S. enterica* PgA 1).

Щодо поширеності гена *sodC1* (синтез Cu, Zn-супероксиддисмутаза) серед досліджуваних штамів спостерігалась подібна картина. Позитивними були 5 музейних штамів: *S. Dublin* 373, *S. Gallinarum Pullorum* 941, *S. Gallinarum Pullorum* K, *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський, *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський (рис. 3). Польових штамів – 17 позитивних.

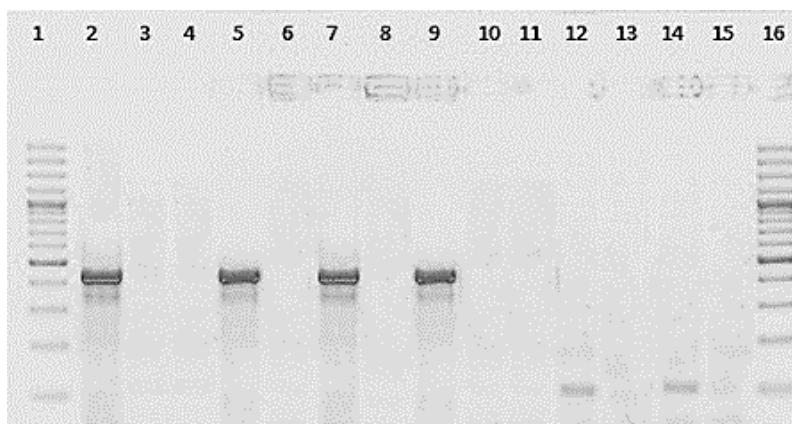


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР в 1,5 % агарозному гелі з праймерами *girA*: 1 – маркер «O'GeneRuler 100 bp plus» (Thermo Scientific); 2 – *S. Abortusovis* 372; 3 – *S. Adabraka* 1; 4 – *S. Choleraesuis* 9; 5 – *S. Choleraesuis* 370; 6 – *S. Choleraesuis* TC – 177; 7 – *S. Dublin* 373; 8 – *S. Gallinarum Pullorum* 941; 9 – *S. Gallinarum Pullorum* K; 10 – *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський; 11 – *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський; 12 – *S. Typhimurium* 3; 13 – *S. Typhimurium* 141; 14 – *S. Typhimurium* 144; 15 – *S. Typhimurium* 371.

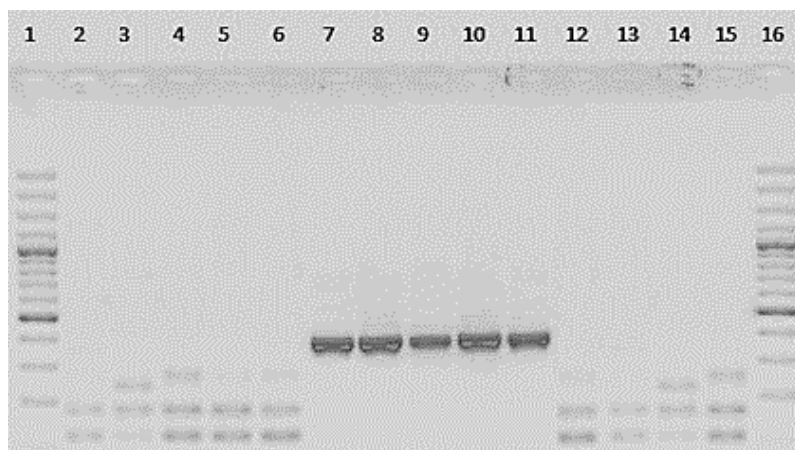


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР в 1,5 % агарозному гелі з праймерами *sopE*: 1. – маркер «O'GeneRuler 100 bp plus» (Thermo Scientific); 2 – *S. Abourtusovis* 372; 3 – *S. Adabraka* 1; 4 – *S. Choleraesuis* 9; 5 – *S. Choleraesuis* 370; 6 – *S. Choleraesuis* TC – 177, 7 – *S. Dublin* 373; 8 – *S. Gallinarum Pullorum* 941; 9 – *S. Gallinarum Pullorum* K; 10 – *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський; 11 – *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський; 12 – *S. Typhimurium* 3; 13 – *S. Typhimurium* 141; 14 – *S. Typhimurium* 144; 15 – *S. Typhimurium* 371.

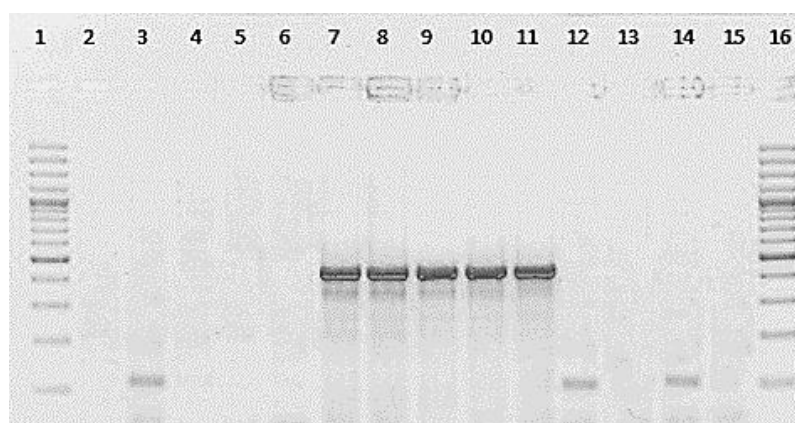


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР в 1,5 % агарозному гелі з праймерами *sodC1*: 1 – маркер «O'GeneRuler 100 bp plus» (Thermo Scientific); 2 – *S. Abourtusovis* 372; 3 – *S. Adabraka* 1; 4 – *S. Choleraesuis* 9; 5 – *S. Choleraesuis* 370; 6 – *S. Choleraesuis* TC – 177, 7 – *S. Dublin* 373; 8 – *S. Gallinarum Pullorum* 941; 9 – *S. Gallinarum Pullorum* K; 10 – *S. Gallinarum Pullorum* Петелінський; 11 – *S. Gallinarum Pullorum* Ставропольський; 12 – *S. Typhimurium* 3; 13 – *S. Typhimurium* 141; 14 – *S. Typhimurium* 144; 15 – *S. Typhimurium* 371.

Загальні результати проведених досліджень наведені у таблицях 2, 3.

Таблиця 2 – Результати досліджень з польовими штамами

Польові штами	<i>sopE1</i>	<i>sodC1</i>	<i>gipA</i>
<i>S. Enteritidis</i> DN 1			
<i>S. Enteritidis</i> 1M			
<i>S. Enteritidis</i> 2M			
<i>S. Enteritidis</i> 3M			
<i>S. Enteritidis</i> 4M			
<i>S. Enteritidis</i> 5M			
<i>S. Enteritidis</i> 6M			
<i>S. Enteritidis</i> 7M			
<i>S. Enteritidis</i> 8M			

S. Enteritidis 9M			
S. Enteritidis 10M			
S. Enteritidis 11M			
S. Enteritidis PN			
S. Enteritidis GT			
S. Enteritidis L1			
S. Enteritidis L2			
S. Typhimurium 061 PN			
S. Typhimurium L1			
S. Typhimurium L2			
S. Virchow 1			
S. Infantis PN			
S. enterica C			
S. enterica VM1			
S. enterica VM2			
S. enterica VM3			
S. enterica VM4			
S. enterica PgA 1			
S. enterica PgA 2			
S. enterica SI			
S. enterica KI			

Таблиця 3 – Результати досліджень з музейними штамами

Штами	sopE	sodC1	gipA
S. Abortusovis 372			
S. Adabraka 1			
S. Choleraesuis 9			
S. Choleraesuis 370			
S. Choleraesuis TC-177			
S. Dublin 373			
S. Gallinarum Pullorum 941			
S. Gallinarum Pullorum K			
S. Gallinarum Pullorum Петелінський			
S. Gallinarum Pullorum Ставропольський			
S. Typhimurium 3			
S. Typhimurium 141			
S. Typhimurium 144			
S. Typhimurium 371			



– позитивний зразок
– негативний зразок

Загалом із трьох генів найбільш поширеним серед усіх досліджуваних об'єктів виявився ген *sopE*, який кодує ефекторний білок бактеріальної системи секреції 3 типу і бере участь в механізмах інвазії.

1. Ген *gipA* було виявлено у 1 польового штаму із 30 досліджуваних та у 4 із 14 штамів колекції НЦШМ, що загалом становило 11% від усіх досліджуваних штамів.

2. Виявлено ген *sopE* у 26 із 30 польових штамів та 5 із 14 штамів НЦШМ – 70,5 %.

3. Виявлено ген *sodC1* у 17 із 30 польових штамів та у 5 із 14 штамів НЦШМ – 50 %.

Висновки. З огляду на отримані результати, можна зробити висновок, що гени помірних бактеріофагів є досить поширеними як серед музейних, так і серед польових штамів, виділених

у птахогосподарствах. При чому серед польових ці гени зустрічаються частіше. З одного боку це дозволяє відрізнити штами між собою та говорити про різні шляхи занесення їх у господарство. А також про підсилену патогенність бактерій, що є носіями зазначених вище генів. Однак сама наявність гена, що кодує фактори патогенності, ще не свідчить про його експресію. Тому на основі таких результатів ще зарано говорити про рівень патогенності досліджуваних штамів.

Отже, на нашу думку, необхідно провести дослідження патогенності штамів, які є носіями вибраних нами генів, а також дослідити наявність лізогенних властивостей.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 / EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) // EFSA Journal. – 2015. – Vol. 13, № 12 (4329). – P. 1–191.
2. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013 / EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) // EFSA Journal. – 2015. – Vol. 13, № 1 (3991). – P. 1–165.
3. Salmonellosis // OIE. Terrestrial Manual. –2010. – Chapter 2.9.9. – P. 1–19.
4. The prevalence and PCR detection of Salmonella contamination in raw poultry / P. Whyte, K. Mc Gill, J.D. Collins, E. Gormley // Veterinary Microbiology. – 2002. – Vol. 89, № 1. – P. 53–60.
5. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности / Д.Г. Ахметова, Ж.А. Бердыгулова, Е.Б. Евтыхова, А.В. Шустов // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 1. – С. 3–24.
6. Ochman H. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation / H. Ochman, J.G. Lawrence, E.A. Groisman // Nature. – 2000. –Vol. 405 (6784). – P. 299–304.
7. Шевченко Т.П. Віруси мікроорганізмів / Т.П. Шевченко, І.Г. Будзанівська, В.П. Поліщук // Курс лекцій: навч. посібник. – К.: ДП «Видавничий дім «Персонал», 2013. – 150 с.
8. Galan J.E. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines / J.E. Galan, H. Wolf-Watz // Nature. – 2006. – Vol. 444 (7119). – P. 567–573.
9. Salmonella phages and prophages: genomics, taxonomy, and applied aspects. / A.I. Switt, A. Sulakvelidze, M. Wiedmann [et al.] // Methods Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1225. – P. 237–287.
10. Bossi L. Prophage arsenal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / L. Bossi, N. Figueroa-Bossi // Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology / Eds.: M.K. Waldor, D.I. Friedman, S.L. Adhya. – Washington: ASM Press, 2005. – P. 165–186.
11. Stanley T.L. Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar typhimurium survival in Peyer's patches / T.L. Stanley, C.D. Ellermeier, J.M. Slauch // Journal Bacteriology. – 2000. – Vol. 182, № 16. – P. 4406–4413.
12. Wagner P.L. Bacteriophage control of bacterial virulence / P.L. Wagner, M.K. Waldor // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70, № 8. – P. 3985–3993.
13. Identification of GtgE, a Novel Virulence Factor Encoded on the Gifsy-2 Bacteriophage of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium / T.D. Ho, N. Figueroa-Bossi, M. Wang [et al.] // Journal Bacteriology. – 2002. – Vol. 184, № 19. – P. 5234–5239.
14. Figueroa-Bossi N. Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. / N. Figueroa-Bossi, L. Bossi // Molecular Microbiology. – 1999. – Vol. 33, № 1. – P. 167–176.
15. Isolation and characterization of *Salmonella enterica* in day-old ducklings in Egypt / Osman K.M., Marouf S.H., Zolnikov T.R., AlAtfeehy N. // Pathogens and Global Health. – 2014. – Vol. 108, № 1. – P. 37–48.
16. Detection of virulence-associated genes in Salmonella Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil / K.A. Borges, T.Q. Furian, A. Borsoi [et al.] // Pesquisa Veterinária Brasileira. – 2013. – Vol. 33, № 12. – P. 1416–1422.

REFERENCES

1. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014 / EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) // EFSA Journal. – 2015. – Vol. 13, № 12 (4329). – P. 1–191.
2. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013 / EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) // EFSA Journal. – 2015. – Vol. 13, № 1 (3991). – P. 1–165.
3. Salmonellosis // OIE. Terrestrial Manual. –2010. – Chapter 2.9.9. – P. 1–19.
4. The prevalence and PCR detection of Salmonella contamination in raw poultry / P. Whyte, K. Mc Gill, J.D. Collins, E. Gormley // Veterinary Microbiology. – 2002. – Vol. 89, № 1. – P. 53–60.
5. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности / D.G. Ahmetova, Zh.A. Berdygulova, E.B. Evtyhova, A.V. Shustov // Biotechnologija. Teorija i praktika. – 2012. – № 1. – S. 3–24.
6. Ochman H. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation / H. Ochman, J.G. Lawrence, E.A. Groisman // Nature. – 2000. –Vol. 405 (6784). – P. 299–304.
7. Shevchenko T.P. Virusy mikroorganizmiv / T.P. Shevchenko, I.G. Budzanivs'ka, V.P. Polishhuk // Kurs lekcij: navch. posibnyk. – K.: DP «Vydavnychyj dim «Personal», 2013. – 150 s.
8. Galan J.E. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines / J.E. Galan, H. Wolf-Watz // Nature. – 2006. – Vol. 444 (7119). – P. 567–573.

9. Salmonella phages and prophages: genomics, taxonomy, and applied aspects. / A.I. Switt, A. Sulakvelidze, M. Wiedmann [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 1225. – P. 237–287.
10. Bossi L. Prophage arsenal of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / L. Bossi, N. Figueroa-Bossi // *Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology* / Eds.: M.K. Waldor, D.I. Friedman, S.L. Adhya. – Washington: ASM Press, 2005. – P. 165–186.
11. Stanley T.L. Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar typhimurium survival in Peyer's patches / T.L. Stanley, C.D. Ellermeier, J.M. Schlauch // *Journal Bacteriology.* – 2000. – Vol. 182, № 16. – P. 4406–4413.
12. Wagner P.L. Bacteriophage control of bacterial virulence / P.L. Wagner, M.K. Waldor // *Infection and Immunity.* – 2002. – Vol. 70, № 8. – P. 3985–3993.
13. Identification of GtgE, a Novel Virulence Factor Encoded on the Gifsy-2 Bacteriophage of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium / T.D. Ho, N. Figueroa-Bossi, M. Wang [et al.] // *Journal Bacteriology.* – 2002. – Vol. 184, № 19. – P. 5234–5239.
14. Figueroa-Bossi N. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. / N. Figueroa-Bossi, L. Bossi // *Molecular Microbiology.* – 1999. – Vol. 33, № 1. – P. 167–176.
15. Isolation and characterization of *Salmonella enterica* in day-old ducklings in Egypt / Osman K.M., Marouf S.H., Zolnikov T.R., AlAtfeehy N. // *Pathogens and Global Health.* – 2014. – Vol. 108, № 1. – P. 37–48.
16. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil / K.A. Borges, T.Q. Furian, A. Borsoi [et al.] // *Pesquisa Veterinária Brasileira.* – 2013. – Vol. 33, № 12. – P. 1416–1422.

Выявление и анализ распространенности генов умеренных бактериофагов у штаммов *Salmonella enterica*

Н. М. Рубленко, О. Н. Дерябин, А. М. Головкин, Н. Г. Пинчук

Приведены данные по выявлению генов умеренных бактериофагов у полевых штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в период 2014–2016 годов в промышленных птицеводческих хозяйствах на территории Украины. А также у музейных штаммов из коллекции Национального центра штаммов микроорганизмов (Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов). Для исследования были выбраны 3 гена умеренных бактериофагов семейств *Siphoviridae* и *Myoviridae*, кодирующие факторы патогенности у сальмонелл. По результатам проведенных исследований установлено, что ген *gipA* присутствует у 11 % всех исследуемых штаммов, *sodC1* – у 25 %. Ген *sopE* – обнаружен у 70,5 % штаммов. Также установлено, что среди полевых штаммов данные гены встречаются чаще.

Ключевые слова: сальмонелла, гены, бактериофаги, факторы патогенности, штаммы, птицы.

Determination and analysis of temperate phage genes proliferation in strains of *Salmonella enterica*

N. Rublenko, O. Deriabina, A. Golovko, N. Pinchuk

The occurrence of salmonellosis is growing every year which causes a great loss for agricultural industry. Mostly it's referred to the poultry farming since the most common source of the infection is chicken meat, eggs and egg-containing products. Thereby there is urgency to find the ways to control effectively the epizootic context of salmonellosis.

The virulence factors in *Salmonella* are proteins, toxins and other specific substances which provide colonization, adhesion, invasion and mechanisms of resistance to phagocytosis in the host cells. The genes coding these traits are located within chromosomes of large plasmids. Routinely the virulence coding genes (virulence genes) interact with each other and are regulated mutually.

The acquirement of virulence genes can be caused by permanent circulation of *Salmonella* in the environment. One more source of the virulence genes acquirement is infection with the temperate bacteriophages. The result of that is entry the genes which can augment both invasion and virulence traits to the genome of bacteria. The temperate phages of *Siphoviridae* family (Gifsy-1, Gifsy-2) are commonly occurred in *Salmonella*. Gifsy-1 contribute the potential virulence gene, the most important of them is *gipA*. The expression of *gipA* determine the colonization of small intestine, and its deletion leads to reduced virulence. The reason of that can be explained as the carrying *gipA* can give the ability to persist within Peyer's patches. Similar effect on the bacterial virulence has the gene *sodC1* of the prophage Gifsy-2. The product of his expression is Cu, Zn-superoxide dismutases. The are the virulence factor in salmonellas and can increase virulence fivefold. In addition there is strict mutuality between these two bacteriophages. If Gifsy-2 is presented in the salmonella genome, Gifsy-1 does not show up. However Gifsy-2 can strengthen the pathogenicity of bacteria if Gifsy-2 is absent and gene *sodC1* is integrated into the chromosome.

Thus genes of temperate phages can influence the virulence of salmonella. The research of their distribution within strains which circulate at poultry farms is important for finding the way to control epizootic situation of salmonellosis.

The main purpose of the present research was to detect the genes of temperate phages (*sopE*, *sodC1*, *gipA*) within strains of *Salmonella enterica*.

30 field strains of *Salmonella* genus obtained from several poultry farms in Ukraine have been researched. As well as 14 strains from National Center of the Strains (State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms).

Lyophilized strains and the strains in the semi liquid agar were cultivated in the Nutrient broth at the 37° during 24 hours. After that all strains were streaked on the plates with XLD media (Xylose Lysine DExoxycholate, Himedia, India).

In 24 hours 1–2 colonies were picked and used for DNA extraction using commercial kit “DNK-sorb-B” (Amplisense, Russia). The polymerase chain reaction was conducted using thermocyclers “Tercyk” (DNK-technologie, Russia) and “T1” (Biometra, Germany).

As a result the most prevalent gene of all three was *sopE* gene coding effector protein of T3SS1 which takes part in invasion mechanisms.

Gene *GipA* was found in 1 field strain (of 30 researched) and in 4 of 14 strains from the Collection of National Center of the Strains. The general percentage of *gipA* prevalence in the present research was 11 %.

Gene *sopE* was found in 70.5 % of the strains (26 of the 30 field strains and 5 of 14 strains from the Collection).

Gene *sodC1* was found in 50 % of all strains (17 of the 30 field strains and 5 of 14 strains from the Collection).

The next step of our research must be the study of virulence of the strains carrying these 3 genes. And also the study of their lysogenic traits.

Key words: salmonella, genes, bacteriophages, factors pathogenicity, strains, poultry.

Надійшла 27.05.2016 р.