

# Występowanie zgrupowania spv na dużym plazmidzie zjadliwości u *S. Enteritidis* izolowanych od drobiu

GRZEGORZ MADAJCZAK, DANUTA KLIMUSZKO, MAGDALENA RZEWUSKA,  
BORYS BŁASZCZAK, ZBIGNIEW FAFIŃSKI\*, MARIAN BINEK

Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,  
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

\*Zakład Higieny Weterynaryjnej w Warszawie, Oddział w Płocku, ul. Piękna 6, 09-402 Płock

Madajczak G., Klimuszko D., Rzewuska M., Błaszczak B., Fafiński Z., Binek M.

## Distribution of plasmid encoded spv genes among poultry isolates of *Salmonella* Enteritidis

### Summary

The plasmid-encoded spv virulence genes common to the *Salmonella enterica* subspecies 1 have been correlated with systemic salmonellosis. The spv region consists of spvABCD, which are transcribed as an operon. They are found in a broad spectrum of serovars of *Salmonella* adapted to different animal species. The exact mechanism by which the spv genes increase the growth rate within host macrophages is not known. The present study was undertaken to determine the frequency of plasmid-encoded spv gene occurrence among *S. Enteritidis* strains isolated from poultry. The study involved 70 strains of *S. Enteritidis*. SpvR and/or spvD genes detected by PCR method were found in about 80% of the tested strains. Both spvR and spvD genes were present in 54% of the isolates. About 21% of *S. Enteritidis* demonstrated only spvR and 12.5% only spvD genes. The molecular size of isolated *Salmonella* plasmids were compared to those from *Y. enterocolitica*.

**Keywords:** *Salmonella*, plasmid, spv, pathogenesis, poultry

Pałeczki *Salmonella* posiadające plazmid zjadliwości mają zdolność wywoływania zakażenia systemowego na skutek ułatwionego namnażania się bakterii wewnątrz komórek fagocytykujących, głównie makrofagów (5, 6, 7). Czynniki determinujące ujawnienie się takich właściwości zakodowane są w genach wysoce konserwatywnego odcinka o wielkości około 8 kB, w którym zlokalizowany jest region zjadliwości nazywany zgrupowaniem spv, złożonym z 5 ramek odczytu spvR, spvA, spvB, spvC i spvD (2, 3). Występuje on u wszystkich *Salmonella enterica* podgatunku I, III i VII. Plazmid niosący zgrupowanie genów operonu spvABCD występuje u wielu różnych serotypów *Salmonella* podgatunku I, których cechą wspólną jest inwazyjność, zwiększona zjadliwość i zdolność do namnażania się w makrofagach wątroby i śledziony. Geny spv różnych serotypów wykazują wysoką homologię. Kontrolę nad ekspresją spv sprawują dwa bakteryjne czynniki. Jednym jest chromosomalny czynnik RpoS, będący podjednostką sigma polimerazy RNA. Zarządza on różnymi genami indukowanymi w fazie stacjonarnej. Powoduje także indukcję drugiego regulatora, którym jest SpvR, kodowany przez gen spvR zlokalizowany na plazmidzie zjadliwości. Białko SpvR zaliczane jest do rodziny prokariotycznych białek regulatorowych Lys R/Met R aktywatorów transkrypcji. Obydwa czynniki RpoS i SpvR indukują transkrypcję genów spvABCD. Gen spvR podlega transkrypcji niezależnie od strukturalnych genów spvABCD. Jego produkt wiąże się z promotorami genów struktu-

ralnych jest bowiem niezbędny do ich ekspresji (14). Filogenetyczna analiza materiału genetycznego *Salmonella* wykazała, że region spv został włączony stosunkowo niedawno, już po ustaleniu się gatunku *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* i występuje niemal u wszystkich naturalnych izolatów dobrze zaadaptowanych do gospodarzy, takich jak *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum*, *S. Abortusovis* i innych. Nie stwierdza się go u *S. Typhi* (2). Z różną częstością występuje natomiast u *Salmonella Typhimurium* i *S. Enteritidis*, które pasożytują u szerokiego spektrum gospodarzy (5, 11). W naturalnych zakażeniach drogą pokarmową, pałeczki *Salmonella* wnikają do komórek nabłonka jelitowego oraz komórek M niezależnie od mechanizmów zakodowanych w plazmidzie. Nie jest on zatem niezbędny do powstania i rozwoju zakażenia w jelicie, jednakże liczne dane przekonują o tym, że obecne na nim geny spv decydują o namnażaniu się *Salmonella* zarówno w makrofagach obecnych w układzie limfatycznym jak i w tkankach, a także w makrofagach świeżo uwolnionych ze szpiku, co decyduje o systemowym rozwoju zakażenia (5, 6, 7, 10). Celem badań było określenie występowania operonu spv na dużym plazmidzie u szczepów *S. Enteritidis* izolowanych od drobiu.

### Materiał i metody

**Szczepy.** Do badań użyto 70 szczepów *Salmonella Enteritidis* izolowanych z materiału klinicznego od drobiu w laboratorium bakteriologicznym WZHW oddział w Płocku.

ku oraz w laboratorium bakteriologicznym Zakładu Bakteriologii i Biologii Molekularnej Wydz. Med. Wet. SGGW. Izolację i identyfikację pałeczek *Salmonella* przeprowadzono zgodnie z instrukcją nr 4/99 Głównego Lekarza Weterynarii. Szczepy przechowywano w temp. 4°C oraz zamrożone w -70°C z dodatkiem 13% glicerolu.

**Izolacja DNA plazmidowego.** Izolację przeprowadzano metodą lizy alkalicznej. W tym celu 200 ml 18-godz. hodowli *Salmonella* na podłożu LB odwirowano przy 7 tys. rpm. przez 15 min. Osad bakteryjny zawieszono w 4 ml buforu I o składzie: 50 mM glukoza, 10 mM EDTA (pH = 8,0), 25 mM Tris-HCl z dodatkiem lizozymu w ilości 1 mg/ml. Zawiesinę inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej, a następnie dodano 8 ml buforu II o składzie: 1% SDS, 0,2 M NaOH. Po delikatnym wymieszaniu inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej, po czym dodano 6 ml lodowatego buforu III (3 M octan potasu). Po delikatnym wymieszaniu i inkubacji przez 10 min. w temperaturze pokojowej, całość odwirowano przy 15 tys. rpm. przez 15 min. Supernatant przefiltrowano, a następnie zmieszano w stosunku 1 : 1 z alkoholem izopropylowym, w celu wytrącenia DNA. Następnie próbkę odwirowano przy 15 tys. rpm. przez 30 min., a osad zawieszono w 4 ml buforu TE (10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 1 mM EDTA pH = 8,0). Próbkę odbiałczano przez dwukrotne mieszanie z fenolem w stosunku 1 : 1, a następnie z mieszaniną fenolu i chloroformu 1 : 1. Po odwirowaniu przy 3 tys. rpm. przez 5 min. zebrano górną frakcję wodną i wytrącano DNA przez zmieszanie z alkoholem etylowym w stosunku 1 : 2 – inkubowano w -20°C przez noc. Po odwirowaniu w 15 tys. rpm. przez 30 min. próbkę zawieszono w 50 µl buforu TE.

**PCR.** Do amplifikacji genów *spv* jako matrycy użyto DNA pochodzący ze zlizowanych termicznie komórek bakteryjnych (1 ml 18-godzinnej hodowli w bulionie LB ogrzano w temperaturze 100°C przez 5 min.). Startery do PCR (przedstawione w tab. 1) zostały dobrane na podstawie opublikowanych sekwencji nukleotydów zgrupowania *spv* zlokalizowanych na plazmidzie wirulencji (1, 9).

Tab. 1. Sekwencje starterów użytych do amplifikacji genów *spvR* i *spvD*

Starter	sekwencja 5'→3'
SpvR1	AAAAAGGTCACCGCCATCCTG
SpvR2	CAGAAGGTGGACTGTTTCAGTTCC
SpvD1	GGTAAAATTACATAAGCAAGAGC
SpvD2	CCTGCAGACATTATCAGTCTTCAGG

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 10×PCR-bufor (Fermentas, Litwa) 5 µl, MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Litwa) 3 µl, dNTP (Fermentas, Litwa) 5 µl, matryca DNA 10 µl, primer *spv*<sub>1</sub> (DNA Gdańsk, Polska) 3 µl, *spv*<sub>2</sub> (DNA Gdańsk, Polska) 3 µl, polimerazy Taq (Fermentas, Litwa) 1 µl. Wstępną denaturację przeprowadzano w temp. 94°C przez 2 min. Następnie program składał się z 35 cykli: złożonych z etapów: denaturacja DNA przez 30 sek. w temp. 94°C, wiązanie starterów przez 30 sek. w temp. 56°C, wydłużanie DNA przez 30 sek. w temp. 72°C. Końcowe wydłużanie zachodziło w temp. 72°C przez 10 min.

Do amplifikacji genu *rpoS*, jako matrycy użyto DNA pochodzącego ze zlizowanej hodowli *Salmonella*, jak w doświadczeniu powyżej. Startery do PCR dobrane na podstawie opublikowanej sekwencji genu *rpoS* pochodzącego z genomu *S. Typhimurium*:

- 5'-GCGCGTCGCGCACTGCGTGG- 3';
- 5'-CTGGCCAGCACTTCACGCTG- 3' (4).

**Elektroforeza DNA.** Rozdziału DNA dokonano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy napięciu 10 V/cm żelu.

## Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonej reakcji amplifikacji z użyciem sekwencji startowych dla genu *spvR* stwierdzono jego występowanie u 53 szczepów na 67 przebadanych. Dodatkowo u 3 szczepów, których nie badano na obecność genu *spvR* wykryto sekwencje genu

Tab. 2. Występowanie genów *spvR* i *spvD* zgrupowana *spv* wśród *S. Enteritidis* izolowanych od drobiu

Geny		Liczba szczepów	Odsetek (%)
<i>spvR</i>	<i>spvD</i>		
+	+	13	54
+	-	5	21
-	+	3	12,5
-	-	3	12,5

*spvD*, co w sumie dawało dodatni wynik PCR u 56 na 70 szczepów *Salmonella Enteritidis* (80%). Wśród 24 szczepów, u których jednocześnie poszukiwano obu wyżej wymienionych genów, uzyskano wyniki zamieszczone w tab. 2. Obydwie sekwencje

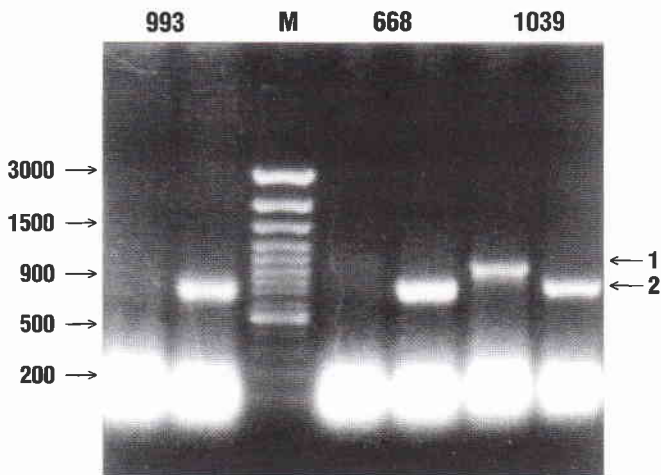
występowały u 13 szczepów, wyłącznie *spvR* u 5 szczepów, *spvD* u 3 szczepów, a u 3 szczepów nie wykryto żadnej z wymienionych sekwencji.

Z każdej z uzyskanych grup szczepów, wybrano losowo pojedyncze izolaty i wykonano PCR z użyciem sekwencji starterowych dla genu *rpoS*, uzyskując w każdym przypadku wynik dodatni. Potwierdzono tym samym występowanie wspomnianego genu u badanych pałeczek *Salmonella*.

Z trzech szczepów, w których metodą PCR stwierdzono obecność genów *spvR* i *spvD* izolowano plazmidy metodą lizy alkalicznej i ponownie przeprowadzono PCR używając jako matrycy wyizolowany DNA, co obrazuje ryc. 1. Potwierdzono tym samym występowanie poszukiwanego operonu *spv* na plazmidzie.

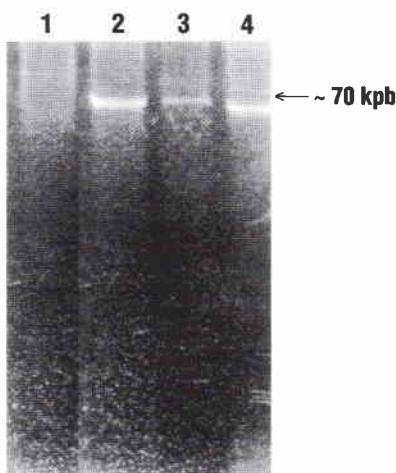
W celu ustalenia wielkości wyizolowanego ze szczepów *S. Enteritidis* 668 i 1039 DNA plazmidowego, porównano je na żelu do dużego plazmidu pYVe227 (70 kB) jedyne występującego u wzorcowego szczepu *Yersinia enterocolitica*. Po elektroforezie uzyskano prążki obrazujące plazmidowy DNA *Salmonella* na podobnej wysokości co plazmidowy DNA *Yersinia* (ryc. 2), chociaż wydaje się, że nie są one dokładnie tej samej wielkości – fragment obrazujący DNA szczepu 1039 znajduje się nieco niżej niż fragment DNA szczepu 668.

Występowanie operonu *spv* oceniane na podstawie reakcji amplifikacji stwierdzono u 80% badanych szczepów *S. Enteritidis* izolowanych od drobiu. Obec-



Ryc. 1. Wynik amplifikacji plazmidowych genów spvR (ścieżka 6) i spvD (ścieżka 2, 5, 7) w szczepach *S. Enteritidis* 668, 993, 1039. Ścieżka M zawiera Gene Ruller 100bp Ladder Plus (Fermentas, Litwa). Strzałki wskazują wielkość swoistych produktów PCR: 1) spvR- 897bp, 2) spvD- 720bp

ność jednocześnie genu spvR i spvD wykazano u 54% izolatów. Gen spvR kodujący białko SpvR tworzące bezpośrednie połączenie z DNA genu spvA, pozostaje pod kontrolą genu rpoS zlokalizowanego w chromosomie bakteryjnym. Zatem wydaje się, że plazmidowy region spv pozostaje pod kontrolą genów chromosomalnych (14). U losowo wybranych szczepów *Salmonella* posiadających lub nie posiadających geny spvR i spvD w każdym przypadku potwierdzano metodą PCR obecność genu rpoS (wyniki niezamieszczone). Występowanie niekompletnego zgrupowania genów spv u niektórych izolatów *S. Enteritidis*, a w szczególności brak genu spvR stawia pod znakiem zapytania rolę genów operonu spv wobec braku genu regulatorowego. Na podstawie porównania sekwencji aminokwasowej białka SpvB stwierdzono jego homologię do innych znanych ADP-rybozylotransferaz. Wiadomo, że oczyszczony C-terminalny fragment białka SpvB powodował rybozylację 40 kD białka w lizacie komórek linii Jurkat *in vitro* (12). Być może podobnym zmianom polegającym na inaktywacji poprzez ADP-rybozylację podlega białko wytwarzane przez makrofagi, odpowiedzialne za zabijanie pałeczek *Salmonella*, czym należy tłumaczyć przeżywanie zarazków w komórkach eukariotycznych. Wy-



Ryc. 2. DNA plazmidowy izolowany ze szczepu *S. Enteritidis* 668 (ścieżka 3), 1039 (ścieżka 4), w których metodą PCR stwierdzono obecność genów spvR i spvD. Dla porównania (ścieżka 2) DNA plazmidu pYVe227 *Yersinia enterocolitica*. Ścieżka 1 – szczep *S. Enteritidis* bez plazmidu

stępowanie różnych form i postaci salmonelozy u drobiu w następstwie zakażenia *S. Enteritidis* może wynikać z faktu posiadania bądź braku dużego plazmidu zjadliwości oraz różnego składu genów w operonie spv. Szczepy *Salmonella* izolowane od człowieka z krwi, zwykle posiadają duży plazmid zjadliwości, natomiast szczepy występujące wyłącznie w jelicie są go pozbawione, co wskazywałoby na potencjalną jego rolę w wywoływaniu zakażeń uogólnionych u człowieka, a być może także u zwierząt (5, 11). Nie wyklucza się, że *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis* i *S. Dublin* uzyskały duży plazmid od szczepów *S. Typhimurium* (2, 13). Plazmidy bakteryjne jako stosunkowo niewielkie elementy genetyczne ulegają dość łatwo procesowi rekombinacji, co sprawia, że niesione przez nie geny są tracone częściej niż geny zlokalizowane w chromosomie. Procesowi temu mogły podlegać plazmidy zjadliwości uzyskane przez wyżej wymienione serotypy *Salmonella*. Te zmiany genetyczne, którym ulegają plazmidy, mogą determinować adaptację poszczególnych serotypów pałeczek *Salmonella* do określonego gospodarza (8).

## Piśmiennictwo

1. Aabo S., Brown D. J., Olsen J. E.: Virulence characterization of a strain of *Salmonella enterica* subspecies houten (subspecies IV) with chromosomal integrated *Salmonella* plasmid virulence (spv) genes. Res. Microbiol. 2000, 151, 183-189.
2. Boyd E. F., Haarti D. L.: *Salmonella* virulence plasmid: Modular acquisition of the spv virulence region by F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. Genetics 1998, 149, 1183-1190.
3. Chu Ch., Hong S., Tsai Ch., Lin W., Liu T., Ou J. T.: Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Enteritidis, Choleraesuis and Dublin. Infect. Immun. 1999, 67, 2611-2614.
4. Fang F. C., Libby S. J., Buchmeier N. A., Loewen P. C., Switala J., Harwood J., Guiney D. G.: The alternative  $\sigma$  factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 11978-11982.
5. Fierer J., Krause M., Tauxe R., Guiney D.: *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. J. Infect. Dis. 1992, 166, 639-642.
6. Guilloteau L., Wallis T. S., Gautier A. V., MacIntyre S., Platt D. J., Lax A. J.: The *Salmonella* plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of Macrophages and influences inflammatory responses. Infect. Immun. 1996, 64, 3385-3393.
7. Gulig P. A., Doyle T., Hughes J., Matsui H.: Analysis of host cells associated with the spv-mediated increased intracellular growth rate of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immun. 1998, 66, 2371-2485.
8. Gulig P. A., Danbara H., Guiney D. G., Lax A. J., Norel F., Rhen M.: Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. Mol. Microbiol. 1993, 7, 825-830.
9. Libby S. J., Adams L. G., Ficht T. A., Allen C., Whitford H. A., Buchmeier N. A., Bossie S., Guiney D. G.: The spv genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. Infect. Immun. 1997, 65, 1786-1792.
10. Lu S., Manges A. R., Xu Y., Fang F. C., Riley L. W.: Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* in vivo and in vitro. Infect. Immun. 1999, 67, 5651-5657.
11. Montenegro M. A., Morelli G., Helmut R.: Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence on isolates of defined sources. Microb. Pathog. 1991, 11, 391-397.
12. Otto H., Tezcan-Merdol D., Girisch R., Hag F., Rhen M., Koch-Nolte F.: The spvB gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono (ADP-ribose) transferase. Mol. Microbiol. 2000, 37, 1106-1115.
13. Rodriguez-Pena J. M., Buisan M., Ibanez M., Rotger R.: Genetic map of virulence plasmid of *Salmonella enteritidis* and nucleotide sequence of its replicons. Gene 1997, 188, 53-61.
14. Sheehan B. J., Dorman Ch. J.: In vivo analysis of the interaction of the LysR-like regulator SpvR with the operator sequences of the spvA and spvR virulence genes of *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 1998, 30, 91-105.

Adres autora: lek. wet. Grzegorz Madajczak, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa