

СТАТЬИ

УДК 57.063.8:619:616.9

**ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ АТТЕНУИРОВАННОГО AroA  
МУТАНТНОГО ШТАММА *PASTEURELLA MULTOCIDA***

**Далбаев Н.К., Кайсенов Д.Н., Султанкулова К.Т., Тайлакова Э.Т.,  
Червякова О.В., Алиева А.Б., Абсатова Ж.С., Баракбаев К.Б.**

*РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ),  
пгт. Гвардейский, e-mail: dnk-63@mail.ru*

В исследованиях использовали дикий тип *P. multocida*, выделенный на территории Алматинской области Республики Казахстан от теленка, погибшего во время вспышки пастереллеза. Представлены результаты исследований с целью получения аттенуированного штамма *P. multocida* методом введения ауксотрофных мутаций в ген AroA. Функция данного гена существенна для роста бактерий *in vivo* и для развития инфекционного процесса. Для получения AroA мутантов *P. multocida* были сконструированы две плазмиды, несущие в себе ген AroA с нарушенной функцией. В течение многократных пассажей трансформантов на средах, содержащих канамицин, было отобрано 9 клонов, которые по результатам ПЦР-анализа относились к виду *P. multocida*. При изучении данных клонов на содержание AroA гена мутантного типа ПЦР-продукты размером 1922 п.н. были наработаны в 3 клонах, что указывает на наличие генетической конструкции. Данные клоны изолировали и затем культивировали методом предельных разведений. Полученные единичные колонии высевали на минимальную среду M9, при этом отмечали рост всех исследуемых субклонов. На конечном этапе изучали вирулентность полученных рекомбинантных клонов для белых мышей. По результатам опыта был выбран наименее патогенный клон, который может использоваться в качестве противопастереллезного вакцинного кандидата.

**Ключевые слова:** *Pasteurella multocida*, рекомбинантный, AroA мутант, плаزمид, клон, вирулентность

**OBTAINING A GENETIC ATTENUATED AroA MUTANT  
STRAIN *PASTEURELLA MULTOCIDA***

**Dalbaev N.K., Kaysenov D.N., Sultankulova K.T., Taylakova E.T.,  
Chervyakova O.V., Alieva A.B., Absatova Zh.S., Barakbaev K.B.**

*Research Institute for biological safety problems (RIBSP), Gvardeyskiy, e-mail: dnk-63@mail.ru*

The studies used the wild type *P. multocida* isolated in the Almaty region of the Republic of Kazakhstan from a calf who died during an outbreak of pasteurellosis. The results of studies with the aim of obtaining an attenuated strain of *P. multocida* by introducing auxotrophic mutations into the AroA gene are presented. The function of this gene is essential for the growth of bacteria *in vivo* and for the development of the infectious process. To obtain AroA mutants of *P. multocida*, two plasmids were constructed that carried the AroA gene with impaired function. During repeated passages of transformants on media containing kanamycin, 9 clones were selected, which according to the results of PCR analysis belonged to the species *P. multocida*. When studying these clones for the content of AroA gene of the mutant type, PCR products of 1922 bp in size were obtained in 3 clones, indicating the presence of a genetic construct. These clones were isolated and then cultured using the limiting dilution method. The obtained single colonies were seeded on M9 minimal medium, while the growth of all studied subclones was noted. At the final stage, the virulence of the obtained recombinant clones for white mice was studied. According to the results of the experiment, the least pathogenic clone was selected, which can be used as an anti-pasteurellosis vaccine candidate.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*, recombinant, AroA mutant, plasmid, clone, virulence

Пастереллез – высококонтагиозное заболевание многих видов сельскохозяйственных, синантропных и диких животных, пушных зверей и птиц с высокой летальностью и тенденцией к стационарности. Решение проблемы борьбы с пастереллезом осложняется тем, что патогенные пастереллы длительное время сохраняются в организме не только переболевших и бывших с ними в контакте здоровых животных, но и в организме синантропных животных и птиц, создавая таким образом стационарный эпизоотический очаг [1–3]. Ежегодная регистрация пастереллеза у животных сви-

детельствует о напряжённости эпизоотической и эпидемической ситуации по данному заболеванию.

Таким образом, широкое географическое распространение пастереллеза, восприимчивость к нему всех видов домашних животных, многих диких млекопитающих и птиц, а также значительный ущерб, наносимый им отдельным животноводческим хозяйствам и даже целым районам, требует совершенствования лечебно-профилактических мероприятий [4].

Основным методом контроля пастереллеза является вакцинация с использованием

адьювантных вакцин, содержащих инактивированные бактерии вида *P. multocida*. Недостатком данных вакцин является краткосрочность создаваемого ими иммунитета (менее 6 мес.) и необходимость ревакцинации для индукции необходимого протективного эффекта [5]. При этом отмечено, что данный тип препаратов предохраняет только от гомологичных серотипов *P. multocida*.

Использование в составе препаратов масляных адьювантов, значительно повышающих иммуногенность инактивированных вакцин, приводит к увеличению числа поствакцинальных осложнений, что связано с высокой вязкостью масел и большим количеством инактивированных бактериальных клеток ( $10^{10}$ – $10^{11}$  микробных клеток) [6]. Несмотря на разработку новых масляных адьювантов со сниженной вязкостью, препараты на их основе не нашли широкого применения в связи со значительным повышением стоимости вакцин [7].

Живые слабовирулентные вакцины в сравнении с инактивированными, а также с живыми авирулентными пастереллами, обладают выраженной иммуногенностью и более эффективны как вакцина [8]. Преимуществом таких вакцин, помимо их высокой эффективности, является возможность их аэрозольного применения, что обеспечивает проведение массовых вакцинаций в короткие сроки в промышленном птицеводстве с минимальными затратами [9].

В настоящее время за рубежом созданы и проходят испытания живые вакцины против пастереллеза крупного рогатого скота, свиней, кроликов, птицы [10]. Основа таких вакцинных препаратов – аттенуированные штаммы возбудителя, полученные различными путями, в том числе – индуцированного мутагенеза и дальнейшего отбора мутантных производных возбудителя, устойчивых к антибиотикам. Антибиотики устойчивые генетические маркеры позволяют дифференцировать вакцинные штаммы от полевых. Данный метод аттенуации имеет недостаток, связанный с высоким риском возврата к вирулентной форме [11].

В литературных источниках приводится альтернативный метод, обусловленный введением определенных ауксотрофных мутаций в ген *AroA* вирулентных штаммов пастерелл, что делает их авирулентными. Функция данного гена существенна для роста бактерий *in vivo* и для развития инфекционного процесса. На основе данного метода создан ряд коммерческих препаратов для профилактики пастереллеза КРС, буйволов и кур. Вакцинация *AroA* мутантными штаммами пастерелл приводит к невоспри-

имчивости к заражению как гомологичными, так и гетерологичными штаммами *P. multocida* [12].

Цель данного исследования – получение генетически аттенуированного *AroA* мутантного штамма *Pasteurella multocida*.

#### Материалы и методы исследования

В работе использовали дикий тип *P. multocida*, выделенный на территории Алматинской области Республики Казахстан от теленка, погибшего во время вспышки пастереллеза. Указанный штамм пастерелл выращивали на средах Brain Heart Infusion Agar (BHIA) и Brain Heart Infusion Broth (BHIB) при 37°C в течение 18–20 ч. Дикий тип *P. multocida* в дальнейшем использовали для получения *AroA* вакцины.

Репрезентативные колонии *P. multocida* высевали на BHIB без антибиотиков и выращивали при 30°C в течение 16 ч. Проводили три 16 часовых последовательных пассажа культуры в 5 мл среды бульона BHIB и инкубировали при 30°C, что способствует удалению плазмиды. Культуру объеме 10 мкл высевали на BHIA и инкубировали при 37°C в течение 16 ч для изоляции колоний. Канамицин-чувствительные колонии анализировали с помощью ПЦР с *P. multocida* *AroA* парами праймеров, с целью исключения наличия данных вставок.

Канамицин-резистентные колонии высевали на среду M9, содержащую: фосфатный буфер, 1 м MMgSO<sub>4</sub>, 0,1 м MCaCl<sub>2</sub>, 0,2% (w/v) глюкозы и 1,5% (w/v) Нобель агара (Difco), тиамин (10мкг/мл), тирозин, триптофан, фенилаланин (по 40 мкг/мл) и 2,3 дигидробензойная кислота (10мкг/мл). Клоны способные расти на данной среде, относятся к *AroA* мутантам. Штамм *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen) выращивали в бульоне LB, содержащем соответствующие антибиотики (ампициллин, 50 мкг/мл, и канамицин, 40 мкг/мл) в колбах при 150 об/мин, или на чашках с агаром LB в течение ночи при 37°C.

#### Выделение и манипуляция ДНК

Хромосомная ДНК из *P. multocida* была выделена в соответствии *Ausubel* и др. [13]. Во всех манипуляциях использованы стандартные методы молекулярного клонирования, трансформации и электрофореза [14].

#### Получение аттенуированных рекомбинантных *AroA* мутантов *P. multocida*

Для получения *AroA* мутантов *P. multocida* были сконструированы две плазмиды, несущие в себе ген *AroA* с нарушенной функцией. В качестве исходной

была взята нуклеотидная последовательность гена *AroA* штамма PBA100 *P. multocida* (номер в GenBank – Z14100). Кассета, кодирующая резистентность к канамицину, была получена путем вырезания PstI фрагмента размером 1240 п.н. из плазмиды pUC4K (Pharmacia).

Для получения первой плазмиды, которая имеет в качестве маркера ген устойчивости к канамицину, из *AroA*-гена был вырезан участок EcoRV/ClaI размером 302 п.н. (нуклеотиды 932-1233). Затем конструкция, кодирующая устойчивость к канамицину, была вставлена в ген *AroA* по уникальному сайту рестрикции NsiI. В результате получена последовательность, имеющая размер 2565 п.н., которую клонировали в плазмиду pBluescriptII SK(-) по сайтам рестрикции BamHI/PstI.

Для получения безмаркерной мутации из *AroA*-гена был вырезан участок EcoRV/ClaI размером 302 п.н. (нуклеотиды 932-1233). Данная последовательность была клонирована в плазмиду pBluescript II SK(-) по сайтам рестрикции PstI/SmaI.

#### Электропорация

Компетентные бактерии *P. multocida* (50 мкл) были смешаны с 200 нг плазмидной ДНК в кювете для электропорации. Также была взята 1 кювета с компетентными бактериями без добавления плазмидной ДНК. Смесь незамедлительно электропорировали после добавления ДНК (GenePulser; Bio-Rad) при 15,000 V/cm, 800 Ω и 25 мкF с постоянным результирующим временем, составляющим от 7,8 до 8,9 мс. К клеткам добавляли 150 мкл обогащенной среды SOC. Электропорированные клетки восстанавливали в течение 2 ч при 37 °C на шейкере с перемешиванием, после чего рассеивали на ВНИА с содержанием 50 мкг/мл канамицина и инкубировали в течение 24 ч при 30 °C.

Полученные единичные колонии (4–5 шт.) высевали на ВНИВ, содержащий 50 мкг/мл канамицина и инкубировали в течение 18 ч при температуре 30 °C. Полученный материал высевали на ВНИА с канамицином (по 10 мкл на чашку) и инкубировали 16 ч при 40 °C для получения единичных колоний мутантов.

#### ПЦР анализ

Для амплификации последовательностей генов *P. multocida* использовали видоспецифичные праймеры КМТГ7 и КМТГ6, разработанные Townsend и др. [15]. Канамицин-чувствительные колонии анализировали с помощью ПЦР с *P. multocida* *AroA* парами праймеров KanF, KanR

(483 п.н.) и AroAf, AroAr (988 п.н.), с целью исключения наличия данных вставок.

#### Постановка ИФА

Для выявления антител к бактериям *P. multocida* использовали набор Invitrogen «Super Script III One – Step RT – PCR with Platinum Tag»; прямой и обратный праймеры *P. multocida* *AroA*; прямой и обратный праймеры *P. multocida* *Canamisin*. Учет результатов реакции проводили на фотометре при длине волны 405 нм.

#### Определение вирулентности рекомбинантных штаммов

Для определения степени патогенности *AroA* мутантных клонов, использовали белых беспородных мышей 2–3 недельного возраста, живой массой 16–18 г. Для этого их заражали подкожно в область спины в объеме 0,5 см<sup>3</sup> полученными мутантными клонами.

#### Результаты исследований и их обсуждение

Для получения *AroA* мутантов, согласно представленным в литературе методикам [16], требуется проведение многократных пассажей на средах, содержащих канамицин с клонированием канамицин-резистентных мутантов с последующим генетическим анализом. Отбор репрезентативных колоний проводили высевом трансформантов на ВНИА с добавлением 10 мкг/мл канамицина. В результате посева отмечали рост более 200 колоний одного типа. Полученные единичные колонии (80 колоний) пассировали, чередуя жидкую среду ВНИВ и твердую среду ВНИА с добавлением 10 мкг/мл канамицина.

В течение 30 пассажей 71 исследуемых клонов были исключены из экспериментов, так как при потере плазмиды происходила утрата их резистентности к антибиотику, вследствие чего пастереллы утратили способность к росту в канамицин-содержащих средах.

При анализе ПЦР оставшихся 9 клонов установлено, что все клоны относятся к виду *P. multocida* (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что профили ПЦР-продуктов (460 п.н.) клонов *P. multocida*, содержащих *AroA* мутанты соответствовали профилю исходного варианта *P. multocida*.

Клоны *P. multocida*, содержащие *AroA* мутанты проверяли на канамицин-резистентность методом ПЦР (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что профили ПЦР-продуктов (483 п.н.) *P. multocida*, содержащих *AroA* мутанты указывают на соответствие канамицин-резистентности изучаемых клонов.

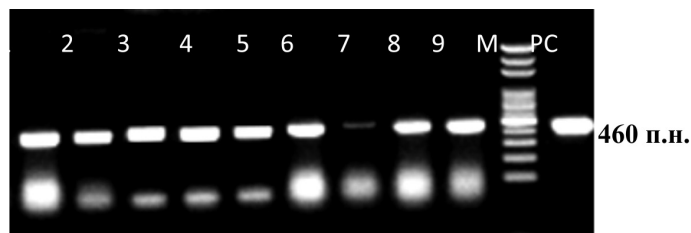


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов клонов *P. multocida*, содержащих *AroA* мутанты: 1 – клон № 4, 2 – клон № 6, 3 – клон № 7, 4 – клон № 8, 5 – клон № 9, 6 – клон № 10, 7 – клон № 11, 8 – клон № 16, 9 – клон № 17, М – маркер, РС – положительный контроль *P. multocida*

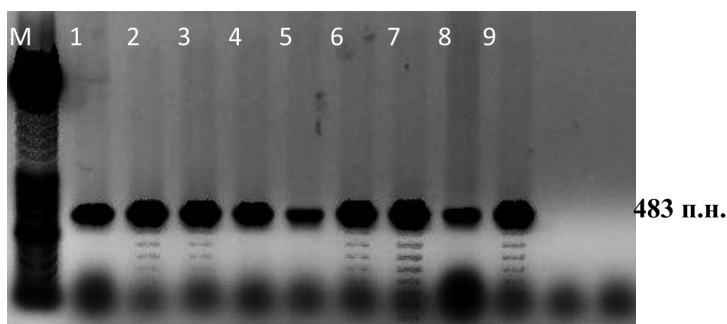


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов клонов *P. multocida*, содержащих *AroA* мутанты на канамицин резистентность: 1 – клон № 4, 2 – клон № 6, 3 – клон № 7, 4 – клон № 8, 5 – клон № 9, 6 – клон № 10, 7 – клон № 11, 8 – клон № 16, 9 – клон № 17, М – маркер, 50 п.н., Invitrogen

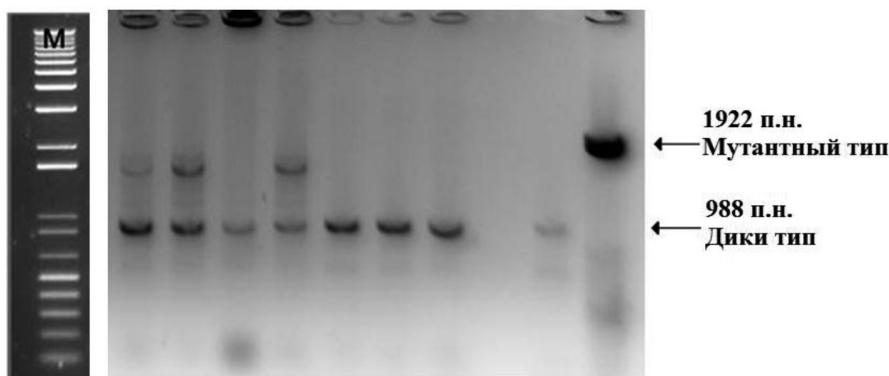


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов *AroA* гена клонов *P. multocida*: 1 – клон № 4, 2 – клон № 6, 3 – клон № 7, 4 – клон № 8, 5 – клон № 9, 6 – клон № 10, 7 – клон № 11, 8 – клон № 16, 9 – клон № 17, М – маркер, 1 kb, Invitrogen, С – контроль *AroA* гена

Клоны *P. multocida* проверены на содержание *AroA* гена дикого типа (988 п.н.) и мутантного типа (1922 п.н.) (рис. 3).

Из данных рис. 3 видно, что ПЦР-продукты mutant type *AroA* гена (1922 п.н.) нарабатаны в клонах № 4, № 6, № 8 *P. multocida*. Указанные клоны рекомбинантов были изолированы и использованы для дальнейших исследований.

По результатам ПЦР анализа получены следующие данные: при анализе на канамицин наблюдается наработка ПЦР продуктов размером 483 п.н.; на КМТ 1 ген – 460 п.н., что свидетельствует о принадлежности исследуемого материала к *P. multocida*. При постановке ПЦР на *AroA* ген выявлено, что при исследовании исходного материала (дикий тип) наработан продукт размером

988 п.н., а при изучении генетически аттенуированного штамма – продукт размером 1922 п.н. Последнее указывает на наличие генетической конструкции, вставленной в ген *AroA P. multocida*.

На следующем этапе проводили клонирование каждого рекомбинанта методом предельных разведений для получения единичных колоний. После чего по 10 колоний каждого рекомбинанта высевали на минимальную среду М9 (канамицин 10 мкг/мл) с добавлением тиамина, тирозина, триптофана, фенилаланина, 2,3-дигидробензойной кислоты, р-гидробензойной кислоты. По истечении 18–20 ч на среде М9 отмечали рост всех исследуемых субклонов.

В дальнейшем проводили изучение вирулентности рекомбинантных клонов *P. multocida* № 4, № 6 и № 8 на мышах (таблица).

Уровень патогенности *AroA* мутантов для мышей

Испытуемый мутант	МЛД 50, м.с.
№ 4	$5,4 \pm 0,9 \times 10^6$
№ 6	$4,5 \pm 0,4 \times 10^8$
№ 8	$3,2 \pm 0,5 \times 10^3$
исходный (дикий тип)	$2,5 \pm 0,7 \times 10$

Как видно из данных таблицы, уровень патогенности для всех испытанных мутантов клонов значительно различался. Наименее патогенным оказался клон № 6 – показатель МЛД 50 при его введении составил  $4,5 \pm 0,4 \times 10^8$  (м.с.). Таким образом, данный клон пригоден для использования в качестве вакцинного штамма.

**Выводы**

1. В результате проведенных исследований получены 3 клона штамма *P. multocida*, содержащего мутантный *AroA* ген.

2. При изучении уровня их патогенности на белых мышах, наименее патогенными свойствами обладал клон № 6.

3. Указанный клон может быть использован в качестве вакцинного штамма-кандидата для профилактики пастереллеза.

**Список литературы**

1. Мека-Меченко В.Г., Некрасова Л.Е., Мека-Меченко Т.В., Лухнова Л.Ю., Куница Т.Н., Избанова У.А., Бегимбаева Э.Ж. Пастереллез животных в Республике Казахстан // Вестник КазНУ. 2014. № 40. С. 156–159.

2. Hamada M., Elshimy N., Abusriwil H. Infective Exacerbation of *Pasteurellamultocida*. Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Infectious Diseases. 2016. Vol. P. 4. DOI: 10.1155/2016/2648349.

3. Nahar Panna S., Hussain Nazir N., Rahman B., Ahmed S., Saroore G., Chakma Sh., Kamal T., Majumder Um-may H. Isolation and molecular detection of *Pasteurellamultocida* Type A from naturally infected chickens, and their histopathological evaluation in artificially infected chickens in Bangladesh. J. Adv. Vet. Anim. Res. 2015. no 2(3). P. 338–345.

4. Gao X., Xiao J.H., Qin H.Y., Cao Z., Wang H.B. Impact of meteorological factors on the prevalence of porcine pasteurellosis in the southcentral of Mainland China. Preventive Veterinary Medicine. 2016. Vol. 125. P. 75–81.

5. Евтыхова Е.Б., Мукантаев К.Н., Турсунов К., Сытник И.И., Карибаев Т.Б., Хасенов Б.Б., Шустов А.Б. Метод выделения ДНК и тест-система ПЦР в реальном времени для диагностики лейкоза крупного рогатого скота. Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 2. С. 78–84.

6. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert Rev Vaccines 2011. Vol. 10. P. 499–511.

7. Ahmada T.A., Rammahb S.S., Sheweitab S.A., Harounb M., El-Sayedc L.H. Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. Vaccine. 2014. Vol. 32. P. 909–917.

8. De Alwis M.C., Carter G.R., Chengappa M.M. Production and characterization of streptomycin dependent mutants of *Pasteurella multocida* from bovine haemorrhagic septicaemia. Journal of Comparative Medicine. 1980. Vol. 44 (4). P. 418–422.

9. Thanasarasakulpong A., Poolperm P., Tankae W. P., Sawada T., Sthitmatee N. Protectivity conferred by immunization with intranasal recombinant outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* serovar A:1 in chickens. Journal of Veterinary Medical Science. 2015. Vol. 77. P. 321–326.

10. Saleem L., Munir R., Ferrari G., Afzal M., Chaudhary F.R. Efficacy and cross-protection of live intranasal aerosol hemorrhagic septicemia vaccine in buffalo calves. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014. Vol. 3. P. 300–307.

11. Vaxsafe PM living Heddleston serotype 1, *aroA* deleted. [Electronic resource]. URL: <http://www.bioproperties.com.au/vaccines/documents/LFT-PM-V1.pdf> (date of access: 21.02.2020).

12. Once PMH SQ *Pasteurella Haemolytica* and *Pasteurella Multocida* Vaccine. Avirulent Live Cultures. [Electronic resource]. URL: [http://www.merck-animal-health-usa.com/products/130\\_120699/product\\_details\\_130\\_121214.aspx](http://www.merck-animal-health-usa.com/products/130_120699/product_details_130_121214.aspx) (date of access: 21.02.2020).

13. Ausubel F.A., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1989.

14. Bryksin A.V., Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. Bio-techniques. 2010. Vol. 48. 463 p. DOI: 10.2144/000113418.

15. Townsend K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M., Dawkins H.J. Development of PCR assays for species and type – specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. Clin. Microbiol. 1998. Vol. 36(4). P. 1096–1100.

16. Noriega F.R., Wang J.Y., Losonsky G., Maneval D.R., Hone D.M., Levine M.M. Construction and characterization of attenuated *AroA* AvirG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. infect. Immun. 1994. Vol. 62. P. 5168–5172.