

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ САЛЬМОНЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШЕК В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Костенко М.К., Богданович К.В., Слипень В.В.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, г.Минск*

Ключевые слова: сальмонеллы, сальмонеллез, генетическое типирование, RAPD-ПЦР, ERIC-ПЦР

Резюме: *С использованием метода RAPD-ПЦР и ERIC-ПЦР показано, что сальмонеллы, циркулирующие в РБ и принадлежащие к одному серотипу, не идентичны, в разное время в одном и том же регионе встречаются разные генетические варианты сальмонелл, что свидетельствует о множественности резервуаров инфекции. Показана эффективность одновременного использования метода RAPD-ПЦР с арбитражным праймером P1254 и ERIC-ПЦР в эпидемиологическом типировании сальмонелл[1].*

Resume: *Using the method of RAPD- PCR and ERIC- PCR demonstrated that Salmonella circulating in RB and belonging to the same serotype are not identical that indicates the multiple reservoirs of infection. The data supports the efficiency of the simultaneous use of either method of RAPD- PCR with arbitrary primer R1254 and ERIC- PCR in the epidemiological typing of Salmonella .*

Актуальность. Сальмонеллёзы представляют актуальную проблему здравоохранения, санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора в большинстве стран мира, что связано с высоким уровнем заболеваемости и отсутствием предпосылок к его снижению, обусловленных массовым производством и экспортом продуктов питания, активизацией туризма, появлением устойчивых к антибиотикам вариантов.

Цель: внедрение методов молекулярно-эпидемиологического типирования сальмонелл, что является одним из подходов к сдерживанию распространения возбудителей сальмонеллезозов.

Задачи: 1. Оптимизировать схему молекулярного мониторинга генетической гетерогенности сальмонелл – возбудителей сальмонеллезозов и их антибиотикорезистентности; 2. Определить генетическую гетерогенность сальмонелл, выделяемых во время вспышек сальмонеллезозов в РБ.

Материал и методы. Исследованы 26 штаммов сальмонелл, выделенных от больных, носителей, из внешней среды, продуктов питания в Витебской, Гроднен-

ской, Могилевской областях. Сальмонеллы культивировали на среде Эндо, Левина при температуре 37 °С в течение 18-24 часа. Экстракцию бактериальной ДНК проводили с использованием 5% раствора Chelex-100 в 1хТАЕ буфере: в 100 мкл 5% Chelex-100 в 1хТАЕ буфере вносили полную бактериальную петлю 16 – 20 часовой чистой культуры сальмонелл; кипятили на водной бане в течение 10 мин, клеточный дебрис осаждали ультрацентрифугированием (15000 об/мин – 10 мин), 40 мкл супернатанта переносили в чистые микроцентрифужные пробирки. Для типирования сальмонелл могут использоваться различия в нуклеотидных последовательностях, дисперсно рассеянные по геному, положение и частота встречаемости которых в хромосоме может варьировать от штамма к штамму. К методам, позволяющим выявлять эти отличия, относятся RAPD-ПЦР и ERIC ПЦР. Для типирования сальмонелл с помощью RAPD-ПЦР использовали арбитражный праймер P1254 (5-CCGCAGCCAA-3). Исследуемую экстрагированную ДНК в объеме 10 мкл вносили в 40 мкл ПЦР-смеси, содержащей из расчета на одну реакцию: 10хПЦР буфера – 5 мкл, 3 mM MgCl₂, раствор дНТФ (по 2 mM каждого) – 7 мкл, Taq полимеразу – 2 Ед, праймер P1254 – 20 пкмоль, деионизованную воду – до 40 мкл. Независимо от типа амплификатора, на поверхность реакционных смесей в пробирках наслаивали 1-2 капли минерального масла. Амплификацию с использованием P1254 проводили в следующем режиме: 94 °С – 6 мин, 40 циклов (94 °С – 1 мин, 42 °С – 2 мин, 72 °С – 3 мин), 72 °С – 6 мин, 4 °С – ∞. Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2,6 % агарозном геле и 1хТАЕ буфере. Продукты амплификации объемом 10-15 мкл совместно с 2 мкл загрузочного красителя вносили в агарозный гель с бромидом этидия (0,5 мкг/мл), в одну из лунок вносили смесь ДНК-лестниц размером 50bp и 1kb. Параметры электрофореза — 140 В, 70мА, 2,5 часа. После электрофореза производили фоторегистрацию изображения геля и полученных профилей фрагментов.

Для типирования сальмонелл с помощью ERIC-ПЦР использовали праймеры ERIC-1 (5-ATGTAAGCTCCTGGGGATTTCAC-3) и ERIC-2 (5-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3). Исследуемую экстрагированную ДНК в объеме 10 мкл вносили в 40 мкл ПЦР-смеси, содержащей из расчета на одну реакцию: 10хПЦР буфера – 5 мкл, 3 mM MgCl₂, раствор дНТФ (по 2 mM каждого) – 7 мкл, Taq полимеразу – 2 Ед, праймеры ERIC-1 и ERIC-2 – по 20 пкмоль каждого, деионизованную воду – до 40 мкл. Амплификацию с использованием праймеров ERIC проводили в следующем режиме: 94 °С – 6 мин, 40 циклов (94 °С – 1 мин, 47 °С – 2 мин, 72 °С – 3 мин), 72 °С – 6 мин, 4 °С – ∞. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2,6 % агарозном геле и 1хТАЕ буфере. Продукты амплификации объемом 10-15 мкл совместно с 2 мкл загрузочного красителя вносили в агарозный гель с бромидом этидия (0,5 мкг/мл). Через каждые 6 образцов в гель вносили смесь ДНК-лестниц размером 50bp и 1kb. Параметры электрофореза – 140В, 70мА, 2,5 часа. После проведенного электрофореза производили фоторегистрацию изображения геля и полученных профилей фрагментов.

Результаты и их обсуждение. Поступившие в январе *S. Enteritidis* были выделены в Волковыске (4 культуры) и в Могилеве (1 культура). Культуры из Волковысской центральной районной больницы идентичны между собой в ERIC, а также в RAPD-ПЦР с P1254, при этом культура, выделенная у ребенка из Волковыска

схожа с культурами, выделенными во время вспышки в деревне Репля. Культуры со вспышки в д. Репле были выделены на месяц позже, чем у ребенка из Волковыска, их выделяли от взрослого и ребенка, а также из куриного яйца. Поступившая для исследования культура *S. Enteritidis* из Могилева (1 культура) и выделенная из яиц имела другие профили в ERIC и RAPD-ПЦР с P1254 по сравнению с культурами из Волковыска. *S. Blegdam*, *S. Typhi*, *S. London*, *S. Akaji*, *S. Agona* как в ERIC, так и RAPD-ПЦР с P1254 образуют разные электрофоретические профили.

Исследованы культуры *S. Typhimurium* из Гродненской, Могилевской, Витебской областей. ERIC и RAPD профили *S. Typhimurium* из Гродно, которую выделили от ребенка 5 класса, схожи с изолятами *S. Typhimurium* из Могилева и одного из населенных пунктов Могилевской области, выделенными от детей до года. Изоляты *S. Typhimurium* от детей были идентичны с культурами, выделенными от взрослых пациентов. Культуры *S. Typhimurium* 17 и 18 были выделены от одного пациента и их электрофоретические профили идентичны. Следует отметить, что культуры *S. Typhimurium* 13, 16, 17, 18 имели идентичный профиль устойчивости: все они проявляли резистентность к тетрациклину. Данные по устойчивости культуры *S. Typhimurium* 14 отсутствуют, но из-за сходства с профилями 13, 16, 17, 18 можно предположить, что эта культура также обладает устойчивостью к тетрациклину. *S. Typhimurium* (профиль 14) выделена у ребенка до года с пневмонией, бронхитом, *S. Typhimurium* биовар В 13, 16, 17, 18 - от больных с гастроэнтеритом. *S. Typhimurium*, выделенная при профилактическом осмотре как в ERIC, так и в RAPD-ПЦР с P1254 имела другой профиль фрагментов в по сравнению с *S. Typhimurium* 13, 14, 16-18, а также проявляла чувствительность к тетрациклину. *S. Typhimurium* биовар В из Оршанского района д. Соориевка имеет дополнительную полосу на электрофореграмме и тем самым отличается от изолятов из Могилева, кроме того эта культура чувствительна к большинству противомикробных лекарственных средств. *S. Blegdam*, выделенные от взрослого и ребенка (1,3 года) в Могилеве, проявляли сходство электрофоретических профилей. Культура *S. Typhimurium*, выделенная в Орше в начале сентября (02.09.2013 г.), отличалась в RAPD ПЦР с P1254, от *S. Typhimurium*, выделенных в Орше в период с декабря, 2013 по январь, 2014 гг. *S. Typhimurium*, выделенные в Орше в декабре-январе 2013, 2014 гг. идентичны в ERIC и RAPD ПЦР с P1254. Таким образом, в разных регионах РБ циркулируют отличающиеся генетически возбудители. В Витебской области и Витебске присутствуют в циркуляции разные варианты *S. Typhimurium*, такая гетерогенность возбудителей может свидетельствовать о различных источниках поступления возбудителей. В Могилеве циркулируют *S. Typhimurium*, устойчивые к тетрациклину, в некоторых странах тетрациклин используют для лечения КРС. Данные ERIC и RAPD ПЦР с P1254 позволяют выявлять генетическую разнородность/идентичность изолятов, получаемые данные не противоречат эпидемиологическими характеристиками изолятов. Изучение у *S. Typhimurium* присутствия генов устойчивости к сульфаниламидам - *suII* показало, что только один штамм образует чуткую полосу специфического размера – 500 п.о., в то время как у других штаммов образуемые ампликоны многочисленны, что, по всей видимости, связано с вхождением генов *suII* в состав сборных генетических структур, которые и амплифициру-

ются с образованием неспецифических ампликонов. Таким образом *S.Typhimurium 11* имеет ген *sulI* в составе генома. Изучение у *S.Typhimurium* присутствия генов устойчивости к стрептомицину –*strA-B* - показало, что ряд штаммов *S.Typhimurium* образуют специфичные фрагменты размером 793 п.о. Таким образом, *S.Typhimurium 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19* в составе генома содержат ген *strA-B*, кодирующий устойчивость к стрептомицину. Изучение присутствия генов, кодирующих устойчивость к тетрациклинам ТЕТА –ТЕТВ-ТЕТG у сальмонелл, поступивших в январе свидетельствуют о наличии генов *tetA* у *S.Typhimurium 2, 12*, генов (продукты амплификации 956 п.о.) *tetB* - у *S.Typhimurium 18, 19, 20, 23, 24, 26, 28, 29, 30* (продукты амплификации 600 п.о.). Гент *tetG* отсутствовал у изучаемых изолятов сальмонелл (специфических продуктов амплификации размером 391 п.о. не выявлено).

Выводы: 1. С использованием метода RAPD-ПЦР и ERIC-ПЦР показано, что сальмонеллы, циркулирующие в РБ и принадлежащие к одному серотипу, не идентичны, в разное время в одном и том же регионе встречаются разные генетические варианты сальмонелл, что свидетельствует о множественности резервуаров инфекции; 2. Результаты типирования с помощью ERIC и RAPD ПЦР совпадают с эпидемиологическими данными; 3. Была определена генетическая гетерогенность сальмонелл по ERIC и RAPD ПЦР и генам резистентности к тетрациклинам и сульфаниламидам; 4. Было установлено, что у сальмонелл, проявлявших устойчивость к тетрациклинам, присутствовали гены *tetA* и *tetB*, но не гент *tetG*. 5. У некоторых штаммов, проявлявших устойчивость к сульфаниламидам, присутствовал гены *sul*

Литература

1. Majowicz S. E. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis/ S. E. Majowicz, J. Musto, E. Scallan, F. J. Angulo et al. // Clin Infect Dis. – 2010. – Vol. 50, №6. – P. 882-889.], Wattiau P., Boland C., Bertrand S. Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica Subtyping: Gold Standard and Alternatives // Appl. Environ. Microb., - 2011. - Vol. 77, No. 22. - P. 7877–7885.