

В. В. Слизень, Ж. Ф. Циркунова, Е. И. Гудкова, О. Ч. Глаз

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ *SALMONELLA ENTERICA* С ПОМОЩЬЮ ПЦР

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Изучена типизирующая способность методов ERIC-ПЦР и RAPD-ПЦР с арбитражным праймером P 1254 в отношении Salmonella enterica различных серовариантов.

Подтверждена возможность использования комбинации двух методов для выявления генетических отличий сальмонелл в пределах одного серотипа, что позволяет кластеризовать сальмонеллы в генетические группы и судить об идентичности изолятов различного происхождения, что позволяет применять комбинацию методов ERIC-ПЦР и RAPD-ПЦР в эпидемиологическом мониторинге сальмонеллезов.

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

V. V. Slizen, Z. F. Tsyrukunova, E. I. Gudkova, O. C. Glaz

GENETIC TYPING OF *SALMONELLA ENTERICA* BY ERIC AND RAPD PCR

A total number of 200 isolates of Salmonella enterica belonging to different serotypes (Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Weltwender, Agama, London, Brandenburg, Derby) have been studied with RAPD PCR with primer P1254 and ERIC PCR to reveal genetic heterogeneity among the same serological variants of salmonella. It was shown that, on the basis of difference in amplified fragments patterns, combination of methods RAPD-PCR and ERIC PCR allows to distribute salmonella, belonging to the same serotypes, into different genetic clusters and, hence, RAPD PCR and ERIC PCR can find application in epidemiological typing of Salmonella spp.

Key words: genetic typing, non-typhoid salmonella, RAPD-PCR, ERIC-PCR.

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. В глобальном масштабе возбудители сальмонеллезов вызывают 93,8 миллионов заболеваний в год, из которых 80,3 миллиона случаев передаются пищевым путем и 155000 случаев приводят к летальному исходу. Общее число болеющих сальмонеллезами в разных регионах сравнимо: на африканском континенте, в азиатских странах, Америке количество сальмонеллезов в год составляет 2458000, 29839000, 2222000 (в Северной Америке – 1716000) соответственно. В 27 странах Европейского союза в 2009 году зарегистрировано 6,2 миллиона случаев сальмонеллезов. Самое большое количество смертей регистрируют в азиатских странах – 49200 случаев, в остальных регионах от 1600 (в Западной Европе) и до – 4100 (в Африке) случаев в год [9]. В Республике Беларусь среди бактериальных кишечных инфекций сальмонеллёзы имеют самые высокие показатели заболеваемости (45,38 на 100000 в 2009 г.).

На протяжении последних двух десятилетий от 75 до 95% всех сальмонеллезов как в Республике Беларусь, так и в большинстве стран мира обусловлены *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* [4, 7], в связи с чем иден-

тификация сероварианта возбудителя дает мало информации в ходе эпидемиологического расследования причин заболевания и обуславливает необходимость изучения различий сальмонелл в пределах одного серотипа. Для типирования сальмонелл наиболее перспективным представляется применение молекулярно-генетических методов, которые позволяют получать информацию о территориальном распространении тех или иных генетических вариантов, о резервуаре инфекции и факторах передачи возбудителей, эффективно устанавливать или исключать связь между отдельными случаями заболеваний, отличать привозные случаи от местных, дифференцировать эпидемические вспышки на фоне спорадической заболеваемости, обеспечивать мониторинг эпидемиологического благополучия в лечебных учреждениях, отслеживать пути распространения инфекции.

В настоящее время существует значительный арсенал генетических методов, которые могут использоваться для типирования сальмонелл: плазмидотипирование, риботипирование, типирование по IS200 элементам, электрофорез в пульсирующем поле (PFGE), мультилокусное сиквенс-типирование (MLST), анализ множественных тандемных повторов (MLVA), полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), секвенирование ДНК, ПЦР повторяющихся внегенных полиндромных последовательностей (REP-ПЦР), ПЦР случайно амплифицируемых фрагментов (RAPD-ПЦР), ПЦР межгенных спейсерных регионов в 16S–23S рДНК – ITS1 [2]. Каждый из этих подходов обладает разной типизирующей способностью, трудоёмкостью,

□ Оригинальные научные публикации

воспроизводимостью и стоимостью проведения одного исследования.

В связи с отсутствием внедренных в практику отечественного здравоохранения методик генетического типирования сальмонелл и сохраняющейся высокой заболеваемостью сальмонеллезами, актуальными являются работы по разработке и внедрению методов молекулярно-эпидемиологического типирования сальмонелл, что является одним из подходов к сдерживанию распространения возбудителей сальмонеллез.

Цель исследования. Изучение возможности использования RAPD-ПЦР с арбитражным праймером P1254 и ERIC-ПЦР для выявления генетической гетерогенности сальмонелл, выделенных от пациентов с диагнозом сальмонеллез.

Материалы и методы

Изучены генетические различия 200 штаммов *Salmonella spp.*, выделенных от пациентов больных сальмонеллезом в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. Изученные изоляты принадлежали к серовариантам: Enteritidis – 148 штаммов, Typhimurium – 21 штамм, London – 6 штаммов, Derby – 9 штаммов, Branderburg – 3 штамма, Agama – 1 штамм, Choleraesuis – 3 штамма, Virchow – 2 штамма, Haifa – 1 штамм, Infantis – 3 штамма, Maenster – 1 штамм, Reading – 1 штамм, Weltevreden – 1 штамм.

Экстракцию ДНК проводили температурно-седиментационным методом с использованием 5% раствора Chelex-100. Для типирования сальмонелл с помощью RAPD-ПЦР был использован арбитражный праймер P1254 (5'-CCGACGCCAA-3'), с помощью ERIC-ПЦР – праймеры ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') и ERIC-2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'). Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала из расчета на одну реакцию: 1x ПЦР буфер с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 – 1,5 мМ, каждого дНТФ – по 2 мМ, Taq-полимераза – 1,25 ед, праймер – 20 пкМ, образец ДНК – 10 мкл.

Аmplификацию с использованием праймера P1254 проводили в следующем режиме: 40 циклов 94 °С – 1 мин., 42 °С – 2 мин., 72 °С – 3 мин. Амплификацию с использованием праймеров ERIC 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.

Наличие продуктов амплификации выявляли электрофорезом в режиме 140 В, 70 мА, 2 часа в 2,5% агарозном геле. Электрофореграммы образованных в ПЦР профилей фрагментов анализировали визуально. В связи со сложностями визуального учёта, для изучения конкордантности электрофоретических профилей фрагментов различных изолятов сальмонелл была использована программа PyElph, доступная по адресу <http://pyelph.sourceforge.net/>.

Результаты и обсуждение

К методам типирования микроорганизмов предъявляют ряд требований: они должны быть стабильными, обладать выраженной типизирующей способностью,

дискриминативностью и позволять дифференцировать 2 неродственных изолята, произвольно выбранных из популяции изучаемого вида, а также быть воспроизводимыми и обеспечивать конкордантность результатов с эпидемиологическими данными и с другими методами типирования [1]. В связи с небольшой трудоемкостью и стоимостью исследований в практических лабораториях перспективно использование различных вариантов ПЦР типирования, основанных на случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD-ПЦР), либо амплификации повторяющейся экстрагенной палиндромной ДНК (REP-ПЦР). Эти методы основаны на использовании коротких праймеров, число и расположение сайтов связывания таких неспецифических праймеров различаются среди бактерий разных видов и различных штаммов одного вида, что позволяет по профилю образуемых в ПЦР фрагментов выявлять генетическое различие/сходство микроорганизмов [8, 10].

RAPD-ПЦР. Метод RAPD-ПЦР основывается на использовании низкой температуры отжига и одного праймера размером 10 нуклеотидов, имеющего неспецифическую последовательность, благодаря чему праймер связывается со множеством комплементарных участков в ДНК и, в случае их близкого расположения друг к другу, амплифицирует их. Инсерции и делеции в ДНК приводят к исчезновению или появлению сайта связывания праймера, что сопровождается появлением изменений в профиле ампликонов [10]. В настоящее время предложены модификации RAPD-ПЦР: AP-ПЦР (arbitrarily primed), в которой используют праймеры размером 15 нуклеотидов, и DAF-ПЦР (DNA amplification fingerprinting), в которой используют праймеры размером меньше 10 нуклеотидов [3].

Изучение типизирующей способности RAPD-ПЦР с использованием праймера P1254 в отношении сальмонелл показало, что бактерии разных серовариантов Enteritidis, Typhimurium, London, Brandenburg, Infantis, Derbi, Agona и Weltwender образуют отличающиеся профили и фрагментов. Визуальное сравнение результатов RAPD-ПЦР с праймером P1254 показало, что изученные изоляты *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* внутри сероварианта неоднородны и образуют несколько типов электрофоретических паттернов фрагментов. На рисунке приведены *S. Enteritidis* с отличающимися профилями фрагментов в RAPD-ПЦР (треки 1, 2, 6, 7, 8, 9, 11), паттерны фрагментов *S. Enteritidis*, представленных в треках 3, 4, 5, идентичны, что подтверждает существование гетерогенности *S. Enteritidis* и свидетельствующих о типизирующей способности RAPD-ПЦР с праймером P1254 в отношении *S. Enteritidis*. Установлено, что метод RAPD-ПЦР с праймером P1254 обладает воспроизводимостью и при повторном проведении исследований дает идентичные результаты.

ERIC-ПЦР. Геномы прокариот характеризуются наличием нескольких категорий повторяющихся последовательностей таких, как гены рРНК, тРНК, IS элементы, а также прямые повторяющиеся последователь-

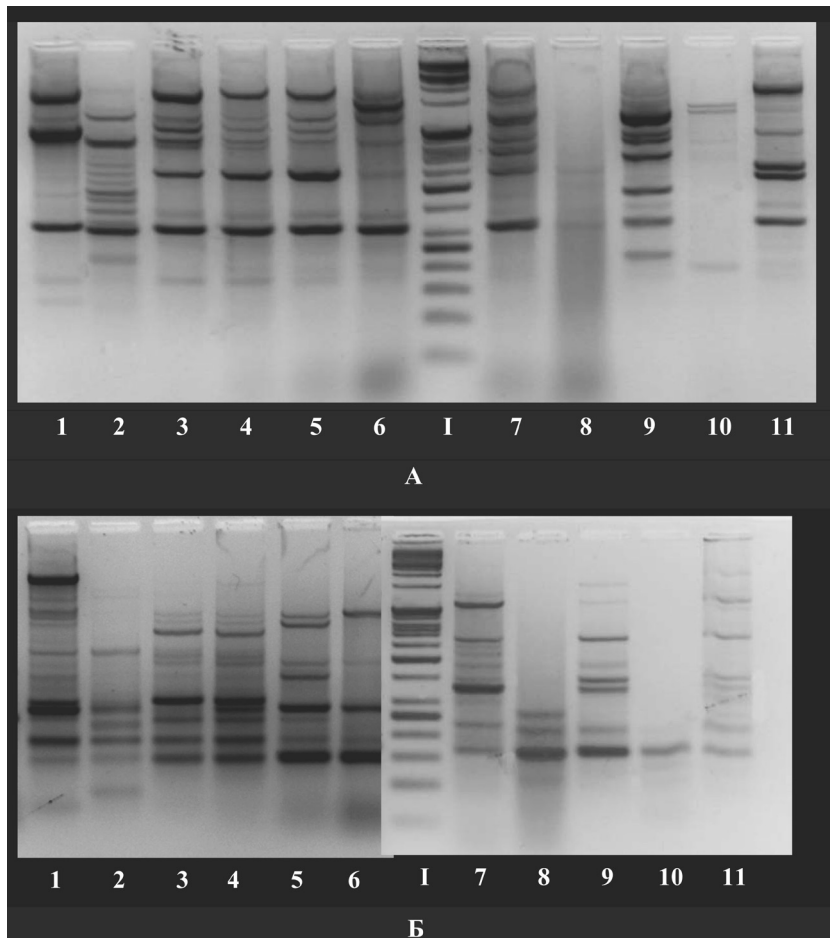


Рис. Использование RAPD (А) и ERIC ПЦР (Б) для типирования сальмонелл

ности длиной 20–50 п. о., одной из разновидностей которых являются повторы в 32 п. о., локализованные в некодирующих регионах, или REP-участках (repetitive extragenic palindromic sequences). Праймеры ERIC, соответствующие последовательностям REP-повторов *E. coli*, успешно используют для анализа меж- и внутривидовых различий бактериальных геномов. Генетические перестройки приводят к тому, что в ходе ERIC-ПЦР могут образовываться профили ампликонов, которые отличаются не только у разных видов микроорганизмов, но и у представителей одного вида [8].

Анализ профилей фрагментов различных серовариантов сальмонелл, полученных с помощью ERIC-ПЦР, показал, что метод обладает типизирующей способностью и позволяет выявлять гетерогенность сальмонелл внутри серотипов *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis*. Приведенные на рисунке *S. Enteritidis* (треки 1, 2, 7, 8, 9, 11) отличаются профилями фрагментов в ERIC-ПЦР, паттерны фрагментов *S. Enteritidis*, представленные в треках 3, 4, 5, 6 схожи. Для подтверждения их сходства необходимо сравнить их идентичность в RAPD-ПЦР с праймером P1254.

В связи с тем, что изоляты сальмонелл могут образовывать идентичные профили фрагментов в ERIC-ПЦР, но при этом могут иметь различные паттерны фрагментов в RAPD ПЦР, было предложено одновре-

менно сравнивать профили фрагментов, получаемых с помощью ERIC ПЦР и RAPD-ПЦР. Изоляты сальмонелл с идентичными профилями фрагментов, полученными в ERIC ПЦР и ПЦР с P1254, а также идентичным фенотипом резистентности относили к одной клональной группе. Штаммы с идентичными паттернами фрагментов, полученными одним методом, и отличающимися профилями фрагментов, полученными вторым методом, относили в разные клональные группы и считали их не идентичными. В результате проведенных исследований показано, что комбинированное использование RAPD и ERIC-ПЦР повышает достоверность типирования сальмонелл.

Треки 1–12 – *S. Enteritidis* 4051, 26455, 4173, 4021, 9475, 5623, 3993, 31425, 9424, 25229, 25239, 3250; трек I – маркер молекулярного веса 50 п. о. + 1000 п. о.

Доминирование пищевого пути инфицирования и импорт продуктов питания в РБ, интенсификация туризма обосновывает необходимость слежения за глобальными эпидемиологическими изменениями в заболеваемости сальмонеллезом: наиболее часто выделяемыми изолятами, продуктами риска и потенциальными резервуарами возбудителей.

До 40-х годов 20-го века доминирующими сальмонеллами, вызывавшими сальмонеллез с пищевым путем передачи, были *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*,

□ Оригинальные научные публикации

S. Thompson, S. Newport, S. Bovismorbificans, S. Choleraesuis. Серовариант S. Typhimurium сохранил свое место среди ведущих возбудителей сальмонеллез до настоящего момента, в то время как положение остальных серовариантов в «горячей десятке» возбудителей постоянно претерпевало изменения. В 1960-х S. Agona начинает циркулировать среди поголовья свиней и домашней птицы после того, как была интродуцирована с импортируемым из Перу кормом из рыбы. В начале 1970-х S. Hadar стала вторым по значимости возбудителем сальмонеллез среди людей, что было вызвано интродукцией и распространением этого сероварианта среди индейки. В период с 1961 по 1980 отмечается постепенное увеличение доли S. Enteritidis фаготипа PT 8 в этиологической структуре сальмонеллез, которые привели к нескольким вспышкам сальмонеллез, связанным с употреблением мяса индеек. Начиная с 1975 года S. Enteritidis становятся вторыми по значимости возбудителями сальмонеллез, с 1981 по 1991 их доля в структуре сальмонеллез увеличивается с 10 до 70%, при этом происходит смена циркулирующего фаготипа с PT 8 на PT4. Активное распространение S. Enteritidis получили благодаря способности проникать в куриные яйца, которые являются хорошо продаваемым коммерческим продуктом, а также отсутствием строгой адаптации к одному хозяину. В то время как S. Gallinarum, частый возбудитель заболеваний цыплят и кур, адаптированы к этому типу хозяев и редко вызывают заболевания у людей. Несколько десятилетий назад S. Choleraesuis встречались во многих странах и были одним из лидирующих среди возбудителей сальмонеллез у свиней. В настоящее время частота их выделения низка, хотя этот серовариант сохраняет актуальность для юго-восточной Азии, Тайвани и Тайланда, где S. Choleraesuis часто вызывают сальмонеллез у людей. В 2007 году частота выделения от сельскохозяйственных животных S. Dublin, которые вызывают заболевания у крупного рогатого скота и людей, превосходила уровень выделения S. Typhimurium в Бельгии, Дании, Ирландии, Голландии, Великобритании, где на долю S. Dublin, изолируемых от животных, приходилось 66.3, 52.3, 82.5, 63.6, 65.1% соответственно [7].

В 2009 в странах ЕС у людей заболевания вызывали сероварианты Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Newport, Virchow, Derby, Hadar, Kentucky, Saintpaul, Bovismorbificans. В Соединенных Штатах 4 серотипа являлись ведущими возбудителями сальмонеллез: S. Typhimurium (19%), S. Enteritidis (14%), S. Newport (9%), S. Javiana (5%). В 2012 г. в Германии 42% сальмонеллез у людей были обусловлены S. Typhimurium. Большинство циркулирующих изолятов S. Typhimurium, выделяемых от людей и свиней, относятся к фаготипу DT193. Во Франции в 2012 г. зарегистрированы 127 случаев, вызванных S. Typhimurium фаготипа DT193. Следует отметить, что резистентность к антибиотикам наиболее часто выявляют среди S. Typhimurium,

резистентные варианты зарегистрированы также среди S. Hadar, S. Enteritidis, S. Blockley, S. Heidelberg, S. Kentucky, S. Bovismorbificans, S. Panama, S. Rissen.

В начале 21 века произошла интродукция в популяцию сельскохозяйственных животных и птиц ранее редко встречавшихся серовариантов. Отмечается рост частоты сальмонеллез, вызываемых такими серовариантами как S. Mikawasima, монофазным серовариантом S. Typhimurium (4,12: i;-), S. Stanley.

В нескольких странах ЕС с 2009 по сентябрь 2013 зарегистрировано увеличение числа инфекций, вызываемых S. Mikawasima, которые впервые были изолированы от черепах в Турции в 1967, а в 1976 в Нидерландах и других странах ЕС их выделяли от свиней. В течение 2004–2012 гг. в восьми странах ЕС было выделено 120 изолятов S. Mikawasima, преимущественно от домашней птицы и свиней, в единичных случаях из овощей, колбасы, орехов, корма для домашних животных, кебаба, замороженных щупальцев кальмара. Большинство регистрируемых случаев выделения S. Mikawasima приходится на Испанию, где этот серовариант выделяли из образцов пресной воды, от свиней и диких кабанов, в больницах. В 2012 г. зарегистрированы случаи сальмонеллез, вызванных S. Mikawasima, в шести областях Чешской республики. В 2009 г в Германии были выделены S. Mikawasima, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра действия [5].

В последнее время зарегистрировано увеличение частоты сальмонеллез, вызываемых S. Stanley. Между 2006 и 2012 в ЕС было выявлено 2 926 случая сальмонеллез, обусловленных этим серотипом. В 2001–2007 гг. S. Stanley неизменно были среди числа двадцати наиболее часто выделяемых изолятов в Японии, Малайзии, Филиппинах, Хорватии, Дании, Финляндии, Нидерландах и Канаде. В 2002–2007 гг. в Таиланде они занимали второе место в этиологической структуре сальмонеллез и на их долю приходилось около 11% случаев сальмонеллеза. В ЕС на начальных этапах большинство заболеваний, вызванных S. Stanley, были связаны с путешествиями в Юго-Восточную Азию, главным образом Таиланд. В настоящее время зарегистрированные в 2012–2013 гг. случаи в Бельгии, Венгрии и Германии, не связаны с туристическими поездками и вызваны однотипным по генетическим и фенотипическим признакам возбудителем. С S. Stanley были связаны международная вспышка в 1995 в США, Финляндии, обусловленная употреблением проростков люцерны, вспышка в 2001 в Канаде, Англии и Уэльсе, Шотландии и Австралии, связанная с употреблением импортируемого арахиса. С сентября 2006 по февраль 2007 была зарегистрирована вспышка в Швейцарии, связанная с употреблением определенного сорта мягкого сыра, который производили в западных кантонах Швейцарии. S. Stanley могут быть выделены из продуктов из Тайланда, Германии, Нидерландов, Вьетнама, Бразилии и Китая: корма для домашних живот-

ных, арахиса, замороженного говяжьего мяса, высушенных тайских грибов, свежей мяты, замороженных цыплят, сладкого базилика, свежей петрушки [6].

Зарегистрированные в 2013 году вспышки были связаны с контактом с живой домашней птицей, в таких случаях от пациентов выделяли *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Lille*, *S. Newport*, *S. Mbandaka*, множественно резистентные *S. Heidelberg*, а также были обусловлены употреблением огурцов (выделяли *S. Saintpaul*), говяжьего фарша (*S. Typhimurium*), маленьких черепаха (*S. Sandiego*, *S. Pomona*, *S. Poona*). Во время вспышек в 2009–2012 гг. сальмонеллы выделяли из арахисового масла (*S. Bredeney*, *S. Typhimurium*, *S. Tennessee*), мякоти манго (*S. Braenderup*), ежей (*S. Typhimurium*), мускусной дыни (*S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Panama*), говяжьего фарша (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*), мяса домашней птицы (*S. Nadar*, *S. Montevideo*, *S. Newport*, *S. Lille*, *S. Infantis*), сухого корма для собак (*S. Infantis*), сырого полуфабриката тунца (*S. Bareilly*, *S. Nchanga*), маленьких черепаха (*S. Sandiego*, *Pomona*, *Poona*), кошерной жареной куриной печени (*Salmonella Heidelberg*), турецких кедровых орехов (*S. Enteritidis*), фарша индейки (*S. Heidelberg*), свежих папай (*S. Agona*), африканских карликовых лягушек (*S. Typhimurium*), люцерны и пряных ростков (*S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Saintpaul*, *S. Salmonella* I 4, [5], 12: i:-), утят (*S. Altona*, *S. Johannesburg*), гамбургеров из индейки (*S. Nadar*), яиц (*S. Enteritidis*), пшеничных отрубей (*S. Agona*).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что RAPD-ПЦР с арбитражным праймером P1254 и ERIC-ПЦР позволяют выявлять генетические различия по профилю генерируемых ампликонов среди сальмонелл сероваров *Enteritidis* и *Typhimurium*, комбинированное использование методов ERIC-ПЦР и RAPD-ПЦР с арбитражным праймером P 1254 позволяет более эффективно выявлять различия сальмонелл внутри серотипов. Выявление гетерогенности изолятов сальмонелл с помощью комбинированного использования методов ERIC-ПЦР и RAPD-ПЦР с праймером P1254, а также знание основ-

ных продуктов риска в распространении определенных серовариантов сальмонелл, основных возбудителей сальмонеллезов в странах активных туристических маршрутов, а также информированность о новых серовариантах, приобретающих активное распространение, позволит улучшить контроль над распространением сальмонеллезов в Республике Беларусь.

Литература

1. Шагинян, И. А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций / И. А. Шагинян // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2. – С. 82–95.
2. Comparison of Subtyping Methods for Differentiating *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Obtained from Food Animal Sources / S. L. Foley [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 10. – P. 3569–3577.
3. McClelland, M. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR / M. McClelland, J. Welsh // Genome Res. – 1994. – Vol. 4. – P. S59–S65.
4. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones / R. Lan [et al.] // Infect Genet Evol. – 2009. – Vol. 9, № 5. – P. 996–1005.
5. Rapid outbreak assessment. Unusual increase of *Salmonella* Mikawasima infections in humans // European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 28 November 2013. – P. 1–9.
6. Rapid risk assessment. Multi-country outbreak of *Salmonella* Stanley infections // European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 27 July 2012. – P. 1–6.
7. Recent Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Acquired from Turtles: A Continuing Public Health Challenge / R. Julie [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 50. – P. 554–559.
8. Strain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR / M. K. Saxena [et al.] // Res Vet Sci. – 2002. – Vol. 73. – P. 313–314.
9. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis / S. E. Majowicz [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 50, № 6. – P. 882–889.
10. Variation in *Salmonella enteritidis* RAPD-PCR patterns may not be due to genetic differences / D. L. Mathis [et al.] // Avian Dis. – 2011. – Vol. 55. – P. 620–625.