

¹Слизень В. В., ¹Циркунова Ж. Ф., Довнар Д. А., ¹Гудкова Е. И.,
²Филипенко С. С.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ РАССЛЕДОВАНИЕ ВСПЫШЕК САЛЬМОНЕЛЛЕЗОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ

¹ Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

² Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья, г. Минск, Беларусь

В 2013 г. было зарегистрировано 82 694 подтвержденных случаев сальмонеллезов в 27 странах Европейского союза, при этом показатель заболеваемости составил 20,4 случая на 100 000 населения, что свидетельствует о снижении заболеваемости на 7,9 % в ЕС по сравнению с 2012 г. и соответствует европейской тенденции снижения заболеваемости в последние 5 лет [1]. На протяжении последних двух десятилетий в Республике Беларусь, ЕС и других странах мира большинство сальмонеллезов обусловлены серовариантами *Enteritidis* и *Typhimurium* [2, 3], на долю которых может приходиться до 75–95 % сальмонеллезов, в связи с этим в ходе эпидемиологического расследования причин заболевания недостаточно иметь информацию о сероварианте возбудителя, что обуславливает необходимость изучения генетических различий сальмонелл в пределах одного серотипа. Молекулярно-генетические методы успешно применяются для типирования сальмонелл, необходимого для выявления источника инфекции и факторов передачи возбудителей, исключения связи между отдельными случаями заболеваний, дифференцирования эпидемической вспышки на фоне спорадической заболеваемости, а также обеспечения мониторинга эпидемиологического благополучия в лечебных учреждениях. 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 [4].

Мультилокусный анализ вариабельного количества tandemных повторов (Multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis MLVA) — это метод, основанный на ПЦР, позволяет выявлять участки бактериальной ДНК, которые в результате проскальзывания репликационной вилки подвергаются ошибочному копированию, приводящему к их укорочению или удлинению. Эта изменчивость ДНК может быть легко оценена с помощью ПЦР с фланкирующими праймерами и измерением длины ПЦР продуктов, что позволяет выявлять количество tandemных повторов в генетическом локусе или множестве локусов. Анализ количества tandemных повторов в нескольких локусах позволяет получать для *S. enterica serovar Enteritidis* цифровой код, с помощью которого проводят сравнение изолятов [4].

Материалы и методы

Из Кореличского районного центра гигиены и эпидемиологии в ГУ «Республиканский центр эпидемиологии и общественного здоровья» и УО «Белорусский государственный медицинский университет» поступило 9 культур *S. enterica serovar Enteritidis*, которые выделяли 14 и 15 июня 2014 г. во время вспышки в одном из кафе г. п. Кореличи. Две культуры были выделены с поверхности потенциальных факторов передачи инфекции — с разделочной доски «мясо вареное» (культуры № 134), наружной поверхности холодильного шкафа «Готовая продукция» (№ 133), остальные 7 культур были выделены от пациентов № 136, 138, 139, 140, 141, двое из которых являлись поварами в кафе (№ 135, 137). Исследования проводились в рамках задания «Изучение генетических вариантов сальмонелл — возбудителей сальмонеллезов, циркулирующих в Республике Беларусь», ГПНИ «Медицина и фармация», подпрограммы «Фундаментальная и прикладная медицина».

Выделение геномной ДНК сальмонелл проводили с использованием 5 % раствора Chelex-100 в 1xTAE буфере, в который вносили полную бактериальную петлю 16–20-часовой чистой культуры сальмонелл; кипятили на водяной бане 10 мин, клеточный дебрис осаждали ультрацентрифугированием (15 000 об/мин — 10 мин).

Типирование сальмонелл на основании различий в профилях фрагментов, получаемых в RAPD-ПЦР с арбитражным праймером P1254 и ERIC-ПЦР, осуществляли в соответствии с инструкцией № 011-12-13 на метод типирования сальмонелл с помощью ПЦР (авторы: Слизень В. В., Циркунова Ж. Ф., Гудкова Е. И.).

Идентичность культур подтверждали методом MLVA, для чего изучали различия в девяти VNTR локусах (SENTR-3, SENTR-4, SENTR-5, SENTR-7, SE-3, SENTR-1, SENTR-6, SENTR-2, SE-7), согласно методу, описанному В. Malorny [5].

Для оценки результатов проводили сравнение профилей фрагментов, образованных в RAPD-ПЦР, ERIC-ПЦР, MLVA. Изоляты сальмонеллы от-

носили к одному генетическому клону в случае идентичности RAPD- и ERIC-ПЦР, MLVA профилей у изучаемых культур сальмонелл.

Результаты и обсуждение

MLVA в настоящее время успешно применяется для типирования микроорганизмов различной систематической принадлежности. Показана эффективность MLVA для выявления источника инфекции при расследовании вспышек, вызванных серотипом *Typhimurium* [6, 7]. Метод MLVA типирования *S. enterica serovar Enteritidis* основывается на проведении мультиплексной ПЦР для выявления гетерогенности в девяти VNTR локусах. Согласно данным литературы, этот метод позволяет выявлять семьдесят девять различных MLVA-типов у *S. enterica serovar Enteritidis*, относящихся преимущественно к фаготипам PT4 и PT8, индекс разнообразия Симпсона для этого метода составляет 0,919, а значение разнообразия для девяти VNTR локусов варьируют от 0,07 до 0,65 [5].

С использованием MLVA для каждой из поступивших со вспышки в г. п. Кореличи культуры *S. enterica serovar Enteritidis* изучены различия в 9 VNTR локусах. На рис. 1 приведены результаты электрофореза, на котором представлены для каждой из культур три электрофоретических трека, по которым проводится сравнение идентичности культур. Полученные результаты свидетельствуют об идентичности культур *S. enterica serovar Enteritidis* 133, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 141. Таким образом, сальмонеллы, выделяемые с поверхности разделочной доски «вареное мясо» и с полок холодильника «готовая продукция», идентичны с теми, которые выявлены у поваров кафе г. п. Кореличи и пациентов с острым гастроэнтеритом.

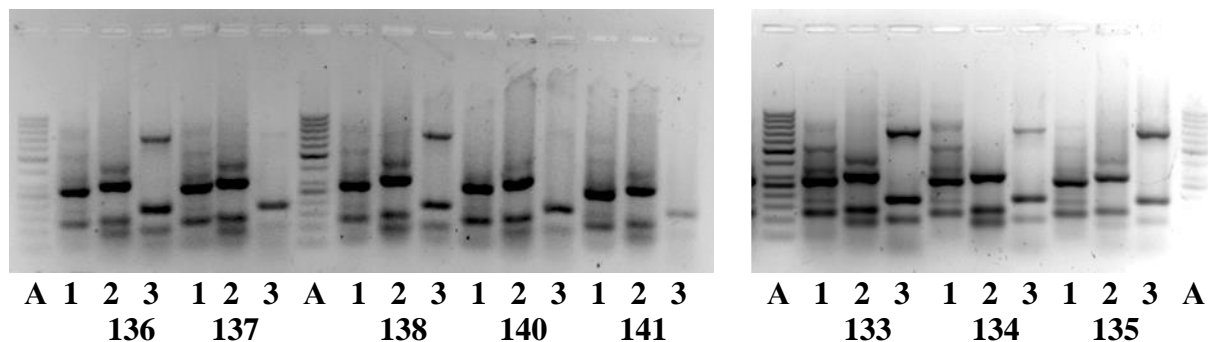


Рис. 1. Результаты сравнения MLVA профилей *S. Enteritidis* 133-138, 140, 141

Для поступивших культур *S. enterica subsp. Enteritidis* было проведено сравнение сходства/различия профилей фрагментов, образуемых как в ERIC, так и RAPD-ПЦР. Результаты определения различий в ERIC и RAPD приведены на рис. 2.

Согласно данным RAPD- и ERIC-ПЦР, культуры 133–138 идентичны. Культуры 140 и 141 в RAPD-ПЦР проявляют вероятную идентичность с культурами 133–138, в ERIC-ПЦР 140, 141 идентичны с остальными культурами.

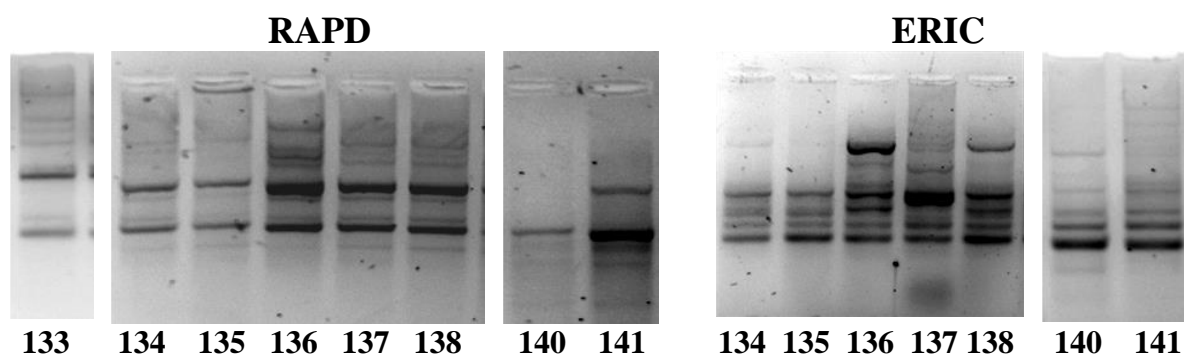


Рис. 2. Результаты типирования культур с помощью ERIC- и RAPD-ПЦР

Схожие с кореличскими изолятами *S. enterica serovar Enteritidis* выделяли из мяса птицы рогачевской птицефабрики «Рассвет», яичного порошка минской и кобринской птицефабрик, яиц во время вспышки в Горках, в очагах в Ельске, в д. Свислочь. Следует также отметить на близость временных границ вспышек в г. Горки (21, 24, 25 июля 2014) и в г. п. Кореличи (14 и 15 июля 2014).

Выводы

Во время вспышки в кафе в г. п. Кореличи с поверхности объектов пищеблока кафе и от пациентов выделяли идентичные генетические варианты *S. enterica serovar Enteritidis*, что подтверждает информативность генетических методов в расследовании вспышек. В связи с тем, что основным резервуаром *S. enterica serovar Enteritidis* являются продукты птицеводства, то интродукция возбудителя в очаг связана с поставщиками сырья (яиц, мяса птиц). Вспышки в организациях общепита должны рассматриваться как маркер неблагополучия в первую очередь на предприятиях-поставщиках сырья, что требует оперативного расследования и реагирования совместно с ветслужбой в соответствии с утвержденным алгоритмом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013/ Authority, E. F. S.; European Food Safety Authority // EFSA Journal. 2015. Vol. 13, N 1. 165 p.*
2. *Близнюк, А. М. Этиологическая структура и проявление эпидемиологического процесса сальмонеллезов / А. М. Близнюк, И. И. Рашкевич, Г. Н. Чистенко // Журнал ГрГМУ. 2010. № 1. С. 78–81.*
3. *CDC. Salmonella surveillance: Annual summary, 2004. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA., 2005.*
4. *Variable number of tandem repeats in Salmonella enterica subsp. enterica for typing purposes / V. Ramisse [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 42. P. 5722–5730.*
5. *Malorny, B. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of Salmonella enterica serotype Enteritidis / B. Malorny, E. Junker, H. Reiner // BMC Microbiology. 2008. Vol. 8. P. 84.*
6. *Isakbaeva, E. Salmonella Typhimurium DT104 outbreak linked to imported minced beef, Norway, October–November / E. Isakbaeva, B. A. Lindstedt, B. Schimmere // Euro Surveill. 2005. Vol. 10, N 45. P. 1.*

7. A regional outbreak of *S. Typhimurium* in Denmark and identification of the source using MLVA typing / M. Torpdahl [et al.] // Euro Surveill. 2006. Vol. 11. P. 134–136.

¹*Slizen V. V.,* ¹*Tsyркunova J. F.,* ²*Dovnar D. A.,* ¹*Gudkova E. I.,*
²*Filipenok S. S.*

**Surveillance of *S. enterica* serovar *Enteritidis* out breaks
by molecular genetic typing methods**

During an outbreak of salmonellosis in Korelichi, Grodno region nine cultures of *S. enterica* serovar *Enteritidis* were processed originated from patients (7 isolates) and from surfaces of refrigerator and cutting board for a cooked food (2 isolates). Methods of RAPD-PCR, ERIC-PCR, and MLVA were applied to detect similarities and differences of *S. enterica* serovar *Enteritidis*, isolated from different sources. All tested salmonella isolated from different sources in Korelichi were identical. Molecular genetic typing methods were shown to be highly informative in surveillance of salmonellosis outbreaks.