

форм ЯБ, роль хирургии в решении проблемы объективно возрастает. Будет гораздо лучше, если основную нагрузку в этом неизбежном перераспределении ролей возьмет на себя хирургия плановая, а не экстренная.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузин М.И. Актуальные вопросы хирургии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки // Хирургия. — 2001. — № 1. — С. 27–32.
2. Панцырев Ю.М., Михайлов А.И., Федоров Е.Д. Хирургическое лечение прободных и кровоточащих гастродуоденальных язв // Хирургия. — 2003. — № 3. — С. 43–49.
3. Шалимов А.А., Картиш А.П., Братусь В.Д. и др. Хирургическое лечение язвенной болезни (1996–2001 гг.) / Материалы на XX съезд хирургов Украины. — Киев, 2002. — 67 с.
4. Шапошников А.В. Принятие решения в хирургии. Теоретические и прикладные аспекты. — Ростов н/Д, 2003. — 190 с.
5. Циммерман Я.С., Ведерников Б.Е., Новиков В.Н., Касьянова Н.Л. Микрофлора слизистой оболочки луковицы двенадцатиперстной кишки и ее роль в патогенезе рецидива язвенной болезни // Сибир. журн. гастроэнт. гепатол. — 2001. — № 12. — С. 61–63.
6. Эльштейн Н.В. Ошибки в гастроэнтерологической практике. — М.: МИА, 1998. — 224 с.
7. Blaser M.J. Helicobacter pylori: Balance and imbalance // Eur. J. Gastroenterol Hepatol. — 1998. — № 10. — P. 15–18.
8. Canoy D.S., Hart A.R., Todd C.J. Epidemiology of duodenal ulcer perforation: a study on hospital admissions in Norfolk, United Kingdom // Dig Liver Dis. — 2002. — P. 322–327.
9. Hudson N., Brydon W.G., Eastwood M.A. et al Successful Helicobacter pylori eradication incorporating a one-week antibiotic regimen // Aliment. Pharmacol. Ther. — 1995. — № 9. — P. 47–50.
10. Fletcher D. Peptic disease: can we afford current management? Aust. N. Z. J. Surg. — 1997. — Vol. 67. — № 2–3. — P. 75–80.
11. Paimela H., Paimela R., Myllykangas et al. Current features of peptic ulcer disease in Finland: incidence of surgery, hospital admission and mortality for the disease during the past twenty five years // Scand. J. Gastroenterol. — 2002. — P. 399–403.
12. Rubin E., Farber J.L. Peptic ulcer disease. Pathology. 2-nd ed. Philadelphia Lippincott Company. — 1994. — P. 637–643.

Поступила 31.05.2005

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 575+579:614.4]:616.981.47-036.22-084 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Д.В. Тапальский, С.В. Жаворонок

Гомельский государственный медицинский университет
Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья

Представлены результаты эпидемиологического маркирования полирезистентных штаммов S.Typhimurium. Отмечено клональное происхождение цефотаксим-резистентных штаммов.

Ключевые слова: сальмонеллы, антибиотикорезистентность, типирование, пульс-электрофорез.

MOLECULAR GENETICAL METHODS IN EPIDEMIOLOGICAL SUPERVISION FOR SALMONELLOSES

D.V. Tapalski, S.V. Zhavoronok

Gomel State Medical University
Gomel Regional Centre of Hygiene, Epidemiology and Public Health

Results of epidemiological marking of multiresistant S.Typhimurium strains are submitted. The clonal parentage of cefotaxime-resistant strains is marked.

Key words: salmonellas, resistance to antibiotics, typing, pulsed-field gel electrophoresis.

Введение

Гомельская область на протяжении ряда лет занимает лидирующее положение в республике по заболеваемости сальмонеллезом. В 2004 году показатель заболеваемости в регионе превысил общереспубликанский почти в 2 раза. Наиболее неблагополучной территорией является город Гомель, на долю которого приходилось 70% всех случаев заболеваний сальмонеллезной инфекцией в регионе. Заболеваемость сальмонеллезами в г. Гомеле в 2004 г. составила 160,6 случаев на 100 тыс. населения, заболеваемость в целом по республике — 37,58 случаев на 100 тыс. [1]. Актуальной проблемой для Гомельской области является циркуляция полиантибиотикорезистентных штаммов *S. Typhimurium*, имеющих устойчивость к 5–7 антибактериальным препаратам, в том числе устойчивость к цефотаксиму/цефалоспорином III поколения и устойчивость низкого уровня к фторированным хинолонам [2]. В конце XX века во многих странах и регионах мира стал активно распространяться полирезистентный фэготип *S. Typhimurium* DT104 с устойчивостью к пяти антибактериальным препаратам — ампициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфонамидам и тетрациклину (R-тип ACSSuT). Штаммы *S. Typhimurium* DT104 стали главной причиной сальмонеллезов у людей в Великобритании в конце 1980-х и затем появились во многих европейских странах, США, Канаде, Израиле, Турции и Японии в течение 1990-х [0]. В США *S. Typhimurium* с R-типом ACSSuT составил 31% всех штаммов *Typhimurium*, выделенных в 1999 году, и, как оценивалось, им было вызвано около 7% сальмонеллезов [4]. Отсутствие системы фэготипирования клинических изолятов сальмонелл на постсоветском пространстве не позволяет оценить масштаб этой проблемы для Беларуси.

Большая роль в контроле за вспышками сальмонеллезов принадлежит их раннему выявлению с использованием адекватной системы наблюдения, основанной на внутривидовом субтипировании изолятов. В прошлом эпидемиологические исследования сальмонеллезной инфекции основывались, прежде всего, на фенотипических методах внутривидового типирования сальмонелл (серотипирование, биотипирование, фэготипирование), которые широко

использовались для установления соответствия изолятов, выделенных от больных и из предполагаемого источника [7].

В 1984 году была разработана техника пульс-электрофореза (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE). PFGE облегчает раздельное перемещение крупных фрагментов ДНК в агарозном геле путем постоянного изменения направления электрического поля в ходе электрофореза. Небольшое количество фрагментов ДНК (обычно 10–20) облегчает интерпретацию результатов. PFGE в своем основном формате (лизис бактериальных клеток для выделения неповрежденной хромосомной ДНК, удаление примесей, нарезание хромосомной ДНК соответствующими рестриктазами, пульс-электрофорез фрагментов ДНК и их визуализация) может быть применен как универсальный метод субтипирования многих бактерий. Было неоднократно показано, что PFGE превосходит другие методы субтипирования сальмонелл по точности и дифференцирующей силе. Полученные в пульс-электрофорезе профили рестрицированной ДНК стабильны и хорошо воспроизводимы на внутри- и межлабораторном уровне. Таким образом, PFGE является методом выбора для эпидемиологического типирования сальмонелл в настоящее время [3, 5].

Цель исследования — установить степень генетического родства циркулирующих в Гомельской области цефотаксим-резистентных клонов *S. Typhimurium* и провести сопоставление PFGE-профилей штаммов *S. Typhimurium* из Гомельского региона и штаммов *S. Typhimurium* DT104, выделенных в различных регионах мира.

Материалы и методы

Молекулярно-генетические исследования 35 штаммов *S. Typhimurium*, выделенных от детей в Гомельской области, были проведены в лаборатории Референс-центра Всемирной организации здравоохранения по изучению антибиотикорезистентности энтеропатогенов (Копенгаген, Дания, руководитель лаборатории — профессор Frank M. Aarestrup) в рамках программы WHO GSS — Глобальной сети наблюдения за возбудителями сальмонеллезов и другими энтеропатогенами.

Для выделения ДНК бактериальные колонии суспендировали в 1 мл фосфатно-буферного раствора, центрифугировали и по-

вторно ресуспендировали в 100 мкл 10 mM Tris, 1 mM EDTA буферного раствора с pH 8.0, выдерживали 10 мин при температуре 95°C. Для ПЦР-амплификации использовали 2 мкл бактериального лизата. Для обнаружения генов, детерминирующих синтез БЛРС CTX-M (blaCTX-M) проводили ПЦР-амплификацию с использованием CTX-M-праймеров 5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3' и 5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'.

Реакционная смесь в объеме 50 мкл состояла из 1xMgCl₂-free буфера (Promega, Madison, США), 100 нг каждого из праймеров, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 1 мкл смеси dNTP's и бидистиллированной воды. После проведения ПЦР амплифицированная ДНК была очищена с использованием QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Германия) и выполнено ее секвенирование на автоматическом секвенаторе 373A (Applied Biosystems / Perkin Elmer, США). Для анализа данных использовался программный комплекс DNAsis (Hitachi Software Engineering Co., Ltd).

Анализ генома был выполнен с помощью пульс-электрофореза макрорестрикционных фрагментов, полученных после обработки ДНК ферментами XbaI и BlnI. Пульс-электрофорез проводился с использованием системы Pulsaphor Plus (Pharmacia LKB).

Для выявления возможного клонального распространения на территории Беларуси штамма S.Typhimurium DT104 проведено со-

поставление PFGE-типов штаммов сальмонелл, выделенных в различных регионах. В исследование включены S.Typhimurium DT 104 штамм 2469 (Копенгаген, Дания), S.Typhimurium DT 104 штамм 9724913-3 (Германия), референтный штамм S.Typhimurium DT 104 7421659-1 (США) и 8 штаммов S.Typhimurium, выделенных от детей в Гомельской области, имеющие DT104-подобные профили резистентности ACSSuT (устойчивость к ампициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфонидам и тетрациклину). Пульс-электрофорез макрорестрикционных фрагментов ДНК отобранных штаммов (макрорестриктаза xbaI) выполнялся одновременно в пластине 1% агарозного геля.

Результаты и обсуждение

Всего среди 35 исследованных штаммов выделено 5 PFGE-типов. Цефотаксим-резистентные микроорганизмы относились к 4 из 5 PFGE-типов (PFGE I — PFGE IV), часть представителей каждого из этих PFGE-типов имели blaCTX-M-гены.

На рис. 1 представлены PFGE-профили пяти выделенных PFGE-типов S.Typhimurium и дендрограмма их генетического родства. Цефотаксим-резистентные CTX-M-5-продуцирующие штаммы имеют различные профили антибиотикорезистентности и относятся к различным PFGE-типам, степень гомологии ДНК которых составляет 85–90%.

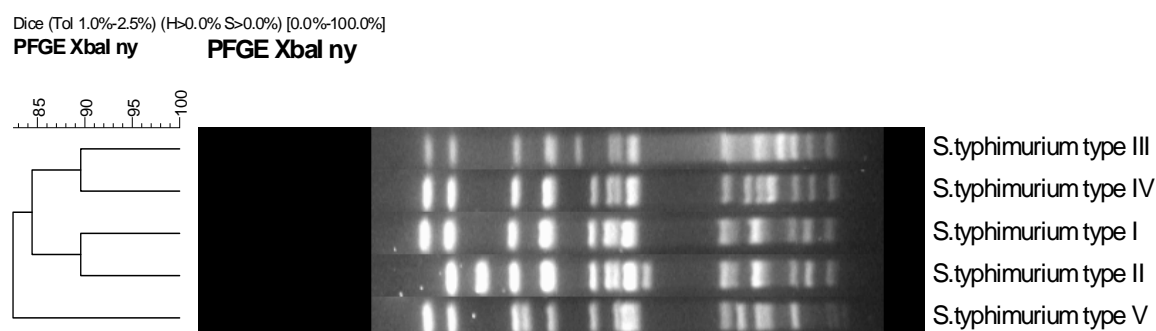


Рис. 1. PFGE-профили и дендрограмма генетического родства штаммов S.Typhimurium.

Результаты PFGE-типирования штаммов S.Typhimurium, выделенных в различных регионах, представлены на рис. 2. Все отобранные штаммы из Гомельского региона относились к типу PFGE I, продуцировали БЛРС (БЛРС CTX M5 и CTX M15) и имели дополнительную устойчивость к гентамицину, нетилмицину, цефотаксиму, налидиксовой

кислоте, триметоприм/сульфаметоксозолу. Отмечены однотипные PFGE-профили всех штаммов из Гомельского региона, что свидетельствует об их клональном происхождении. PFGE-профили этих штаммов отличались от профилей контрольных штаммов S.Typhimurium DT104 (уровень гомологии ДНК 90%).

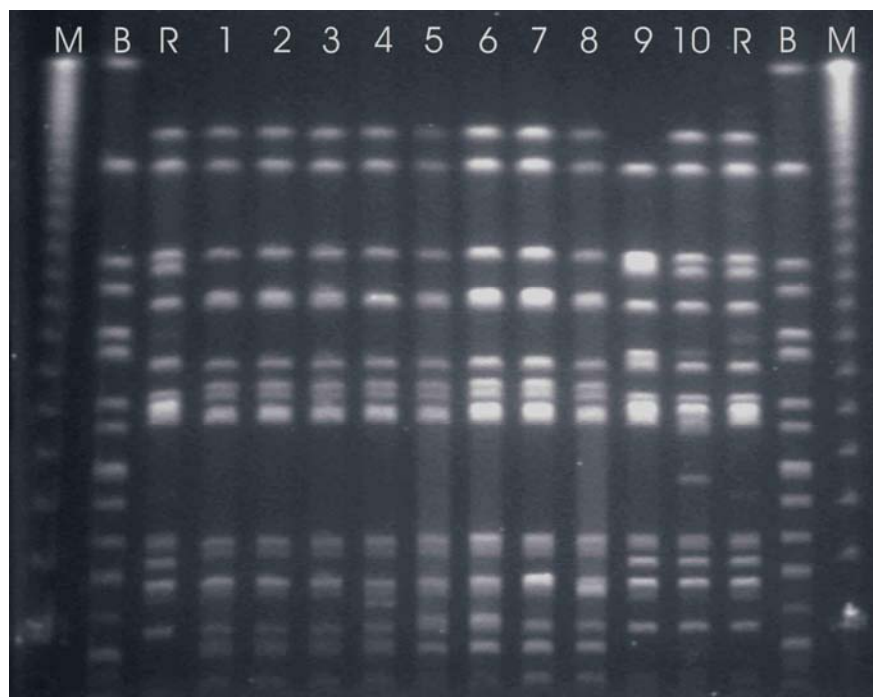


Рис. 2. PFGE-профили *S. Typhimurium*, выделенных в различных регионах:

М — λ -маркер; В — *S. Branderup*; R — *S. Typhimurium* DT 104 референтный штамм 7421659-1; 1–8 — штаммы *S. Typhimurium*, выделенные от детей раннего возраста в Гомельской области; 9 — *S. Typhimurium* DT 104 штамм 2469 (Дания); 10 — *S. Typhimurium* DT 104 штамм 9724913-3 (Германия).

Заключение

Пульс-электрофорез макрорестрикционных фрагментов ДНК *S. Typhimurium* позволил выявить 5 PFGE-типов. Цефотаксим-резистентные микроорганизмы относились к 4 из 5 PFGE-типов (PFGE I — PFGE IV). Обнаружена высокая степень гомологии ДНК цефотаксим-резистентных клонов *S. Typhimurium* (85–90%).

Выделенные в Гомельской области полирезистентные штаммы *S. Typhimurium* с R-типом ACSSuT и дополнительной устойчивостью к гентамицину, нетилмицину, цефотаксиму, налидиксовой кислоте, триметоприм/сульфаметоксозолу, продуцирующие БЛРС, представляют собой единый клон, отличающийся от получившего международное распространение фаготипа *S. Typhimurium* DT104.

ЛИТЕРАТУРА

1. О санитарно-эпидемической обстановке в Республике Беларусь в 2004 году. Государственный доклад / Министерство здравоохранения Республики Беларусь — Мн., 2005. — С. 6–8.

2. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. и др.

Проблемы устойчивости сальмонелл к клинически значимым антибактериальным препаратам // Проблемы здоровья и экологии. — 2005. — № 1. — С. 103–110.

3. Peters T.M., Maguire C., Threlfall E.J., et al.

The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis // Eurosurveillance. — 2003. — № 8. — С. 46–50.

4. Ribot E.M., Wierzbicka R.K., Angulo F.J. Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995 // Emerging Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 8. — P. 387–391.

5. Swaminathan B., Barrett T.J., Hunter S.B., et al.

PulseNet: The molecular subtyping network for food-borne bacterial disease surveillance, United States // Emerg. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 7. — P. 382–389.

6. Threlfall E.J. Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infections // FEMS Microbiology Reviews. — 2002. — Vol. 26. — P. 141–148.

7. Threlfall E.J., Frost J.A. The identification, typing, and fingerprinting of Salmonella: laboratory aspects and epidemiological applications // J. Appl. Bacteriol. — 1990. — Vol. 68. — P. 5–16.