

УДК 616.98:579.842.14]-036.22

А.В. Раков, Ф.Н. Шубин, Н.А. Кузнецова

ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *SALMONELLA ENTERITIDIS*, НЕ СОДЕРЖАЩЕЙ ПЛАЗМИДЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток

Ключевые слова: сальмонеллы, сальмонеллез, плазмиды, молекулярная эпидемиология.

В настоящее время проблема сальмонеллеза продолжает оставаться актуальной. В России и Приморском крае наибольшее этиологическое значение получил серовар *Salmonella enteritidis* [2]. Некоторые серовары сальмонелл, большинство из которых адаптированы к животным, имеют плазмиды вирулентности, которые позволяют им вызывать системные инфекции у мышей. J. Fierer et al. [11] предположили, что плазмиды вирулентности способствуют возникновению сальмонеллезной бактериемии у человека. Данное положение нашло дальнейшее развитие в исследованиях С.-Н. Chiu et al. [8], которые показали, что плазмиды вирулентности могут играть роль в возникновении первичной бактериемии.

Вместе с тем в настоящее время сложилось весьма устойчивое мнение, что для развития гастроинтестинальной формы сальмонеллезной инфекции присутствие в штаммах возбудителя плазмиды вирулентности необязательно [9, 12]. Так, G. Kapperud et al. [14] сообщали о вспышке пищевого сальмонеллеза, вызванной *S. typhimurium*, не содержащей плазмиды вирулентности [14]. Однако недостаточность клинико-эпидемиологических данных в этих работах не позволяет связать проявления инфекции с фенотипическими и плазмидными характеристиками возбудителя и сделать однозначный вывод о их значимости в клинике сальмонеллеза у человека.

Плазмидная характеристика *S. enteritidis* в Приморском крае рассмотрена нами на основе многолетнего наблюдения за популяцией микроба [5]. При этом типирование штаммов выявило значительную гетерогенность популяции *S. enteritidis* по профилю плазмид. Штаммы, изолированные в Приморском крае из различных источников в 1995–2000 гг., распределились на 59 плазмидоваров, среди которых доминирующее значение имели три, маркированные плазмидами 38 MDa, 38:1,4 MDa и 38:2,3 MDa. На их долю пришлось 83,1% всех изолированных культур. С 2000 г. к числу доминирующих был отнесен и плазмидовар 38:4,2 MDa, занявший 4-е место в этиологии сальмонеллеза у человека [6]. Многолетнее наблюдение за реализацией в эпидемическом и инфекционном процессах гетерогенной по плазмидным характеристикам популяции *S. enteritidis* показало, что различным плазмидоварам микроба свойственна характерная для каждого из них динамика заболеваемости и клинические особеннос-

ти [2]. При этом, как показали специально проведенные исследования, плаزمида с молекулярной массой 38 MDa является плазмидой вирулентности, и она отсутствует у 3,8% штаммов [3].

Представленные обстоятельства явились основанием для изучения микробиологической характеристики штаммов *S. enteritidis*, не содержащих плазмиду вирулентности с типичной молекулярной массой 38 MDa, а также эпидемиологических особенностей и клинических проявлений вызванной ими инфекции.

Исследованы штаммы сальмонелл, не содержащие плазмиду вирулентности массой 38 MDa, выделенные в различных районах Приморского края от 160 больных и из 11 проб пищевых продуктов. Идентификацию микроорганизмов осуществляли стандартными методами. Изучение биохимической активности проводили по общепринятой методике с помощью биохимических пластин, дифференцирующих энтеробактерии (ПБДЭ, г. Нижний Новгород). Оценивали ферментацию глюкозы, лактозы, маннита, рамнозы, дульцита, ксилозы, адонита, целлобиозы, сорбита, инозита, меллицитозы, эскулина, раффинозы, гидролиз желатины и мочевины, рост на цитратной и ацетатной средах, наличие β -галактозидазной активности, расщепление лизина и аргинина, продукцию индола, сероводорода, отношение к глицерину по Штерну и подвижность, что позволило составить код биохимической активности штаммов. Чувствительность к 30 антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, тетрациклинам, полимиксином и фторхинолонам) у 108 штаммов оценивали методом диффузии в агаре с помощью бумажных дисков. Поиск плазмид проводили по известному методу [13]. Молекулярную массу определяли по подвижности плазмид в агарозном геле в сравнении с плазмидами pCT105 (7,5 MDa), pCT110 (6,5 MDa), R446b (47 MDa), S-a (26 MDa), pBR322 (2,8 MDa) и плазмидами pVM82 (82 MDa), p4,4 (4,34 MDa) штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* [4]. Наличие плазмиды вирулентности определялось с помощью полимеразно-цепной реакции на ген *spvC*. Использована пара праймеров SpvC-1 и SpvC-2, предложенная С.-Н. Chiu et al. [7], которая гибридизовалась с фрагментом гена *spvC*, локализованным на плазмиде вирулентности (ампликон массой 571 п.о.). В полимеразно-цепной реакции было исследовано 36 штаммов микроба. Данные о клинико-эпидемиологических проявлениях инфекции взяты из 160 историй болезни. Результаты обработаны статистически с использованием критериев Стьюдента [1].

Небольшой объем исследованного материала обусловлен тем, что штаммы *S. enteritidis*, не содержащие плазмиды вирулентности, составили в 1995–2005 гг. всего 3,3% от исследованных. Все штаммы по числу содержащихся в них плазмид можно разбить на три группы: штаммы, не содержащие плазмид, штаммы, содержащие одну плазмиду, и штаммы, содержащие две плазмиды и более. К первой группе относилось всего 65 штаммов (38%), ко второй — 75 (43,9%)

Таблица 1

Частота утраты плазмиды вирулентности массой 38 MDa у штаммов *S. enteritidis*, выделенных от больных людей

Производный плазмидовар, MDa	Кол-во штаммов	Исходный плазмидовар, MDa	Кол-во штаммов	
			абс.	с утратой плазмиды вирулентности, %
Без плазмид	60	38	1089	5,2 ²
1,4	23	38:1,4	1510	1,5 ²
2,3	15	38:2,3	541	2,7 ²
4,2	9	38:4,2	428	2,1 ²
26:1,4	3	38:26:1,4	207	1,4 ²
3,2:2,9:1,4	1	38:3,2:2,9:1,4	155	0,6 ²
2,6:1,4	1	38:2,6:1,4	59	1,7 ²
3,0:1,4	1	38:3,0:1,4 ¹	32	—
50	5	50:38 ¹	15	—
2,3:1,4	2	38:2,3:1,4 ¹	12	—
60	5	60:38 ¹	7	—
60:4,2	1	60:38:4,2 ¹	4	—
Всего:	126	Всего:	4059	3,0

¹ В связи с ограниченным количеством штаммов данных плазмидоваров процентное соотношение не вычислялось.

² Различия между данным плазмидоваром и штаммами, не содержащими плазмид, статистически достоверны.

и к третьей — 31 (18,1%). Кроме того, штаммы *S. enteritidis* можно дифференцировать на низкомолекулярные — содержащие плазмиды молекулярной массы ниже, чем плазида вирулентности 38 MDa, и высокомолекулярные — содержащие плазмиды массой выше 38 MDa.

Анализ спектра *S. enteritidis*, не содержащих плазмиды вирулентности, показал, что среди них ведущее положение занимают штаммы, не содержащие плазмид, а также плазмидоваров 1,4 MDa, 2,3 MDa и 4,2 MDa. На их долю пришлось 66,9% исследованных культур (107 штаммов). Вместе с тем данные штаммы отличаются от штаммов доминирующих плазмидоваров лишь отсутствием плазмиды вирулентности. Следовательно, можно полагать, что формирование подобных штаммов объясняется утратой соответствующей плазмиды у микроорганизмов, ранее ее содержавших. Средняя частота утраты плазмиды вирулентности составила 3%, однако у различных плазмидоваров микроба она варьировала. Наиболее часто утрата плазмиды вирулентности имеет место у штаммов плазмидовара 38 MDa, что привело к образованию 5,2% бесплазмидных штаммов. Этот процесс проходил достоверно реже у плазмидоваров 38:1,4 MDa, 38:2,3 MDa, 38:4,2 MDa, 38:26:1,4 MDa, 38:3,2:2,9:1,4 MDa и 38:2,6:1,4 MDa. Частота образования штаммов, утративших плазмиду вирулентности, у этих плазмидоваров не превышала 2,7% (табл. 1).

Для доказательства отсутствия в штаммах микроба плазмидных генов вирулентности было проведено изучение присутствия в них *spvC*-гена с помощью полимеразной цепной реакции, где праймеры были подобраны к фрагменту *spvC*-гена. Электрофорез проводили в 2% агарозном геле. Все 36 исследуемых штаммов не содержали *spvC*-ген, что указывало на

отсутствие у них плазмиды вирулентности (табл. 2). Контрольная группа из 10 штаммов, содержащих плазмиду 38 MDa, содержала и *spvC*-ген.

Изучение фенотипических свойств штаммов, не содержащих плазмиду вирулентности, показало, что все они, независимо от плазмидного состава, времени и места выделения были однотипными по биохимической активности, то есть ферментировали глюкозу, маннит, арабинозу, мальтозу, дульцит, инозит, сорбит, лизин, аргинин, орнитин, утилизировали цитрат натрия, образовывали сероводород. Они не ферментировали салицин, сахарозу, инозит, лактозу, не утилизировали малонат натрия, не ферментировали фенилаланин, не образовывали ацетилметилкарбинола и индола. Уреазный тест и тест на в-галактозидазную активность были отрицательны. Штаммы *S. enteritidis* были подвижны при температуре 37°C. Анализ антигенной характеристики показал, что все они, независимо от состава плазмид, имели однотипную антигенную формулу — 1,4,12;gm. Исследование антибиотикоустойчивости данных штаммов не выявило никаких отличий от штаммов, содержащих плазмиду вирулентности. Все они были чувствительны ко всем тестируемым антибиотикам.

Таким образом, ген *spvC* не выявлен ни в одном из штаммов, содержащих низкомолекулярные и высокомолекулярные плазмиды. Соответственно, представленные плазмиды не являлись плазмидами вирулентности и, следовательно, штаммы, не содержавшие плазмиды массой 38 MDa, являлись одновременно штаммами, не содержащими плазмиды вирулентности. Присутствие низкомолекулярных и высокомолекулярных плазмид не отражалось на биохимических свойствах, антигенной структуре и антибиотикорезистентности микроорганизма. Следовательно, штаммы, не содержащие плазмиду вирулентности массой 38 MDa, по фенотипическим характеристикам однотипны со штаммами *S. enteritidis*, содержащими эту плазмиду.

Клинические проявления инфекции у 41 пациента, выделившего *S. enteritidis* без плазмиды вирулентности (1-я группа), сравнивалось с таковыми у 131 пациента, выделившего возбудителя с плазмидой 38 MDa (2-я группа). По возрастной структуре в обеих группах преобладали лица работоспособного возраста (от 20 до 59 лет) — 56,1±7,7% в 1-й и 67,2±4,2% во 2-й. Статистически значимых половых различий между группами не зарегистрировано. У всех пациентов отсутствовали хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, а сальмонеллез протекал в виде гастроинтестинальной формы. Больные поступали на 1–2-е сутки от начала заболевания, клиника начиналась с болей в животе, повышения температуры до 38–40°C, общего недомогания, слабости и головной боли.

Были выявлены различия в степени дегидратации и частоте инфекционно-токсического шока. У большинства больных 1-й группы (90,2%) дегидратация

Таблица 2

Биохимическая активность, антигенная структура и наличие *spvC*-гена у штаммов *S. enteritidis*, не содержащих плазмиды вирулентности

Плазмидовар, МДа	Кол-во штаммов	Годы выделения	Код биохимической активности	Антигенная структура	Наличие <i>spvC</i> -гена
Без плазмид	2	1998, 2001	5703117	1,4,12;gm	—
1,4	13	1995–2000	5703117	1,4,12;gm	—
2,3	9	1995–2000	5703117	1,4,12;gm	—
4,2	2	1995, 1999	5703117	1,4,12;gm	—
2,3:1,4	2	1995, 1999	5703117	1,4,12;gm	—
2,6:1,8	1	2000	5703117	1,4,12;gm	—
2,3:2,2	1	2001	5703117	1,4,12;gm	—
3,5:2,7	1	1997	5703117	1,4,12;gm	—
50	3	1995, 1999, 2000	5703117	1,4,12;gm	—
26:1,4	1	2001	5703117	1,4,12;gm	—
52:35	1	1998	5703117	1,4,12;gm	—

отсутствовала или достигала I степени. Напротив, во 2-й группе такая дегидратация была зарегистрирована лишь у 71% больных, тогда как у 29% пациентов ее выраженность достигала II–III степени. Кроме того, выявлены существенные различия и при исследовании кала. Так, у больных 2-й группы слизь и кровь определялись значительно чаще, что указывало на более тяжелые гастроэнтероколитические проявления инфекции. Бактерионосители в первой группе составили $12,2 \pm 5,1\%$, тогда как во второй только $4,6 \pm 1,8\%$.

Следовательно, сальмонеллезная инфекция, вызванная штаммами *S. enteritidis*, не содержащими плазмиды вирулентности, характеризуется более легким гастроэнтеритическим вариантом течения, что проявляется значительным снижением в клинике степени дегидратации и частоты инфекционно-токсического шока, а также высокой частотой бактерионосительства.

Отсутствие связи между наличием в штаммах сальмонелл плазмиды вирулентности и способностью бактерий вызывать гастроэнтеритический синдром характерно и для других сероваров сальмонелл. Описано множество вспышек сальмонеллеза, вызванных различными сероварами сальмонелл, у которых не обнаружены плазмиды вирулентности. Так, J.-Y. D'Aoust [10] описал подобные вспышки, вызванные в различных странах сероварами *S. bareilly*, *S. miami*, *S. oranienburg*, *S. chester*, *S. javiana*, *S. poona*, *S. saint-paul*, *S. goldcoast*, *S. heidelberg*, *S. eastbone*, *S. napoli* и *S. nima*. Все это доказывает возможность того, что плаزمиды вирулентности не являются обязательным условием для возникновения сальмонеллезной инфекции у человека.

Литература

1. Каспарова Т.Ю. Статистические методы в эпидемиологическом анализе. — М.: Медикас, 1994.
2. Раков А.В., Шубин Ф.Н., Иванис В.А. и др. // Эпидемиол. и инфек. болезни. — 2001. — № 5. — С. 50–54.
3. Раков А.В. Микробиолого-клинические параллели при сальмонеллезной инфекции: автореферат дис. ... канд. мед. наук. — Владивосток, 2003.

4. Шубин Ф.Н., Гинцбург А.Л., Китаев В.М. и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 1989. — № 6. — С. 20–25.
5. Шубин Ф.Н., Ковальчук Н.И., Кузнецова Н.А. и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2002. — № 1. — С. 36–40.
6. Шубин Ф.Н., Раков А.В., Кузнецова Н.А. и др. // Актуальные проблемы здоровья населения Сибири. — Омск, 2004. — С. 193–199.
7. Chiu C.-H., Ou J.T. // J. Clin. Microbiol. — 1996. — Vol. 34. — P. 2619–2622.
8. Chiu C.-H., Lin T.Y., Ou J.T. // Microbiol. Immunol. — 1999. — Vol. 43. — P. 899–903.
9. Chiu C.-H., Ou J.T. // Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 32. — P. 520.
10. D'Aoust J.-Y. // Int. J. Food Microbiol. — 1994. — Vol. 24. — P. 11–31.
11. Fierer J., Krause M., Tauxe R., Guiney D. // J. Infect. Dis. — 1992. — Vol. 166. — P. 639–642.
12. Fierer J. // Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 32. — P. 519–520.
13. Kado C.I., Liu S.T. // J. Bacteriol. — 1981. — Vol. 145. — P. 1365–1373.
14. Kapperud G., Gustavsen S., Hellesnes I. et al. // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28. — P. 2597–2601.

Поступила в редакцию 19.06.2006.

FEATURES OF INFECTION BROUGHT ON SALMONELLA ENTERITIDIS WITH NO VIRULENCE PLASMIDS

A.V. Rakov, F.N. Shubin, N.A. Kuznetsova
SBRAMS Research Institute of Microbiology and Epidemiology (Vladivostok)

Summary — During the period from 1995 till 2005 *Salmonella enteritidis* strains with no virulence plasmids reached 3.3% (171 strains) of all the strains under study. As the tests conducted with polymerase chain reaction showed, *S. enteritidis* strains which did not contain plasmids of 38 MDA in weight, had been at the same time those that did not contain virulence plasmids. The plasmids of other molecular weight did not have an effect on phenotypic properties of a microorganism. The *Salmonella* infection provoked by *S. enteritidis* with no virulence plasmids was characterized by milder gastroenteritic clinical course, decreased dehydration rate and infectious toxic shock syndrome, as well as by many cases of the bacteria carrying.

Pacific Medical Journal, 2007, No. 4, p. 21–23.