

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И СУБТИПИРОВАНИЕ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ ТЕХНОЛОГИЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

*Член-корреспондент РАМН ЖЕБРУН А. Б., МУКОМОЛОВ С. Л., НАРВСКАЯ О. В.
ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека,
Санкт-Петербург*

Жебрун А. Б., Мукомолов С. Л., Нарвская О. В. Генотипирование и субтипирование патогенных микроорганизмов в развитии технологий эпидемиологического надзора // Мед. акад. журн. 2009. Т. 9. № 4. С. 59–67. ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14.

Генотипирование и молекулярное маркирование микроорганизмов – основные методические направления современной молекулярной эпидемиологии. В данной статье представлены некоторые результаты фундаментальных и прикладных исследований Санкт-Петербургского института имени Пастера в области молекулярной эпидемиологии. Используются методы: полного и лимитированного секвенирования генов, анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции ДНК, сполитипирование, VNTR-типирование, резистотипирование и др. Получены новые знания о популяционной структуре и доминирующих генотипах микобактерий туберкулеза, коринебактерий дифтерии, хеликобактерий, вирусов гепатитов А, В, С, вирусов папилломы человека, циркулирующих в России, и в частности на северо-западе страны и в Санкт-Петербурге. Выявлена генетическая дивергенция популяции вируса краснухи и вакцинных штаммов полиовируса в условиях массовой вакцинации. Получены прямые доказательства более высокой эффективности методов генотипирования патогенов в эпидемиологической диагностике по сравнению с традиционным эпидемиологическим расследованием.

Ключевые слова: генотипирование микроорганизмов, субтипирование микроорганизмов, эпидемиологический надзор, микобактерии, коринебактерии, хеликобактерии, вирус краснухи, вирусы гепатитов человека, полиовирус, папилломавирус.

Zhebrun A. B., Mukomolov S. L., Narvskaya O. V. Genotyping and subtyping of pathogenic microorganisms in the development of surveillance technologies // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 4. P. 59–67. St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, 197101.

Genotyping and molecular typing of microorganisms are principal methodological directions of modern molecular epidemiology. Some results of basic and applied studies of St. Petersburg Pasteur Institute in the field of molecular epidemiology are presented in this article.

Different methods were used successfully – complete and limited gene sequencing, restriction fragments length polymorphism (RFLP) analysis, spoligotyping, variable number tandem repeats (VNTR) typing, resistotyping and others. New data on population structure and dominating genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Helicobacter pylori* as well as hepatitis A, B and C viruses, human papilloma viruses that circulate in Russia, in the North-Western Region and in St. Petersburg were obtained.

Genetic divergence of rubella virus population and vaccine strains of polioviruses was detected in conditions of routine mass immunizations. Direct evidence of higher efficiency of pathogens genotyping in epidemiological diagnostics was demonstrated in comparison with traditional epidemiological investigations.

Key words: genotyping of microorganisms, subtyping of microorganisms, epidemiological surveillance, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Helicobacter*, rubella virus, hepatitis viruses, poliovirus, human papilloma virus.

Генотипирование и молекулярное маркирование микроорганизмов – основные методические направления современной молекулярной эпидемиологии. С их помощью изучается клональная структура и клональная изменчивость популяций патогенных бактерий, вирусов и других биологических агентов, чем и достигаются главные цели молекулярной эпидемиологии. По состоянию на 24 августа 2009 г. в национальной библиотеке США зарегистрировано

29 603 публикации по вопросам молекулярной эпидемиологии, которые свидетельствуют об интенсивной разработке и фундаментальных и прикладных ее направлений. Эти исследования вносят весомый вклад в разработку крупнейшей проблемы современной науки – проблемы биологического разнообразия. Используются многочисленные маркеры неоднородности популяций микроорганизмов: различия в нуклеотидной последовательности генов, наличие

или отсутствие генов патогенности и вирулентности, полиморфизм генов рибосомных РНК, присутствие в геноме коротких прямых повторов нуклеотидов (direct repeats, DR), варибельных тандемных повторов (variable-number tandem repeats, VNTR), коротких варибельных повторов (interspersed repetitive units, IRU) и др.

Применяется целое семейство эффективных методов генотипирования и молекулярного маркирования: полный или лимитированный сиквенс генов [17, 31], анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции ДНК (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) [32], сполитипирование [21], VNTR-типирование [29], определение мутаций в генах, ассоциированных с резистентностью бактерий к антибиотикам [25] и др. С их помощью показана неизвестная ранее высокая степень гетерогенности популяций актуальных патогенов. В том числе описано несколько десятков генетических семейств (линий) и подсемейств микобактерий туберкулеза (Beijing, Haarlem, LAM, T, Africa и др.) [18]. Определены десятки риботипов *S. diphtheriae* [16], выполнены фундаментальные работы по проблемам генетики, генотипирования и патогенности стрептококков [10], идентифицированы генетические линии вируса краснухи – клайд 1 и 2, в составе которых определено 10 генотипов [33]. Построена новая классификация вирусов гепатитов: гепатита А (HAV) – 7 генотипов [27]; гепатита В (HBV) – 8 основных генотипов [13, 26]; гепатита С (HCV) – 6 главных генотипов, включающих более 100 субтипов [28]. Совместными исследованиями НИИЭМ имени Пастера и Шведского института по контролю инфекционных болезней (Стокгольм) открыто явление межтиповой рекомбинации у вируса гепатита С и идентифицирован первый рекомбинант 2k/1b [19]. Выявлена необычайно широкая варибельность возбудителя гастритов *H. pylori*, интенсивно исследуется связь его генотипов с клиническими исходами гастрита (язва, лимфома, рак) [2, 12].

Накапливаются данные о географическом распределении генотипов этих и других актуальных патогенных агентов. Они открыли совершенно новые возможности для выяснения географического происхождения штаммов возбудителей при заносах инфекции и принятия адресных противоэпидемических мер.

Ситуация с развитием молекулярной эпидемиологии, однако, не лишена парадоксов. К примеру, на мировой арене не зарегистрировано научных журналов по молекулярной эпидемиологии, а ее лучшие достижения остаются, в основном, достоянием научных исследований и медленно проникают в повседневную практику эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями. Один из подобных выдающихся результатов молекулярной эпидемиологии – расследование случая заноса дикого вируса

полиомиелита в Болгарию в 2001 г. в ходе программы ликвидации полиомиелита в Европе. Генотипирование изолятов вируса, выделенных от инфицированных лиц, раскрыло его происхождение из Индии указало на источник инфекции и позволило быстро прекратить ее распространение [34]. Тем самым была снята угроза для сроков ликвидации этого грозного заболевания на всей территории европейского континента. Однако такие специальные экспертные расследования выполняются в ходе отдельных программ и редко отражаются в методических разработках для практики.

В работах Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера методы генотипирования и молекулярного маркирования бактерий и вирусов разрабатываются и используются для решения фундаментальных задач эпидемиологии – изучения эволюции актуальных патогенов и механизмов их генетических перестроек. Не меньшее значение придается и прикладным работам в рамках этого направления – развитию современных подходов к эпидемиологической диагностике и точной идентификации патогенов, источников и факторов их передачи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

1. Изоляты микобактерий туберкулеза (МБТ), выделенные в Санкт-Петербурге и других регионах России от больных туберкулезом легких и от контактных лиц в очагах туберкулеза, – всего 1092 штамма. Изучены методами: сполитипирования [21], IS6110-фингеринтинга [32], MIRU-VNTR-типирования [29], резистотипирования [6, 7, 25].
2. Штаммы коринебактерий дифтерии, выделенные от больных и носителей на территории северо-запада России, в том числе коллекция, собранная в ходе эпидемии 90-х гг., и штаммы текущего периода, – всего 312 штаммов, подвергнуты риботипированию [16] и сполитипированию [23].
3. Изоляты *H. pylori* от больных гастроэнтерологических стационаров Санкт-Петербурга – всего 216 штаммов, были подвергнуты генотипированию и резистотипированию [2, 14, 15].
4. Штаммы и изоляты вируса краснухи (вакцинные штаммы – Wistar RA 27/3, «Орлов-В», изоляты вируса от 13 больных краснухой) подвергнуты сравнительному генотипированию по участку гена E1 [5].
5. Изоляты вируса гепатита А (более 100), выделенные в Санкт-Петербурге в 1997–2007 гг., в том числе от 15 заболевших в ходе крупной пищевой вспышки в Санкт-Петербурге. Участок генома вируса гепатита А (HAV) на стыке VP1/2A генов амплифицировали и подвергли сиквенсу [27].

6. Изоляты вируса гепатита С (HCV), выделенные в Санкт-Петербурге (84 изолята), в том числе от 16 лиц, вовлеченных во внутрибольничную вспышку данной инфекции. Филогенетический анализ изолятов выполнен по данным сиквенса 300 нуклеотидов в области NS5b генома [28].
7. Изоляты вируса гепатита С, выделенные в различных регионах мира (386 штаммов), исследованы с целью изучить распространение рекомбинанта HCV 2k/1b [19].
8. Материалы исследований изолятов вируса гепатита В (HBV), которые проводятся в НИИЭМ имени Пастера перманентно с 90-х гг. с помощью методов ПЦР-RFLP и сиквенса ограниченных участков генома [13, 26].
9. Материал от 729 пациентов с различными заболеваниями урогенитального тракта (мазки из влагалища, уретры и т. п.), обследуемых на инфицированность вирусами папилломы человека. Генотипы вируса определялись с помощью метода одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) с набором реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска, производимых ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией производителя.
10. Изоляты вируса полиомиелита (97 образцов), исследованные специалистами субнациональной лаборатории по диагностике полиомиелита, функционирующей на базе Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера. С целью изучения генетического дрейфа вирусов в ходе программы ликвидации полиомиелита использован метод множественного RFLP-анализа [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о популяционной структуре патогенов. В результате исследований выявлены новые данные о популяционной структуре актуальных для российской и мировой эпидемической ситуации патогенов и доминирующих в России генотипах (субтипах) ряда патогенных бактерий и вирусов.

Российская популяция МБТ, по данным сполитоготипирования, весьма неоднородна по DR-области хромосомы: определено более 80 вариантов сполитоготипов, представляющих различные генетические семейства возбудителя туберкулеза. Превалирует генотип Beijing (более 50% штаммов), но широко представлены и другие генетические семейства (линии) – T1 (сполитоготип R2/53 и его производные), LAM9 (Latin-American-Mediterranean), H4 (Haarlem) (рис. 1).

Генотип Beijing является одним из доминирующих в глобальном эпидемическом процессе туберкулеза. Однако его преимущественная зона распространения – Китай, Индия, Россия и другие страны СНГ. Сопоставление результатов MIRU-VNTR-типирования с опубликованными данными по демографии и филогеографии человека (полиморфизм Y-хромосомы) с учетом известных путей миграции человеческих популяций за последние 60000–100000 лет позволило выдвинуть гипотезу, что генотип Beijing МБТ сформировался в человеческой популяции около 10000 лет назад, вероятнее всего, на территории современного северного Китая и оттуда распространился в восточную и юго-восточную Азию во времена неолита. В Европу и на территорию России штаммы этого генотипа могли проникнуть в XIII в. с войсками Чингисхана [22].

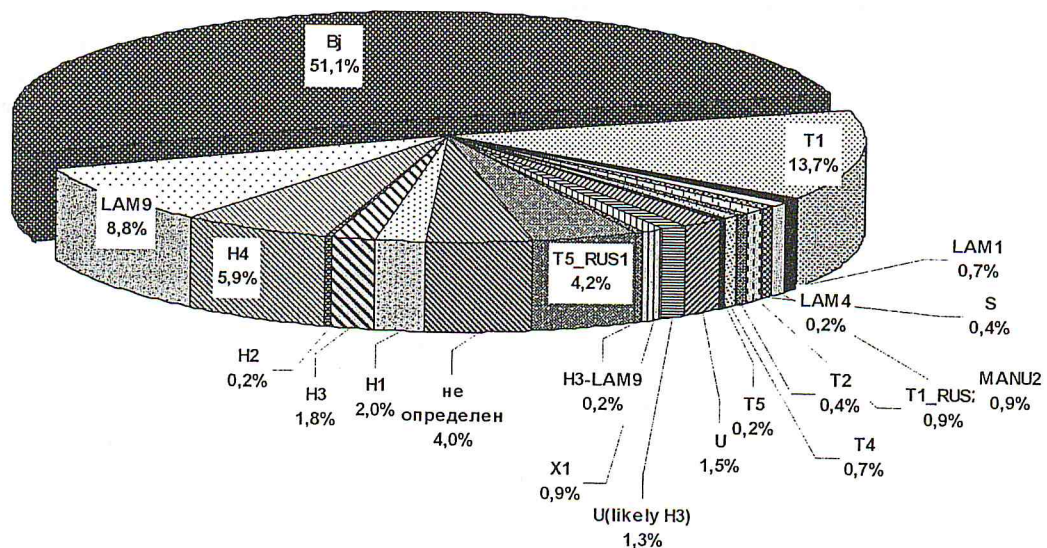


Рис. 1. Структура популяции *M. tuberculosis* (по результатам сполитоготипирования 454 штаммов, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом в Санкт-Петербурге и на северо-западе России, 1997–2007 гг.)

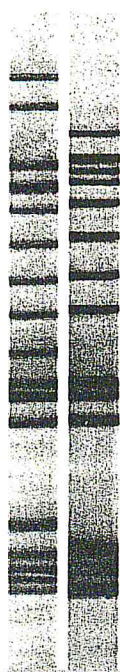


Рис. 2. Профили IS6110-RFLP штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing: B0 – слева; A0 – справа

Вместе с тем у российских штаммов МБТ генотипа Beijing обнаружено более 50 вариантов профилей IS6110-RFLP. Это позволяет сделать вывод о гетерогенности субпопуляции МБТ генотипа Beijing по маркеру IS6110. Наиболее крупные кластеры – B0 и A0 (рис. 2) – генотипа Beijing представляют потенциальную эпидемическую опасность, поскольку более 60% штаммов из этих кластеров являются мультирезистентными за счет определенных мутаций *rpoB531* и *katG315*, обеспечивающих устойчивость к высоким концентрациям рифампицина и изониазида.

Полученные данные, таким образом, помогли вскрыть биологическую причину неблагополучия по заболеваемости туберкулезом – доминирование МБТ генотипа Beijing.

По материалам резистотипирования микобактерий разработаны экспресс-методы контроля их устойчивости к антибиотикам, которые позволяют с первых дней лечения больных индивидуализировать схемы терапии туберкулеза, что недостижимо при классических бактериологических методах контроля антибиотикорезистентности ввиду многодневной продолжительности процесса культивирования микобактерий [6, 7].

Риботипирование *C. diphtheriae* выявило циркуляцию в России, в том числе на северо-западе страны, около 30 риботипов этого возбудителя и отчетливо показало, что популяционная изменчивость и формирование новых доминирующих клонов являются важной составляющей движущих сил эпидемического процесса дифтерии [3]. Эпидемия 90-х гг. XX в. была связана с доминированием биовара *gravis*

риботипов Sankt-Petersburg и Rossija, доля которых в Санкт-Петербурге достигала 80%. С 1995 г. заболеваемость дифтерией в России снижалась. В этот период продолжалась циркуляция штаммов упомянутых риботипов, однако возросла доля токсигенных штаммов биовара *mitis* риботипа Otchakov, что стало причиной новой тенденции к подъему заболеваемости в 2000 г. Наблюдения последнего времени, на фоне резкого снижения заболеваемости дифтерией, указывают на возрастание гетерогенности популяции *C. diphtheriae* и наличие дальнейших изменений в ее структуре. Эти факты, в сочетании с данными о продолжающейся интенсивной циркуляции возбудителя в России, обосновывают необходимость дальнейшего мониторинга риботипов. В дополнение к нему специалистами НИИЭМ имени Пастера разработан метод сполиготипирования коринебактерий [23], позволяющий повысить эффективность расследования очагов дифтерии.

Генотипирование российских изолятов вируса краснухи выявило два важных обстоятельства: а) циркуляцию генотипа вируса 2с, который не распространен в странах Западной Европы; б) достоверное увеличение генетической дивергенции внутри генотипа 2с, что привело к смене подтипа вируса под давлением массовой вакцинопрофилактики этой инфекции.

Показано, что отечественные вакцинные штаммы вируса краснухи, полученные на основе штамма «Орлов» [5], также относятся к генотипу 2с. Следовательно, они более адекватны российской ситуации, чем штамм Wistar 27/3 (генетически относится к 1-й группе вируса краснухи), из которого изготавливаются применяемые в России зарубежные вакцины.

Мониторинг основных генотипов *H. pylori*, циркулирующих в России, обнаружил в составе его популяции 70–80% *sagA*-позитивных штаммов. Это свидетельствует, что популяция бактерии более близка к европейской, чем азиатской [2]. Штаммы-носители генотипа *vac s1m1* составляют 42% исследованной популяции. Генетический контроль кларитромицинрезистентности показал, что идет интенсивная генерация новых резистентных штаммов, в том числе за счет мутаций ранее не описанных в литературе [30]. Значительная распространенность кларитромицинрезистентных штаммов *H. pylori* объясняет низкую частоту эрадикации его в ходе терапии и указывает на необходимость коррекции схем лечения.

Генотипирование вируса папилломы человека показало, что его популяция, циркулирующая в Санкт-Петербурге, содержит значительную долю наиболее онкогенных вариантов: генотипа 16 (8%) и генотипа 18 (19%). Эти данные служат важным основанием для расширения вакцинопрофилактики этой распространенной инфекции.

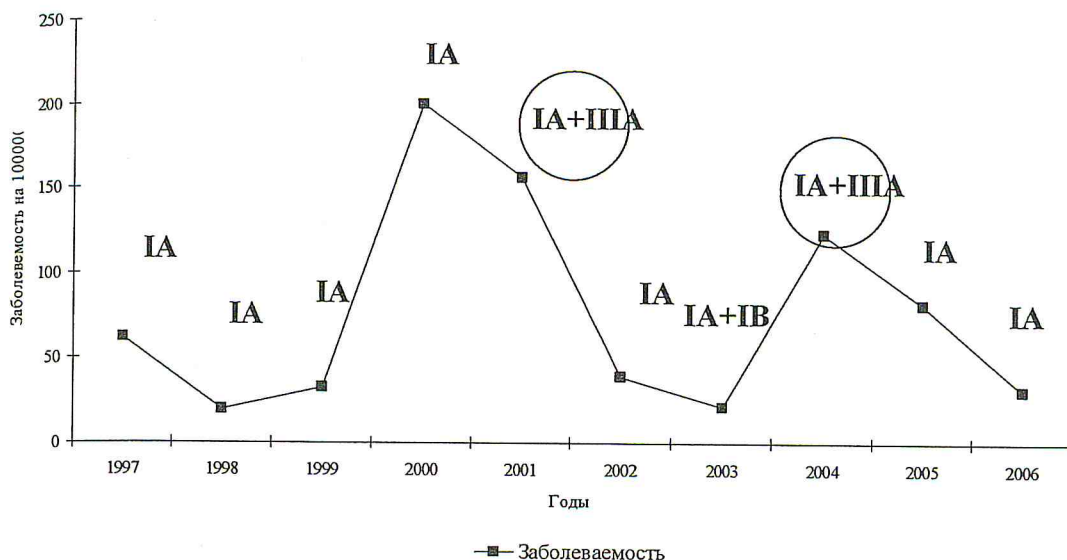


Рис. 3. Заболеваемость гепатитом А и выявленные генотипы HAV в Санкт-Петербурге, 1997–2006 гг.

орых
забо-
этот
помя-
нных
о ста-
евае-
ни, на
рией,
ляции
й в ее
о про-
ителя
ьней-
нему
ботан
, поз-
вания

виру-
ства:
е рас-
вер-
нутри
са под
ой ин-

штам-
гамма
ледо-
уации,
к 1-й
яются

ylori,
оставе
иммов.

более
Штам-
т 42%
итроль
дет ин-
иммов,
ных в
ность
ти объ-
тера-
и схем

елове-
щая в
долю
б (8%)
жным
актики

Популяционная структура вируса гепатита А (HAV) в Санкт-Петербурге, по полученным данным, представлена тремя генотипами: IA, IB и IIIA (рис. 3). Филогенетический анализ показал, что доминировал субгенотип IA, как и в других странах Европы, однако в годы подъема заболеваемости, в 2001 и 2004, появлялся генотип IIIA, характерный для азиатского региона. Географическое происхождение вируса более точно можно будет устанавливать в будущих технологиях эпидемиологического надзора, когда появятся данные о распределении субтипов по странам Азии.

Популяция вируса гепатита В (HBV), циркулирующая в Санкт-Петербурге, по нашим данным, достаточно гетерогенна. Доминирует генотип D (более 90%), кроме него обнаружены изоляты HBV генотипов А (7,6%) и С (1,7%). Последний – прямое

свидетельство импорта инфекции: изоляты HBV генотипа С выявлены только среди выходцев из Юго-Восточной Азии, приехавших в Санкт-Петербург относительно недавно. Генотип HBV, таким образом, может рассматриваться как маркер географического происхождения инфекта.

Изучение распространенности генотипов вируса гепатита С (HCV) в Санкт-Петербурге позволило установить циркуляцию 6 его субтипов: 1a, 1b, 2a, 2c, 3a, 4a. В 1999 г., по усредненным данным, доминировал субтип 1b (54,6%), доля генотипа 3a составляла 36,7%. Однако в среде лиц, употребляющих психотропные вещества внутривенно, доля генотипа 3a достигала 55%, а у больных молодых людей в возрасте до 20 лет этот генотип вируса обнаруживался даже в 67%. Результаты исследований 2007 г. (рис. 4) показали, что доминирующие позиции, вероятно, пе-

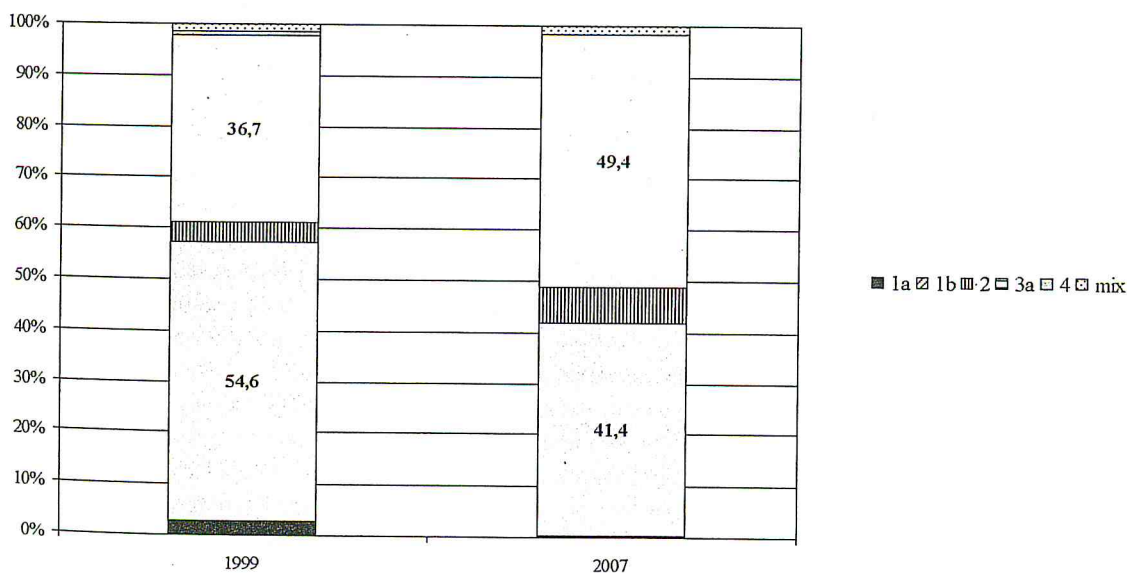


Рис. 4. Структура генотипов вируса гепатита С, выделенных в Санкт-Петербурге в 1999 и 2007 гг.

реходят к субгенотипу 3а (49,4%), а доля субгенотипа 1b снизилась до 41,4%. Микст-инфекция (НСV 1b и 3а) отмечена у 1,6% пациентов. Выявлялись также генотип 2 (7,2%) и субгенотип 1а (0,4%). Последний вариант наиболее распространен на американском континенте, и мы выявляли его у лиц, приехавших из США.

Мониторинг распространенности рекомбинанта 2К/1b НCV показал отчетливую тенденцию его глобального распространения. Помимо Санкт-Петербурга, где он был впервые выявлен в 2002 г., рекомбинант обнаружен в Москве, Сибири, Эстонии, Швеции, Ирландии, Испании. Источниками вируса во всех случаях являлись выходцы из стран СНГ.

Таким образом, полученные данные показывают, что генотипические маркеры могут быть одними из индикаторов изменений в движущих силах эпидемического процесса вирусного гепатита С и индикаторами заноса инфекции из других географических зон.

Исследование генетического дрейфа вакцинных вирусов полиомиелита было предпринято с целью обнаружения вакцинно-родственных полиовирусов (VDPV), которые вирулентны и способны вызывать вакциноассоциированный паралитический полиомиелит (ВАПП). Показано, что в российской популяции штаммов, выделенных от больных ВАПП и острыми вялыми параличами, около 1% изолятов могут быть отнесены к VDPV (имеют более 1% генетической дивергенции с вакцинными штаммами в участке генома VP1). Такая частота существенного дрейфа не превышает обычного уровня для практики применения живой полиомиелитной вакцины. Тем не менее обнаружены еще 4% штаммов, которые можно расценивать как предшественники VDPV, поскольку они имели значительный процент генетических отличий (0,6–0,9%) от вакцинных штаммов в участке генома VP1. Полученные данные послужили одним из оснований для изменения стратегии вакцинопрофилактики полиомиелита: сужения сферы применения живой полиомиелитной вакцины при первичной вакцинации детей и более широкого применения инактивированной полиомиелитной вакцины в национальном календаре прививок [9].

Генотипирование патогенов в целях эпидемиологической диагностики. Позитивный опыт в этом отношении дало исследование очагов туберкулеза и вспышек вирусных гепатитов А и С.

При обследовании 19 «семейных» очагов туберкулеза генотипирование МБТ подтвердило внутрисемейную передачу инфекции лишь в 14 семьях. В 5 случаях выявлено несовпадение IS6110-RFLP профилей изолятов МБТ у разных членов семьи. В результате было проведено дополнительное эпидемиологическое исследование, позволившее выявить внесемейные источники заражения по месту жительства.

В остальных 30 очагах туберкулеза (производственных, внутрибольничных) предположения эпидемиологов об источнике инфекции подтверждены с помощью метода IS6110-RFLP в 25 случаях. В 5 очагах потребовалось расширенное обследование контактных лиц, и в итоге генотипически идентифицированы все источники МБТ, которыми оказались больные соседи по дому из числа социально дезадаптированных лиц.

В расследовании вспышки вирусного гепатита А (115 случаев в течение 1 мес) был применен метод лимитированного сиквенса изолятов вируса в участке генома VP1/2А. Заболевшие проживали в разных районах мегаполиса и работали в территориально разобщенных офисах одной крупной фирмы. От 15 больных были получены образцы сыворотки крови, из 14 образцов удалось выделить РНК HAV и в 10 случаях из 14 – получить последовательности нуклеотидов в амплифицированных участках генома. Установлено, что все 10 изолятов РНК HAV принадлежат к одному субгенотипу 1А. Все изоляты имели очень высокую степень сходства между собой и на филогенетическом дереве группировались в один кластер (изоляты RUS 1/05; RUS 2/05; RUS 4/05; RUS 6/05; RUS 35/05; RUS 37/05; RUS 38/05; RUS 39/05; RUS 40/05; RUS 41/05), что свидетельствовало об их происхождении из одного источника (рис. 5). С помощью традиционных методов эпидемиологической диагностики удалось установить, что вспышка гепатита А среди работников фирмы была связана с употреблением контаминированного салата из свежих овощей, изготовленного одним поставщиком. Далее рассматривались две версии причин контаминации салата: 1) первичное загрязнение овощей канализационными стоками; 2) загрязнение салата человеком – участником изготовления этого продукта. Результаты генотипирования ясно указывали на правильность второй версии, так как контаминация сточными водами привела бы к выявлению не одного, а нескольких генотипов вируса, поскольку в канализационных стоках содержится множество штаммов HAV. Помимо непосредственного практически полезного результата генотипирование в данном случае продемонстрировало важность вакцинации против гепатита А всех лиц, занятых производством и реализацией продуктов питания.

При расследовании внутрибольничной вспышки вирусного гепатита С (8 случаев заболевания) от 5 пациентов получены образцы РНК HCV, которые подвергнуты сиквенсу на участке 300 нуклеотидов в области NS 5b генома. Все изоляты относились к генотипу 1b, оказались чрезвычайно близкими друг к другу и группировались в один кластер. Это указывало на общий для всех больных источник инфекции (рис. 5). Общими факторами риска заражения

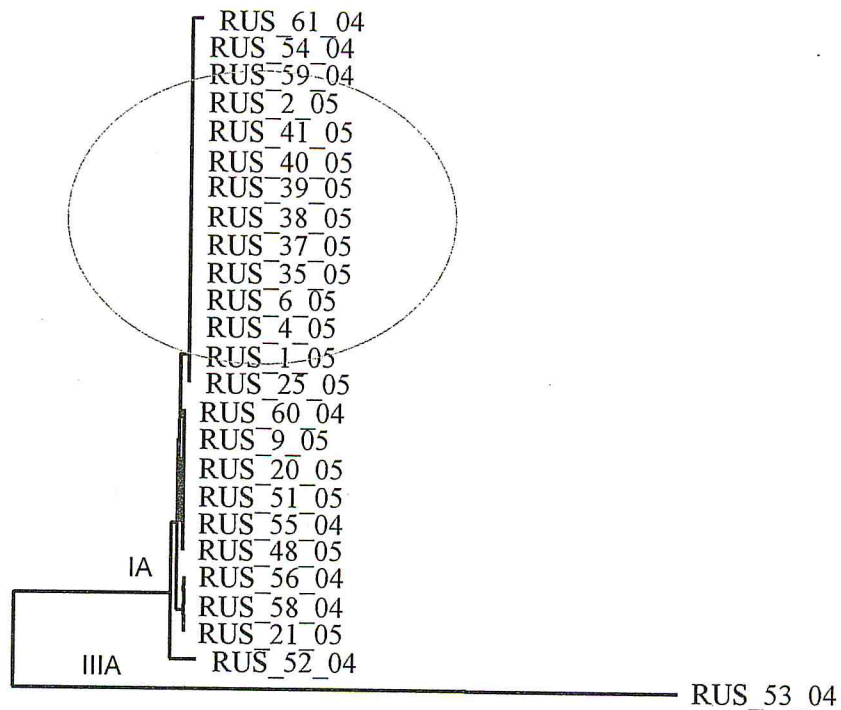


Рис. 5. Генетические взаимоотношения 25 изолятов вируса гепатита А, выделенных в 2004–2005 гг в Санкт-Петербурге и Ленинградской области. Филогенетическое дерево построено на основе сравнения 316 нуклеотидов из региона VP1/2A. В овале показаны изоляты, выделенные от больных, вовлеченных в пищевую вспышку гепатита А

были: 1) переливание крови (в общей сложности от 7 доноров); 2) операционные вмешательства, хотя и выполненные в разные дни и разными бригадами хирургов, однако с участием одного и того же врача-анестезиолога. Обследование не выявило маркеров инфекции у доноров крови и медицинского персонала стационара, где произошла вспышка гепатита С, за исключением врача-анестезиолога. У него обнаружены анти-НСV антитела и выделена РНК НСV, относящаяся к тому же кластеру, что и РНК от больных, вовлеченных во вспышку. Врач-анестезиолог имел на кистях рук признаки экземы и не использовал перчаток при даче наркоза. Указанные обстоятельства являются прямым доказательством, что врач-анестезиолог и послужил источником инфекции при данной вспышке вирусного гепатита С. По результатам проведенной работы были приняты конкретные адресные меры профилактики новых заражений пациентов, и вспышка гепатита С была успешно прекращена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные исследования по изучению биоразнообразия патогенных микроорганизмов восходят в своей основе к трудам О. О. Гартоха, который в 10–30-х гг. XX в. работал в Санкт-Петербурге в

Институте экспериментальной медицины и одновременно – в Институте имени Пастера. Он одним из первых в мировой медицинской микробиологии обратил внимание на внутривидовую гетерогенность патогенных бактерий и пришел к выводу, что она детерминирует особенности клиники и эпидемиологии инфекционных заболеваний (см. [11]). Дальнейшая разработка этой идеи нашла отражение в трудах академика АМН В. И. Иоффе и профессора Э. М. Новгородской. В. И. Иоффе, как и большинство его современников, анализировал серологические маркеры гетерогенности патогенных бактерий, связывая эпидемические подъемы заболеваемости с появлением новых серотипов возбудителей [9]. Вопросам клонального распространения и перестройки популяций патогенов придавал большое значение академик РАМН В. Д. Беляков, который много сделал для инициации исследований по проблемам молекулярной эпидемиологии в России [1]. Методология молекулярной эпидемиологии получила разностороннее развитие в трудах академика РАМН А. А. Тотоляна по проблемам стрептококковых инфекций [10] и в работах других российских школ микробиологии и эпидемиологии. Санкт-Петербургский НИИЭМ имени Пастера ведет работы в области молекулярной эпидемиологии по широкому кругу инфекций с 90-х гг. прошлого века [4].

Современные методы генотипирования бактерий и вирусов во многих областях инфектологии уже пришли на смену методам серотипирования (в классификации *S. diphtheriae*, *H. pylori*, HBV и др.). Этот процесс, вероятно, будет продолжаться и дальше (там, где это действительно оправдано), поскольку генотипирование вскрывает базовые особенности патогенов, позволяет систематизировать возникающие их перестройки, а часто и предсказать ожидаемые результаты этих перестроек для фенотипических, антигенных и патогенных свойств бактерий и вирусов.

Новые знания о популяционной структуре патогенных микроорганизмов, полученные с помощью методов генотипирования бактерий и вирусов, создают отправные позиции для дальнейшего углубленного мониторинга эпидемического процесса.

Эти знания востребованы и в анализе глобальных изменений эпидситуации и в расследовании локальных вспышек и очагов инфекционных заболеваний, как это показано на представленных примерах эпидемиологической диагностики при туберкулезе, вирусном гепатите А, вирусном гепатите С.

Генотипирование и субтипирование патогенов открывают ранее неизвестные процессы генетических перестроек в составе популяций микроорганизмов и в перспективе способны заблаговременно выявлять риски возникновения их новых эпидемических клонов и линий. В этом отношении методы генотипирования бактерий и вирусов становятся важным и чувствительным инструментом противоэпидемической настороженности.

По представленным выше данным, методы генотипирования микроорганизмов оказались, *во-первых*, полезными для решения стратегических задач современной эпидемиологии. Об этом свидетельствует пример коррекции календаря прививок путем расширенного применения инактивированной полиомиелитной вакцины и некоторого ограничения оральной (живой) полиомиелитной вакцины при первичной иммунизации детей. Важным основанием для этого послужили данные о генетической нестабильности вакцинных полиовирусов Сэбина и возможности возникновения вакцинно-родственных патогенных вариантов полиовирусов в ходе массовых кампаний вакцинации.

И, *во-вторых*, методы генотипирования и молекулярного маркирования микроорганизмов уже дали прямые доказательства своей более высокой информативности и достоверности при идентификации источников инфекции, чем методы традиционного эпидемиологического расследования.

Методология генотипирования в интересах молекулярной эпидемиологии переживает явный подъем в разных странах. Ее дальнейшие перспективы связа-

ны с получением данных о циркулирующих генотипах по всем регионам земного шара, созданием полных баз данных о циркулирующих генотипах и внедрением этой методологии в повседневные стандарты диагностики и эпидемиологического надзора.

Литература

1. Беляков В.Д., Каминский Г.Д. Молекулярная эпидемиология // Будущее науки. М., 1988. Т. 21. С. 172–184.
2. Жебрун А.Б. Инфекция *Helicobacter pylori*. СПб.: Феникс, 2006.
3. Жебрун А.Б., Лялина Л.В., Бичурина М.А. и др. Проблемы контроля инфекционных заболеваний. СПб.: Русь, 2003.
4. Инфекционная заболеваемость в Северо-Западном федеральном округе России / А.Б. Жебрун (ред.). СПб.: Феникс, 2007.
5. Лаврентьева И.Н., Семериков В.В., Жебрун А.Б. и др. Краснуха в России: изменчивость возбудителя в период вакцинопрофилактики инфекции // Журн. микробиол. 2003. № 3. С. 26–31.
6. Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Нарвская О.В., Вишневский Б.И. Способ экспрессного определения устойчивости к рифампицину у микобактерий туберкулеза. Патент 2287586. 2006.
7. Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Нарвская О.В., Вишневский Б.И. Способ экспрессного определения устойчивости к изониазиду у микобактерий туберкулеза. Патент 2339040. 2008.
8. Онищенко Г.Г., Дроздов С.Г., Грачев В.П. и др. Проблемы ликвидации полиомиелита. СПб.: Феникс, 2008.
9. Опыт борьбы с дифтерией в Ленинграде / В.И. Иоффе (ред.). Л.: Медгиз, 1962.
10. Тотолян А.А., Суворов А.Н., Дмитриев А.В. Стрептококки группы В в патологии человека. СПб.: Человек, 2009.
11. Хазенсон Л.Б. Становление, развитие и перспектива исследований по проблеме «Кишечные инфекции» в Петроградском-Ленинградском-Санкт-Петербургском НИИЭМ имени Пастера // Актуальные проблемы инфекционной патологии. Ч. I / СПб НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. СПб., 1993. С. 3–5.
12. Ando T., Peek R.M., Pride D. et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 Reflect Geographic Origin and Correlate with *cagA* Status // J. Clin. Microbiol. 2002. Vol. 40. № 1. P. 239–246.
13. Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B., Magnus L. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America // J. Gen. Virol. 2002. Vol. 83. P. 2059–2073.
14. De Francesco V., Margiotta M., Zullo A. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori* // Ann. Intern. Med. 2006. Vol. 144. № 2. P. 94–100.

15. Garrido L., Toledo H. Novel genotypes in *Helicobacter pylori* involving domain V of the 23S rRNA gene // *Helicobacter*. 2007. Vol. 12. № 5. P. 505–509.
16. Grimont P., Grimont F., Efstratiou A. et al. International nomenclature for *Corynebacterium diphtheriae* ribotypes // *Res. Microbiol.* 2004. Vol. 155. № 3. P. 162–166.
17. Holm-Hansen C., Vainio K. Sequencing of viral genes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 551. P. 203–215.
18. Houben R.M., Glynn J.R. A systematic review and meta-analysis of molecular epidemiological studies of tuberculosis: development of a new tool to aid interpretation // *Trop. Med. Int. Health.* 2009. Vol. 14. № 8. P. 892–909.
19. Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., and Magnus L.O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg // *J. Virology.* Vol. 76. № 8. P. 4034–4043.
20. Kalinina O., Norder H., Magnus L. Full-length open reading frame of a recombinant hepatitis C virus strain from St Petersburg: proposed mechanism for its formation // *J. Gen. Virol.* 2004. Vol. 85. P. 1853–1857.
21. Kamerbeek J., Schouls A., Kolk M. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *J. Clin. Microbiol.* 1997. Vol. 35. P. 907–914.
22. Mokrousov I., Ly H., Otten T. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography // *Genome Res.* 2005. Vol. 15. № 10. P. 1357–1364.
23. Mokrousov I., Narvskaya O., Limeschenko E., Vyazovaya A. Efficient discrimination within a *Corynebacterium diphtheriae* epidemic clonal group by a novel microarray-based method // *J. Clin. Microbiol.* 2005. Vol. 43. № 4. P. 1662–1668.
24. Narvskaya O., Mokrousov I., Otten T., Vishnevsky B. Molecular markers: application for studies of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia // *Trends in DNA fingerprinting research* / ed. M.M. Read. Nova Science Publishers. NY, USA. 2005. P. 111–125.
25. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E. et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002. Vol. 21. № 8. P. 596–602.
26. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R.I. et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes // *J. Gen. Virol.* 1988. Vol. 69. P. 2575–2583.
27. Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B. et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions // *J. Gen. Virol.* 1992. Vol. 73. P. 1365–1377.
28. Simmonds P., Holmes E.C., Cha T.A., Chan S-W. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region // *J. Gen. Virol.* 1993. Vol. 74. P. 2391–2399.
29. Supply P., Magdalena J., Himpens S., Loch C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 26. P. 991–1003.
30. Tarasova E.A., Suvorova M.A., Svarval A.V. et al. Molecular genetic analysis of 23S RNA mutations associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated in St. Petersburg, Russia // *ECCMID.* 2008. P. 830.
31. Tettelin H., Feldblyum T. Bacterial genome sequencing // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 551. P. 231–247.
32. Van Embden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // *J. Clin. Microbiol.* 1993. Vol. 31. P. 406–409.
33. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Second edition. Geneva, 2006.
34. World health organization. Imported wild poliovirus causing poliomyelitis, Bulgaria, 2001 // *Weekly epidemiological record.* 2001. Vol. 76. № 43. P. 332–335.
35. Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration // *Clin. Microbiol. Infect.* 2009. Vol. 15. № 9. P. 829–834.