

Зуева Л.П., Гончаров А.Е.

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
г. Санкт-Петербург

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: КОНТУРЫ БУДУЩЕГО

В статье обсуждаются вопросы использования молекулярно-генетических методов в эпидемиологии, в частности, рассматриваются точки приложения молекулярно-генетического мониторинга в эпидемиологической диагностике и надзоре за инфекционными заболеваниями. На примере возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, рассмотрена роль различных генетических процессов в формировании эпидемических штаммов (клонов) возбудителей инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: молекулярная эпидемиология; генотипирование; эпидемические клоны.

Zueva L.P., Goncharov A.E.

North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF INFECTIOUS AGENTS: FUTURE PROSPECTS

The article discusses the issues of usage of molecular genetic methods in epidemiology. In particular, it is devoted to the applications of molecular genetic monitoring in the epidemiological diagnostics and infection surveillance. The role of various genetic processes in the formation of epidemic strains (clones) of infectious agents is considered, basing on the analysis of healthcare-associated infections (HAIs).

Key words: molecular epidemiology; genotyping; epidemic clones.

Развитие и активное внедрение в медицинскую практику геномных и постгеномных технологий становится в настоящее время все более очевидным фактом. Принятая Правительством РФ

«Стратегия развития медицинской науки в РФ до 2025 года» относит геномику, протеомику, эпигеномику и биоинформатику к числу приоритетных направлений развития медицины [1].

Необходимость внедрения современных технологий молекулярной биологии в систему эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями также не вызывает сомнений и находит отражение в нормативных и методических документах, принимаемых Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Так, например, в «Национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» в качестве мероприятий, направленных на совершенствование лабораторной диагностики и мониторинга возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), предлагаются мероприятия, направленные на «расшифровку генома актуальных возбудителей ИСМП, циркулирующих в учреждениях здравоохранения; создание референс-лабораторий, обеспечивающих ... проведение дорогостоящих и технически сложных исследований, включая молекулярно-генетическое типирование» [2].

Изучение изменений популяционной структуры микроорганизмов, определяющих ход эпидемического процесса, является предметной областью молодой и стремительно развивающейся молекулярной эпидемиологии инфекционных заболеваний.

Развитие молекулярной эпидемиологии определяется нарастающим многообразием патогенных вариантов микроорганизмов, происходящим вследствие глобальных социальных и экологических процессов, затрагивающих современное общество.

Высказана точка зрения о том, что в современных условиях формируется «система риска», требующая постоянных мониторинговых исследований за популяцией возбудителя. Основными «точками приложения» подобных мониторинговых исследований являются следующие явления и процессы:

- 1) возникновение новых эпидемических клонов;
- 2) антибиотикорезистентность за счет хромосомных и внехромосомных механизмов приобретения;
- 3) дивергенция с вакцинными штаммами и потеря актуальности вакцин;
- 4) реверсия патогенности живых вакцин;
- 5) маскировка патогенов вследствие межвидовой рекомбинации;
- 6) появление новых онкогенных генотипов бактерий и вирусов и усиление их циркуляции;
- 7) возврат ликвидированных и ликвидируемых инфекций вследствие заноса возбудителей из эпидемиологически неблагополучных регионов мира [3].

Исходя из обозначенных выше задач очевидно, что диагностические возможности молекулярно-генетических методов в эпидемиологии не исчерпываются использованием их для выявления источников инфекции и факторов передачи возбудителя во вре-

мя эпидемических вспышек. Основным назначением молекулярно-генетических методов в эпидемиологии, с нашей точки зрения, должно стать слежение за популяционной структурой возбудителей инфекционных болезней с целью оценки, прогнозирования эпидемической ситуации и обоснования своевременного вмешательства в ход эпидемического процесса, то есть, молекулярно-генетический мониторинг.

Молекулярно-генетический мониторинг позволяет выявить два основных процесса, которые могут привести к развитию эпидемически значимых событий — занос (завоз) возбудителя в популяцию риска извне или направленную перестройку популяции возбудителя *in situ* (спонтанный генетический дрейф).

ЗАНОС ВОЗБУДИТЕЛЯ

Особую угрозу при заносе представляют международные эпидемические (пандемические) клоны, которые, благодаря вирулентным свойствам, повышенной контагиозности и устойчивости к антибиотикам, способны преодолевать большие расстояния и охватывать обширные популяции людей, находящихся в разных странах и на разных континентах. Международные эпидемические клоны известны у возбудителей инфекций с воздушно-капельным (дифтерия, туберкулез, стрептококковые инфекции), фекально-оральным (энтерогеморрагические серотипы кишечной палочки, ротавирусные и норовирусные инфекции), контактным (гонорея, ВИЧ) механизмами передачи, а также для возбудителей внутрибольничных инфекций. Систематическое слежение за популяционной структурой позволяет своевременно идентифицировать факт заноса на изучаемую территорию эпидемических клонов и связанной с ним активизации эпидемического процесса. Так, например, при слежении за популяцией вируса гепатита А отмечены случаи завоза подтипа 1В, эндемичного для Северной Африки, туристами, отдыхающими в Египте, а также зафиксирован завоз с миграционными потоками из Средней Азии с последующим эпидемическим распространением подтипа 3А [4]. Нами, с использованием методов пульс-электрофореза и спариквенстипирования, на территории Северо-Запада России выявлен эпидемический клон метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* BT2007 spa-типа t008, предположительно занесенный на территорию России из Финляндии [5].

НАПРАВЛЕННАЯ ПЕРЕСТРОЙКА ПОПУЛЯЦИЙ (ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ДРЕЙФ)

К настоящему времени накоплены значительные данные об изменениях в структуре популяции возбудителя, наблюдающихся в ходе эпидемического процесса и не связанных с заносом штаммов извне.

Такие изменения могут быть следствием воздействия вакцин или применения лечебных препаратов. Например, установлено, что точечные мутации (SNP) в гене патогенности *rpn* (пертактин) возбудителя коклюша позволяют последнему преодолевать защитное

Корреспонденцию адресовать:

ГОНЧАРОВ Артемий Евгеньевич,
195067, г. Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47.
Тел.: 8 (921) 302-94-65; факс: 8 (812) 544-00-94.
E-mail: phage1@yandex.ru

действие вакцин [6]. Широкое распространение штаммов *Bordetella pertussis*, несущих мутантные аллели данного гена, является следствием массовой вакцинации АКДС, причем в России отмечен значительный рост частоты обнаружения таких штаммов [7].

С другой стороны, накапливаются данные, позволяющие утверждать, что в ряде случаев изменения популяционной структуры возбудителя происходят без очевидного участия внешних причин.

Авторы теории саморегуляции паразитарных систем [8] постулируют закономерную цикличность изменений генотипического и фенотипического разнообразия популяции возбудителя, соответствующую периодам эпидемического распространения и периодам снижения заболеваемости. Представляется весьма целесообразным использовать изменения генетической гетерогенности популяции возбудителя для прогнозирования тенденций эпидемического процесса и своевременного вмешательства в его ход.

Особый интерес в этой связи представляют популяции нозокомиальных патогенов, в которых, ввиду складывающихся в стационарах экологических условий (концентрация в одном месте восприимчивых иммунокомпромированных пациентов, интенсивное перекрестное инфицирование, широкое использование антибиотиков), можно предположить наибольшую интенсивность процессов формирования новых генетических вариантов возбудителей.

В отношении возбудителей госпитальных инфекций важным, в связи с обсуждаемой проблемой, является вопрос о связи степени генетической неоднородности популяции возбудителя и активности эпидемического процесса.

В процессе исследования клинических изолятов метициллин-резистентных стафилококков (далее MRSA) было выявлено большое разнообразие пульс-электротипов и подтипов, циркулирующих в стационарах. Так, например, среди 183 изолятов единственного эпидемического штамма, определенного методом пульс-электрофореза («штамм А»), из 8 португальских больниц, было выявлено 28 подтипов [9]. Подобный феномен наблюдался и в одной из барселонских больниц, в которой штамм, обусловивший вспышку, «сгенерировал» восемь отличных друг от друга подтипов. При этом бактерии, сохраняли свой пульсэлектротип после астрономически большого числа делений *in vitro* при пассировании на неселективных средах [10]. Молекулярная природа этой внутриклональной изменчивости *in vivo* неизвестна. По-видимому, изменения паттернов пульс-электрофореза подразумевают приобретение или потерю продолжительных участков ДНК (например, при встраивании или потере транспозонов или умеренных бактериофагов). Установлено, что эти события происходят в эпидемически «спокойный» период эпидемического процесса, в час-

тности, в спокойные периоды хронических эпидемий, когда отмечена наибольшая генетическая гетерогенность бактериальной популяции. Данные ситуации контрастируют с появлением одиночных доминирующих клонов при острых вспышках [11]. Таким образом, и в отношении стафилококковой инфекции мы наблюдаем чередование периодов повышенной генетической гетерогенности с периодами клонального распространения.

При использовании для анализа эволюционных изменений генома метициллин-резистентного стафилококка комбинации двух методов генотипирования: пульс-электрофореза и метода RAPD — ПЦР [12], было установлено, что локальные вспышки стафилококковой инфекции обусловлены субклональными изменениями, когда внутри одного пульс-электротипа отмечается генерация вариантов, различающихся по профилю RAPD-типирования, при этом различия между штаммами, вызвавшими локальные вспышки в различных стационарах, более существенны и могут быть зафиксированы обоими методами типирования.

Крупные геномные перестройки в бактериальных популяциях возникают, как правило, вследствие горизонтального генетического обмена. Генетическими элементами, с приобретением которых могут быть связаны изменения в эпидемиологии возбудителя, являются плазмиды, умеренные бактериофаги, геномные острова (в том числе острова патогенности), интегроны и транспозоны.

В литературе неоднократно описаны случаи, когда формирование вспышечного (эпидемического) штамма происходило вследствие приобретения возбудителем дополнительной информации путем горизонтального генетического обмена, в том числе, происходящего между разными видами и родами микроорганизмов. Данные наблюдения также, в основном, относятся к возбудителям ИСМП.

Nashwan Al Naiemi с сотрудниками [13] наблюдали в реанимационном отделении стационара 2 последовательные вспышки: хроническую, обусловленную *Enterobacter cloacae*, и острую, вызванную *Acinetobacter baumannii*. В культурах обоих микроорганизмов была обнаружена одна и та же плаزمида SHV-12, детерминирующая синтез β -лактамазы расширенного спектра действия и определяющая устойчивость к цефалоспорином и аминогликозидам, т.е. можно предположить, что формированию госпитального штамма ацинетобактер способствовал горизонтальный генетический обмен с приобретением плазмиды.

Ana Mena с соавт. [7] предположили, что появление карбапенем-устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae* в ходе вспышки в реанимационном отделении связано с выключением синтеза поринового белка OmpK36 в связи с встраиванием в геном возбудителя инсерционной вставки IS26.

Сведения об авторах:

ЗУЕВА Людмила Павловна, доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, СЗГМУ им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург, Россия.

ГОНЧАРОВ Артемий Евгеньевич, канд. мед. наук, доцент, кафедра эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, СЗГМУ им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: phage1@yandex.ru

Возможная эпидемиологическая роль транспозонов была продемонстрирована на примере вспышки инфекции, обусловленной ванкомицин-резистентными энтерококками, охватившей 2 гематологических отделения (детское и взрослое) в многопрофильной больнице города Гданьска (Польша). Возникновение вспышки связывают с приобретением непатогенными штаммами энтерококков транспозона Tn1546, содержащего гены устойчивости к ванкомицину. Транспозон обнаруживался во вспышечных штаммах нескольких пульс-электротипов в различных генетических вариантах [14].

В настоящее время известно, что большая часть генов, являющихся факторами патогенности, располагается на хромосомах отдельных кластерами из функционально связанных групп генов внутри дискретных и часто имеющих чужеродное происхождение участков ДНК, в так называемых «островах патогенности». Данные генетические элементы играют исключительно важную роль в эволюции эпидемических вариантов возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе и возбудителей ИСМП.

Наши наблюдения (Любимова А.В., Гончаров А.Е., Зуева Л.П., 2011) показывают, что занос в стационар штамма возбудителя, имеющего отдельные острова патогенности, может быть ассоциирован с более тяжелыми эпидемиологическими последствиями, чем занос штамма не имеющего данной генетической структуры.

В частности, штамм *Acinetobacter baumannii*, имеющий ген гемолизина — токсина RTX — фрагмент острова патогенности GI18, вызвал вспышку с большей летальностью и более выраженной тяжестью клинических проявлений инфекции, чем штамм без этого фрагмента (табл.).

Еще одной важной мишенью для молекулярно-генетического мониторинга являются гены вирулентности, ассоциированные с умеренными бактериофагами. Благодаря широкому распространению и мобильности, бактериофаги способны быстро приводить к микроэволюционным преобразованиям в популяциях патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Широко известна роль бактериофагов в формировании токсигенных вариантов дифтерийных коринебактерий, вирулентных штаммов *Vibrio cholerae*, *Streptococcus haemolyticus*, *Bordetella pertussis*, энтерогеморрагических штаммов *Escherichia coli*. Среди возбудителей нозокомиальных инфекций отмечена возможность формирования госпитальных штаммов с участием бактериофагов. Так, например, уро-

Таблица
Основные эпидемиологические показатели при вспышках, вызванных штаммами *Acinetobacter baumannii* с различными генетическими свойствами

Показатель	Вспышка 1	Вспышка 2
Генетическая характеристика	Клон 1, отсутствует фрагмент острова патогенности GI18, несущий ген гемолизина - токсина RTX	Клон 2, идентифицирован фрагмент острова патогенности GI18, несущий ген гемолизина - токсина RTX
Инфицировано на 100 пациентов	14	12,8
% манифестных форм	25	59,1
Клинические формы инфекции	Инфекция нижних дыхательных путей	Инфекции кровотока, инфекции нижних дыхательных путей, инфекции в области хирургического вмешательства
Факторы передачи	Наркозно-дыхательная аппаратура	Разнообразие факторов передачи
Летальность (%)	-	25

патогенные штаммы кишечной палочки, склонные к эпидемическому распространению, как правило, обладают фаговым геном вирулентности c2418 [15].

Таким образом, по-видимому, генетическая гетерогенность популяций бактериальных возбудителей поддерживается как за счет «внутренних» механизмов саморегуляции популяции, предполагающих интеграцию в геном мобильных генетических элементов, так и за счет заноса нерезидентных штаммов. Перспективы будущих исследований, как нам представляется, связаны с изучением популяционной динамики микроорганизмов, а также за изучением закономерностей циркуляции мобильных генетических элементов.

Учитывая, что генетическая изменчивость микроорганизмов проявляется как количеством циркулирующих генетических вариантов, так и наличием отдельных высококонтагиозных или высоковирулентных генотипов, основными компонентами молекулярно-генетического мониторинга должны быть следующие мероприятия:

- 1) определение степени генетической гетерогенности или гомогенности популяции;
- 2) оценка частоты встречаемости штаммов, несущих важные с эпидемиологических позиций гены вирулентности (например, ген дифтерийного токсина при надзоре за дифтерией, ген *Bordetella pertussis*, кодирующий синтез пертактина, при надзоре за коклюшной инфекцией и т.п.) или устойчивости к антимикробным препаратам;
- 3) идентификация эпидемических (пандемических) штаммов, в том числе международных эпидемических клонов и слежение за их циркуляцией.

Information about authors:

ZUEVA Lyudmila Pavlovna, doctor of medical sciences, professor, head of the department of epidemiology, parasitology and disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St.-Petersburg, Russia.

GONCHAROV Artemiy Evgenjevitch, candidate of medical sciences, docent, department of epidemiology, parasitology and disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St.-Petersburg, Russia. E-mail: phage1@yandex.ru

Для организации молекулярно-генетического мониторинга в предложенном варианте принципиально важным является наличие работающей системы референсных лабораторий, выполняющих функции

слежения за молекулярно-генетической структурой популяции возбудителя и координирующих противоэпидемические мероприятия на региональном и национальном уровнях.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Распоряжение Правительства РФ от 28 декабря 2012 г. № 2580-р.
2. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2011.
3. Жебрун, А.Б. Биоразнообразие и эволюция циркулирующих популяций бактерий и вирусов. Новые проблемы медицинской микробиологии /А.Б. Жебрун, С.Л. Мукомолов, О.В. Нарвская //Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2011. – № 5. – С. 93-98.
4. Mukomolov, S. Increased circulation of hepatitis A virus genotype IIIA over the last decade in St Petersburg, Russia /S. Mukomolov, M. Kontio, N. Zheleznova //J. Med. Virol. – 2012. – V. 84(10). – P. 1528-1534.
5. Зуева, Л.П. Эпидемический штамм метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* в стационарах Санкт-Петербурга /Л.П. Зуева, А.Е. Гончаров, В.В. Колоджиева //Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2010. – № 5. – С. 24-29.
6. Lam, C. Selection and emergence of pertussis toxin promoter ptxP3 allele in the evolution of *Bordetella pertussis* /C. Lam, S. Octavia, Z. Bahrame //Infect. Genet. Evol. – 2012. – V. 12(2). – P. 492-495.
7. Mena, A. Characterization of a Large Outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and Mechanisms Leading to In Vivo Carbapenem Resistance Development /A. Mena, Plasencia //J. Clin. Microb. – 2006. – V. 44, № 8. – P. 2831-2837.
8. Беляков, В.Д. Саморегуляция паразитарных систем: молекулярно-генетические механизмы /В.Д. Беляков, Д.Б. Голубев, Г.Д. Каминский. – Л.: Медицина, 1987. – 238 с.
9. Sousa, A. Characterization of MRSA isolates from Portuguese hospitals by multiply genotyping techniques /A. Sousa, Santos M. I. Sanches, van A. Belcum //Microb. Drug. Resistance. – 1996. – № 2(3). – P. 331-341.
10. Dominguez, M.A. Spread and maintenance of a dominant MRSA clone during an outbreak of a MRSA disease in a Spanish hospital /M.A. Dominguez, de H. Lancaster, J. Linarez //J. Clin. Microb. – 1994. – V. 32. – P. 2081-2087.
11. Sousa A. Multi-drug resistant Iberian epidemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endemic in a hospital in northern Portugal /A. Sousa, Santos M.I. Sanches, L. Sobral //Microb. Drug. Resistance. – 1996. – № 1. – P. 299-306.
12. Van Leeuwen, W. Genetic diversification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a function of prolonged geographic dissemination and as measured by binary typing and other genotyping methods /van W. Leeuwen, van A. Belkum, B. Kreiswirth //Res. Microbiol. – 1998. – V. 149(7). – P. 497-507.
13. Naiemi, N.A. Widespread Transfer of Resistance Genes between Bacterial Species in an Intensive Care Unit: Implications for Hospital Epidemiology /N.A. Naiemi, B. Duim, P.H. Savelkoul //J. Clin. Microb. – 2005. – V. 43, N 9. – P. 4862-4864.
14. Kawalec, M. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdansk, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains /M. Kawalec, M. Gniadkowski, W. Hryniewicz //J. Clin. Microb. – 2000. – V. 38, N 9. – P. 3317-3322.
15. Асланов, Б.И. Эпидемиологические особенности формирования патогенных свойств *E. coli* в урологическом стационаре /Б.И. Асланов, А.А. Долгий, А.Е. Гончаров //Профил. и клин. медицина. – 2012. – № 1. – С. 117-121.

