

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ ВИДА *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* СЕРОТИПА В, ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕГИОНАХ РОССИИ

Миронов К.О., Платонов А.Е., Николаев М.К., Королева И.С., Демин С.И., Дружинина Т.А., Орлов М.Д., Честнова Т.В., Браславская С.И., Шипулин Г.А.

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

Введение

Бактерии вида *Haemophilus influenzae* серотипа b (Hib) – возбудители менингита, пневмонии, эпиглоттита и других заболеваний преимущественно у детей в возрасте до 5 лет. Наибольший клинический и эпидемиологический интерес представляют штаммы Hib, выделенные из ликвора больных менингитом, т.к. только в этом случае этиологическая роль Hib не вызывает сомнений. Зная количество случаев менингита, можно оценить заболеваемость другими формами генерализованной Hib-инфекции. Генетическая характеристика штаммов, выделенных из ликвора больных ГБМ, позволяет проводить микробиологический мониторинг штаммов, циркулирующих на разных территориях и следить за эволюционными изменениями в популяции Hib.

Для генетической характеристики бактерий вида *H. influenzae* в настоящее время широко применяется метод мультилокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) [2]. Метод МЛСТ позволяет однозначным образом идентифицировать выделенный штамм, что позволяет объединять данные разных исследователей с помощью Интернет. Результатом МЛСТ является определение аллельного профиля и соответствующего ему сиквенс-типа (СТ) штамма. На основании аллельных профилей штаммов проводится характеристика клональной структуры бактериальной популяции. В предыдущих исследованиях было показано, что зарубежные штаммы Hib распределены по двум клональным комплексам: клональный комплекс «A1/A2» и клональный комплекс «B1b» [2]. В работе по генотипированию штаммов Hib, изолированных на территории Москвы, было выяснено, что московские штаммы также распределены по двум клональным комплексам. Выделенному зарубежными авторами клональному комплексу «A1/A2» соответствует клональный комплекс «СТ-6», клональный комплекс «B1b» представлен московскими штаммами с СТ-93. Сделан вывод о том, что более низкая заболеваемость Hib-инфекцией на территории Москвы, по сравнению со странами Европы и Америки до введения программ по вакцинопрофилактике, не связана с особенностями циркулирующих штаммов [1].

Цель

Генотипирование и определение клональной принадлежности штаммов Hib, выделенных в регионах России, методом МЛСТ.

Материалы и методы

Для проведения исследования было использовано 9 штаммов Hib, выделенных от больных ГБМ в возрасте до 5 лет. Штаммы были изолированы на следующих территориях: штамм «BRT1» – Тула (2005 г.), «BRY1» – Ярославль (2007 г.), «BRTU1» – Тюмень (2006 г.), «BRUU1» – Улан-Удэ (2007 г.), «BRI1» – Иркутск (2007 г.). Штаммы «BRN1», «BRN2», «BRN3» и «BRK1» предоставлены НИИ детских инфекций (Санкт-Петербург).

Генотипирование штаммов проводилось в соответствии с общепринятой схемой МЛСТ для *H. influenzae* [2]. Использованные в работе наборы для выделения ДНК, ПЦР и детекции продуктов амплификации произведены в ФГУН Центральном НИИ эпидемиологии (АмплиСенс, Россия). Для секвенирования был использован набор «ABI Prism Big Dye v.1.1» (Applied Biosystems, США). Детекция результатов секвенирования проводилась на приборе «ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Обозначение аллелей и СТ осуществлялось через Интернет-ресурс <http://haemophilus.mlst.net>. Принадлежность сиквенса-типов к клональным комплексам *H. influenzae* обозначалась в соответствии с публикациями [1, 2].

Результаты

Методом МЛСТ проведено генотипирование 9 штаммов, часть результатов внесена в базу данных <http://haemophilus.mlst.net>. Генетическая характеристика исследованных штаммов представлена в таблице.

Штамм*	СТ (аллельный профиль)	Клональный комплекс [1, 2]
BRT1 (id753)	78 (10, 14, 4, 5, 22, 7, 8)	«A1/A2» («СТ-6»)
BRN1 (id736)	92 (10, 14, 4, 5, 4, 7, 28)	«A1/A2» («СТ-6»)
BRN2 (id737)	92 (10, 14, 4, 5, 4, 7, 28)	«A1/A2» («СТ-6»)
BRN3 (id738)	92 (10, 14, 4, 5, 4, 7, 28)	«A1/A2» («СТ-6»)
BRK1 (id739)	80 (10, 14, 5, 7, 43, 7, 8)	«A1/A2» («СТ-6»)
BRY1 (id741)	95 (31, 14, 4, 5, 4, 7, 8)	«A1/A2» («СТ-6»)
BRTU1 (id742)	92 (10, 14, 4, 5, 4, 7, 28)	«A1/A2» («СТ-6»)
BRUU1 (id742)	93 (6, 30, 23, 1, 33, 29, 7)	«B1b»
BRI1	новый (31, 14, 4, 19, 4, 7, 8)	«A1/A2» («СТ-6»)

* – в скобках указан номер штамма в базе данных <http://haemophilus.mlst.net>.

У всех типированных штаммов, за исключением штамма «BR11», были выявлены сиквенс-типы, описанные ранее у московских штаммов. Среди исследованных штаммов не выявлено СТ-6, который был найден у большинства штаммов, изолированных на территории Москвы в 1997-2002 гг. [1]. Наиболее часто в исследованной выборке встречались штаммы с СТ-92 (4 штамма), остальные сиквенс-типы представлены однократно. Штамм «BR11» имеет новый не описанный ранее сиквенс-тип (на момент окончания исследования присвоить номер сиквенс-типу этого штамма не удалось).

В таблице показано распределение типированных штаммов по клональным комплексам, описанным для H1b в работе E.Meats и соавт. [2]. Для всех штаммов удалось определить принадлежность к известным клональным комплексам: 8 штаммов принадлежат клональному комплексу «A1/A2», который соответствует клональному комплексу «СТ-6», выделенному при типировании московских штаммов; 1 штамм входит в клональный комплекс «B1b», в который входят московские штаммы с СТ-93. Сиквенс-типы 78, 92 и 95 имеют отличия от аллельного профиля СТ-6 («центральный» сиквенс-тип клонального комплекса «СТ-6») в одном локусе, СТ-80 отличается от аллельного профиля СТ-6 по трем локусам. Аллельный профиль штамма «BR11» отличается от аллельного профиля СТ-6 по двум локусам, что дает все основания включить данный сиквенс-тип в клональный комплекс «СТ-6» [1].

Выводы

Среди исследованных штаммов не выявлено СТ-6, наиболее распространенного в «московской» популяции H1b. Клональная структура исследованных штаммов повторяет клональную структуру изолятов H1b, выделенных на других территориях: охарактеризованные штаммы распределены по двум известным клональным комплексам. Выделение штамма с не описанным ранее сиквенс-типом не может быть свидетельством существенных генетических изменений в популяции H1b, поскольку данный сиквенс-тип принадлежит известному клональному комплексу.

Литература

1. Миронов К.О., Платонов А.Е., Королева И.С., Шипулин Г.А. Генетические взаимоотношения московских и зарубежных штаммов *Haemophilus influenzae* серотипа b. Журн. Микробиол. 2006, №6:14-20.
2. Meats E., Feil E.J., Stringer S. et al. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 2003, 41(4):1623-1636.