

характерен MLVA-тип 11, который не встречался среди других спорадических случаев и являлся уникальным. Суммарно MLVA-типы характерные для вспышек № 2 и №3 встречались только в 3-х из 23-х спорадических изолятов, что составило 13%. При этом комбинация методик MLVA и PFGE позволила дифференцировать исследуемые изоляты на 17 типов и определить клональный характер патогена вызвавшего вспышку заболевания.

Выводы. Таким образом, разработанная методика MLVA-анализа обладает высокой воспроизводимостью, чувствительностью и дифференцирующей способностью в сравнении с методом PFGE-анализа. Комбинация методов молекулярно-генетического анализа – MLVA и PFGE, на сегодняшний день, может являться наиболее оптимальной схемой субтипирования изолятов *S. Enteritidis* в целях эпиднадзора за сальмонеллезом.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ ИЗОЛЯТОВ *S. ENTERITIDIS* В ОЧАГАХ ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ

Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Рожнова С.Ш.

ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

Основную массу изолятов, выделяемых при спорадической и групповой заболеваемости сальмонеллезом составляет серовар *S. Enteritidis*. Данный факт создает иллюзию моноэтиологичности сальмонеллеза. Но практические потребности эпидемиологического надзора, заключающиеся в необходимости определения эпидемиологической связи между источниками, факторами передачи возбудителя инфекции и восприимчивым населением требуют использования методик, способных выявлять специфические генотипические признаки определенного бактериального изолята в условиях конкретных эпидемических ситуаций (территории риска, контингенты риска и т. д.). В настоящее время наиболее распространенными подходами для выявления изолят-специфических маркеров сальмонелл являются: анализ набора продуктов рестрикции тотальной ДНК в пульсирующем электрическом поле – пульс-электрофорез (от англ. PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis) и анализ локусов содержащих тандемные повторы (от англ. MLVA – Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis). В ряде случаев, в силу низкой себестоимости еще находит применение анализ плазмидного профиля (плазмидный анализ – ПА). Вместе с тем, внедрение данных методик в практику

эпидемиологического надзора требует выработки четких критериев для последующей интерпретации их результатов. Ключевыми из данных критериев является соответствие результатов субтипирования эпидемиологическим данным в конкретных очагах групповой заболеваемости – эпидемиологическая конкордантность метода и его дифференцирующая способность.

Цель исследований – оценка эпидемиологической конкордантности и дифференцирующей способности методов PFGE-, MLVA- и плазмидного типирования бактериальных изолятов *S. Enteritidis*, выделенных в очагах групповой заболеваемости сальмонеллезом.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись 36 изолятов *S. Enteritidis* выделенные в 5-и очагах групповой заболеваемости в разных регионах РФ от пациентов, предполагаемых факторов передачи возбудителя и окружающей среды, с мая по июль 2010 года. Генотипирование изолятов проводили методами PFGE-, MLVA- и плазмидного типирования (Kado et al., 1981, Ribot et al., 2006). Расчет индексов эпидемиологической конкордантности *E* и субтипирующей (дифференцирующей) способности методов *I-D* проводили согласно ранее предложенным формулам (Struelens et al., 2006). Высокие значения индексов *E* и *I-D* соответствуют высокой эпидемиологической конкордантности и дифференцирующей способности методов типирования.

Результаты исследования. Исходной точкой в оценке эпидемиологической конкордантности методов типирования является наше предположение о том, что изоляты вызвавшие заболеваемость в одном очаге должны быть неотличимы друг от друга, и отличаться от изолятов выделенных в других очагах. Риск попадания в выборку пациентов с «фоновой» заболеваемостью, вызванной постоянно циркулирующими на данной территории штаммами, безусловно, присутствует, но они, как правило, составляют незначительную часть обследуемых. Субтипирование изолятов *S. Enteritidis*, выделенных в 5-и разных очагах заболеваемости сальмонеллезом показало, что внутри каждого очага они были неотличимы при анализе методом PFGE-типирования (табл. 1). При этом значение эпидемиологической конкордантности метода (*E*) для изолятов из 5 проанализированных очагов, было самым высоким среди методов типирования и в среднем составило 1. Методом MLVA-типирования выявлено, что внутри 4-х из 5 очагов MLVA-типы бактериальных изолятов были неотличимы, и только в первом очаге один из изолятов отличался от доминирующего MLVA-типа на одну детерминанту. Поэтому индекс *E* для MLVA-анализа составил 0,97. Самое низкое значение индекса эпидемиологической конкордантности среди трех методов типирования относилось к плазмидному анализу – 0,82. Данный метод позволил идентифици-

ровать идентичность изолятов только внутри 3-х групповых очагов заболевания, в то время, как внутри других, изоляты отличались по плазмидному типу друг от друга. При этом в одном из очагов, все изоляты, выявленные от пострадавших детей отличались от изолятов, выделенных от взрослых, несмотря на

Для оценки субтипизирующей способности методов PFGE-, MLVA- и плазмидного анализа нами были рассчитаны фактический ($1-D_f$) и ожидаемый ($1-D_o$) индексы биоразнообразия Симпсона. При этом для расчета индекса ($1-D_f$) мы учитывали все полученные генотипы в ходе анализа. Напротив, для расчета индекса ($1-D_o$) предполагали, что каждый очаг при типировании соответствующим методом, представлен только доминирующим генотипом. Таким образом, разницу между полученными фактическим и ожидаемым индексом ($1-D$) возможно интерпретировать, как показатель ошибки субтипизирующей способности метода, которая обуславливается рядом причин: нестабильностью или гипервариабельностью анализируемого маркера, не воспроизводимостью самого метода типирования или возможным неполным эпидемиологическим анализом. Так по результатам PFGE-анализа 4 из 5 очагов были ассоциированы с PFGE-типом 1 и только один очаг с PFGE-типом 2. При этом вычисленные индексы биоразнообразия были равны 0,4, что является наименьшей величиной среди методов. В сравнении с другими методами субтипирования, результаты MLVA-анализа были наиболее близки эпидемиологическим данным. Для 3-х очагов были характерны уникальные MLVA-типы – 3, 4, 1, а два остальных очага (4 и 1) включали бактериальные изоляты с MLVA-типом 1, при этом в очаге № 1 он был представлен в качестве доминирующего типа (8 из 9 изолятов). Рассчитанная разница между фактическим ($1-D_f = 0,86$) и ожидаемым ($1-D_o=0,90$) значениями индексами составляла 0,04, что составляет незначительную часть (4,7%) от фактического индекса.

Метод плазмидного анализа позволил выявить клональность происхождения только трех очагов сальмонеллеза, для которых был характерен ПТ-5 и ПТ-4. Наиболее гетерогенными оказались очаги №1 и №5, которые включали изоляты с 3-мя плазмидными типами. Причем, если очаг №1 был представлен изолятами с ярко выраженным доминирующим ПТ – 5 (7 из 9 изолятов), то очаг №5 включал по 4 изолята двух разных типов. Полученные данные по индексам разнообразия – фактический (0,88) и ожидаемый (0,55) разница 0,33 (37,5% от фактического) – свидетельствуют о высоком полиморфизме плазмидных типов среди изолятов внутри одного очага заболевания. Результаты применения методов генотипирования изолятов представлены в таблице №1

Таблица 1. Сравнение результатов применения различных методов типирования при тестировании изолятов *S. Enteritidis*, выделенных из очагов групповой заболеваемости.

Кол-во изолятов <i>S. Enteritidis</i> из каждого очага (n)	Генотип характерный для очага		
	Плазмидный тип (n)	PFGE-тип (n)	MLVA-тип (n)
Очаг№ 1 (9)	1 (1)	1 (9)	1 (8) 2 (1)
	6 (1)		
	5 (7)		
Очаг№ 2 (7)	5 (7)	1 (7)	3 (7)
Очаг№ 3 (2)	5 (2)	1 (2)	2 (2)
Очаг№ 4 (9)	4 (9)	1 (9)	1 (9)
Очаг№ 5 (9)	1 (4)	2 (9)	4 (9)
	2 (4)		
	3 (1)		
Еср.	0,82	1	0,97
1-Dф	0,88	0,40	0,86
1-Do	0,70	0,40	0,90
$\Delta 1-D$	0,18	0	0,04

Исходя из результатов исследования можно сделать следующие выводы:

1. Плазмиды являются нестабильным изолят-специфичным маркером *S. Enteritidis*, что отражается в их потере или приобретении бактериальной клеткой из-за влияния факторов окружающей среды в короткий по эпидемиологическим меркам промежуток времени, в т.ч. в период формирования очага групповой заболеваемости или изоляции культур. В частности такое явление может приводить к избыточно высокой субтипировующей способности плазмидного анализа, и как следствие, к затруднению или ошибочной интерпретации эпидемиологической связи изолятов выделенных, как внутри одного очага, так и между ними – низкой эпидемиологической конкордантности метода.

2. Результат анализа изолятов методом макрорестрикционного анализа геномной ДНК (PFGE) с использованием одной рестриктазы (*Xba*I), хотя и обладают высокими значениями индекса эпидемиологической конкордантности внутри каждого очага, не обеспечивает высокого уровня дифференцирующей способности. При этом он не позволяет дифференцировать изоляты из ряда очагов на разные типы, что может привести к неверной точке зрения – о существовании на большой территории и в разные временные промежутки ограниченного числа клонов *S. Enteritidis* – представлению о мнимой взаимосвязи между очагами на разных территориях. Однако положи-

тельной особенностью данного метода является его универсальность в отношении различных групп патогенов и возможность варьировать дифференцирующую способность применением дополнительных типов эндонуклеаз рестрикции.

3. В сравнении с выше приведенными методами субтипирования изолятов *S. Enteritidis*, метод MLVA-типирования позволил более корректно отобразить клональный характер групповых очагов сальмонеллеза, при этом сохраняя высокую дифференцирующую способность.

ВЫЯВЛЕНИЕ HUMAN BOCAVIRUS II У ПАЦИЕНТОВ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ С ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В НОВОСИБИРСКЕ В 2009–2010 ГГ.

Курильщикова А.М., Тюменцев А.И., Соколов С.Н., Жираковская Е.В., Тикунова Н.В.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия
Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

Введение. Человеческий бокавирус II (НВоV-II) является представителем семейства *Parvoviridae*. В это семейство входит ряд вирусов с одноцепочечным ДНК-геномом, вызывающих широкий спектр заболеваний у человека и животных — гастроэнтериты, заболевания респираторного тракта, артриты и другие заболевания [1]. Представители рода *Bocavirus*, к которому относится НВоV-II, встречаются только у человека и вызывают острые респираторные и кишечные заболевания.

Впервые НВоV-II был обнаружен в 2009 году в ходе метагеномных исследований образцов фекалий, полученных от детей, госпитализированных в Пакистане и Великобритании [2]. К настоящему моменту НВоV-II обнаружен практически во всех регионах мира, включая Европу, Азию, Южную Америку и Австралию. Результаты серии исследований, проведенных в 2009 и 2010 годах, показали, что НВоV-II и НВоV-I различаются по патогенезу и локализации: НВоV-II является возбудителем острых кишечных заболеваний (ОКИ) и не обнаруживается в респираторном тракте, в то время как НВоV-I вызывает, как правило, острые респираторные заболевания [1]. Встречаемость НВоV-II в клинических образцах фекалий у пациентов, госпитализированных с ОКИ, варьирует в различных регионах от 1% до 10%. В