

Проекты методических рекомендаций**УДК 614.33:616-02-093****МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ТУБЕРКУЛЕЗОМ**

О. В. Нарвская¹, И. В. Мокроусов¹, А. А. Вязовая¹, Л. В. Лялина¹, М. В. Шульгина², Е. Б. Мясникова²,
В. Ю. Журавлев², Е. М. Белюловский², Т. В. Умпелева³, М. А. Кравченко³

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»,

²ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»,

³ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»

CAUSING AGENT MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS IN TB EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE

Narvskaya O.V.¹, Mokrousov I.V.¹, Vyazovaya A.A.¹, Lyalina L.V.¹, Shulgina M.V.², Myasnikova E.B.², Jouravlev V.Yu.²,
Belilosvskii E.M.², Umpeleva T.V.³, Kravchenko M.A.³

¹Saint-Petersburg Pasteur Research Institute for Epidemiology and Microbiology,

²saint-Petersburg Research Institute for Phthisiopulmonology, Ministry of Public Health,

³Ural Research Institute for Phthisiopulmonology Ministry of Public health, Ekaterinburg
Russian Federation

Резюме

В статье рассмотрены показания и порядок применения комплекса молекулярно-генетических методов (сполиготипирование, различные схемы MIRU-VNTR-типирования, IS6110-RFLP) генотипирования возбудителя туберкулеза - *Mycobacterium tuberculosis*. Подробно освещены вопросы интерпретации результатов и возможности использования генотипирования в сопоставлении с эпидемиологическими данными для мониторинга популяции *M. tuberculosis*, оперативного эпидемиологического анализа и прогноза в системе эпидемиологического надзора за туберкулезом в условиях широкого распространения лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя эпидемиологически

и клинически значимых генотипов.

Ключевые слова: генотипирование, генотип, *M. tuberculosis*, Сполиготипирование

Resume

Indications and algorithm of *M. tuberculosis*, genotyping methods (spoligotyping, different MIRU-VNTR typing, IS6110-RFLP) use are discussed. Results' interpretation and opportunities of the methods in epidemiologic monitoring of *M. tuberculosis* population, operational epidemiological analysis and TB surveillance prognosis in high drug-resistant disease causing strains of epidemiologically and clinically significant genotypes are demonstrated.

Key words: genotyping, genotype, *M. tuberculosis*, spoligotyping

Сокращения и термины

<p>Генотипирование (genotyping) - комплекс лабораторных исследований, направленных на выявление хромосомных маркеров для дифференциации изолятов <i>M. tuberculosis</i> и установления генетических связей между ними</p> <p>Генотип (genotype) – характеристика, полученная в результате изучения хромосомной ДНК изолята <i>M. tuberculosis</i> с помощью одного или нескольких методов генотипирования (сполиготипирование, MIRU-VNTR-типирование и IS6110-RFLP и др.)</p> <p>Генетический кластер (genetic cluster) – два или более изолятов <i>M. tuberculosis</i>, имеющих одинаковые генотипы</p>	<p>Свежее заражение (recent transmission) – заражение туберкулезом, имевшее место в недавнем прошлом (в течение двух последних лет)</p> <p>Частота (выраженная в %) кластеризации – отношение числа изолятов <i>M. tuberculosis</i>, входящих в эпидемиологически подтвержденный генетический кластер, к общему числу типированных изолятов. Служит показателем эпидемического неблагополучия.</p> <p>MIRU-VNTR – типирование – метод генотипирования, основанный на анализе вариабельности количества копий тандемных нуклеотидных повторов у изолятов <i>M. tuberculosis</i></p>
--	--

<p>ПЦР-кластер - образцы ДНК <i>M. tuberculosis</i> с одинаковыми сполиготипами и одинаковыми MIRU-типами</p> <p>Совпадающие генотипы (matching genotypes) – одинаковые профили генотипирования двух или более изолятов <i>M. tuberculosis</i></p>	<p>IS6110- типирование - метод генотипирования, основанный на анализе количества и длин фрагментов хромосомной ДНК, рестрицированной с помощью фермента Pvu II в области инсерционного элемента</p>
<p>Сполиготипирование (spoligotyping, spacer oligonucleotide typing) – метод генотипирования, основанный на анализе спейсерных последовательностей, находящихся в области прямых пов-торов (Direct Repeats, DR) на хромосоме <i>M. tuberculosis</i></p>	<p>Эпидемиологически подтвержденный генетический кластер (epidemiologically confirmed genetic cluster) – генетический кластер, включающий изоляты <i>M. tuberculosis</i> с совпадающими генотипами, полученные от пациентов с установленными эпидемиологическими связями</p>

Генотипирование микобактерий туберкулеза осуществляют при проведении эпидемиологического надзора, эпидемиологической диагностики в очагах (оперативный эпидемиологический анализ) и научных исследований по следующим показаниям:

- при подозрении на групповые заболевания туберкулезом для выявления источника инфекции, определения границ и времени существования очагов, в том числе нозокомиальных;
- для выявления скрытых эпидемиологических связей между заболеваниями в случае передачи возбудителя при территориальной разобщенности больных;
- для оценки распространенности различных генотипов в популяциях *M. tuberculosis*, выявления и мониторинга эпидемиологически значимых штаммов возбудителя с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), определении показателя их кластеризации, характеризующего результативность программ контроля туберкулеза;
- для дифференциации случаев недавнего заражения и/или реактивации туберкулезного процесса;
- для оценки факторов риска (в частности влияния миграции в приграничных регионах и мегаполисах) в связи с потенциальной угрозой завоза МЛУ штаммов *M. tuberculosis* на территории страны;
- для оценки роли пенитенциарной системы в распространении инфекции среди гражданского (постоянного) населения;
- для проверки качества мероприятий по инфекционному контролю в лечебных противотуберкулезных учреждениях (анализ распространения внутрибольничной инфекции и случаев заболевания персонала);
- для контроля качества лабораторных исследований (выявление ложноположительных результатов микробиологических исследований).

Применение молекулярно-генетических методов исследования *M. tuberculosis* должно рассматриваться как дополнение к регламентированным схемам микробиологической и молекулярно-генетической (ПЦР – полимеразной цепной реакции, и др.) лабораторной диагностики туберкулеза, позволяющих эффективно выявлять возбудитель, определять его лекарственную устойчивость и спектр мутаций, ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезным препаратам.

В целом молекулярно-генетические исследования направлены на совершенствование микробиологического мониторинга возбудителя туберкулеза в целях повышения эффективности эпидемиологической диагностики, противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение новых случаев заболевания в окружении больного, и прогнозирование в системе эпидемиологического надзора за туберкулезом в условиях широкого распространения МЛУ штаммов возбудителя эпидемиологически и клинически значимых генотипов.

Молекулярно-генетические методы исследования обеспечивают внутривидовую дифференциацию изолятов возбудителя туберкулеза путем анализа специфических нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК *M. tuberculosis* с помощью различных методов генотипирования. К их числу относят, в первую очередь, стандартизированные методы генотипирования: сполиготипирование, MIRU-VNTR-типирование и IS6110-RFLP-типирование [1, 2, 6, 8-10]. Подробное описание методик генотипирования приведено в перечне информационно-методических документов [1-3].

Метод сполиготипирования (spoligotyping, spacer oligonucleotide typing) основан на анализе полиморфизма 43 нуклеотидных последовательностей

(спейсеров), разделяющих прямые повторы (Direct Repeats, DR), линейно расположенные в DR области хромосомы *M. tuberculosis* complex [8]. В классическом варианте исследования продукты ПЦР-амплификации DR области исследуемых изолятов, меченные биотином, гибридизуют с 43 спейсерными последовательностями ДНК, последовательно

нанесенными на специальную мембрану, которую затем экспонируют на светочувствительной пленке [14]. По наличию или отсутствию в определенных участках пленки темных пятен (сигналов гибридизации) судят о присутствии или отсутствии у изолятов соответствующих спейсеров (Рисунок 1).

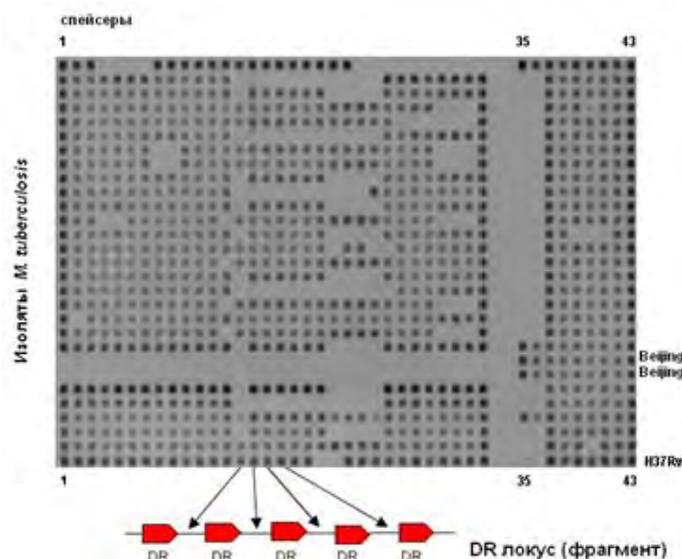


Рисунок 1. Профили сполиготипирования клинических изолятов (включая изоляты генотипа Beijing) и лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv (сканограмма мембраны) и схема структуры DR локуса (фрагмент). Слева: сполиго-профили изолятов *M. tuberculosis*. Порядок расположения спейсеров указан цифрами 1, 35 и 43. Внизу: схема расположения переменных спейсеров, разделяющих прямые повторы (DR).

Для сполиготипирования микобактерий туберкулезного комплекса можно использовать также метод гибридизации на биологическом микрочипе («СПОЛИГО-БИОЧИП», ООО БИОЧИП-ИМБ (Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ № ФСР 2010/09519 от 03.10.2010 г.).

Результаты исследования представляют с помощью бинарного кода в виде сочетания знаков: букв (п и о), где п - наличие спейсера, о - отсутствие спейсера. Каждый изолят имеет определенный набор из 43 знаков, который легко переводится в восьмеричный формат и обратно с использованием http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/tools.jsp# (функция Online Tools) и для наглядности отображается графически в виде квадратов (черный - наличие спейсера и белый - отсутствие спейсера). Каждый изолят имеет определенный набор спейсеров – сполиго-профиль. Сполиго-профили (как в бинарном, так и в восьмеричном формате) можно сравнить с данными,

представленными в общедоступной глобальной обновляемой международной компьютерной базе данных SITVITWEB http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/ [4], которая содержит информацию о профилях сполиготипирования штаммов *M. tuberculosis* complex, выделенных в разных странах мира: кодовое международное обозначение сполиготипа - SIT (Spoligotype International Type) для классифицированных и ORPHAN – для неклассифицированных профилей сполиготипирования, отнесенных к генетическим линиям/сублиниям (семейства, клады) Beijing, LAM, Haarlem, T, X и др. Кроме того, возможно параллельное использование базы данных <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces> [12].

MIRU-VNTR – типирование основано на анализе изменчивости количества хромосомных тандемных нуклеотидных повторов MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) - VNTR (Variable Number Tandem Repeats) у изолятов *M. tuberculosis* (рисунок 2).

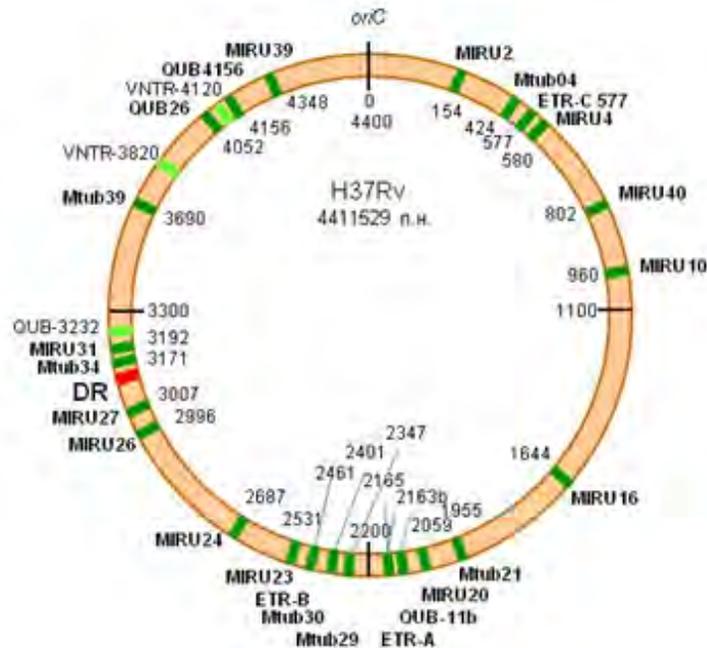


Рисунок 2. Схема расположения локусов MIRU-VNTR и DR на хромосоме штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

Число tandemных повторов в локусах рассчитывают с помощью таблиц соответствия, поскольку молекулярная масса ампликона (продукта ПЦР-амплификации локуса), установленная путем электрофореза в агарозном геле, пропорциональна количеству нуклеотидных повторов известной протяженности [6,9]. В результате получается цифровой профиль, где каждая цифра соответствует числу tandemных повторов в определенном локусе. Каждый

изолят характеризует определенный набор цифр (число копий) для каждого нуклеотидного повтора, который сохраняется в базе данных, например, в формате Microsoft Excel. Результаты исследования выражают в виде цифрового кода, представляющего набор из 12, 15 или 24 цифр (в зависимости от схемы типирования), где каждая цифра обозначает число повторов в локусе (Рисунок 3).

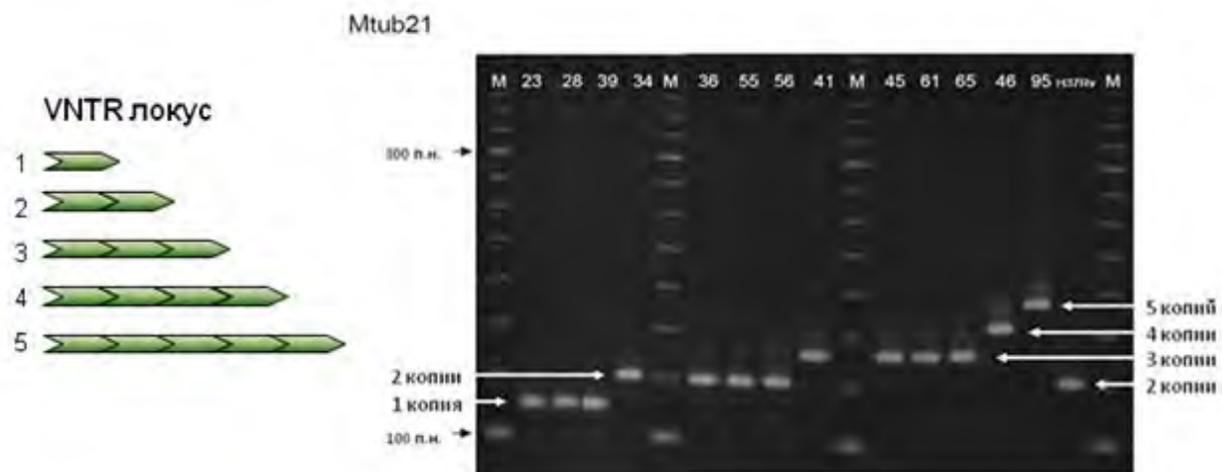


Рисунок 3. Схематическое изображение структуры локуса VNTR, содержащего разное число (1-5) копий tandemных повторов (слева); электрофореграмма ПЦР-продуктов амплификации локуса Mtb21 (VNTR1955) (справа). Вверху: М – ДНК-маркер молекулярных масс (100 пар нуклеотидов, п.н.). Цифры обозначают номера изолятов *M. tuberculosis*. Слева: черными стрелками обозначены молекулярные массы маркерных фрагментов (800 и 100 п.н.); белыми стрелками показаны продукты амплификации с соответствующим числом копий нуклеотидного повтора.

Полученные профили MIRU-VNTR-типирования можно сравнить с данными, представленными в международных компьютерных базах данных

<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces> и http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/ [4, 12].

Развитие метода MIRU-VNTR-типирования в современных условиях происходит путем оценки дискриминирующей способности новых локусов, воспроизводимости и удобства интерпретации

результата ПЦР. Вместе с тем, первоначальная схема типирования, основанная на анализе 12 локусов MIRU, не утратила актуальности в молекулярно-эпидемиологических исследованиях [4, 5]. В настоящее время международный стандарт MIRU-VNTR-типирования рекомендует схему, включающую 24 локуса, представляющих так называемый полный «филогенетический» формат; 15 из 24 локусов входят в дискриминирующий «эпидемиологический» формат (Таблица 1).

Таблица 1. Наборы локусов различных схем MIRU-VNTR-типирования.*

Локус	Другое наименование 1	Другое наименование 2	Схема (число локусов)		
			24	15	12
154	MIRU02		X		X
424	Mtub04		X	X	
577	ETRC		X	X	
580	MIRU04	ETRD	X	X	X
802	MIRU40		X	X	X
960	MIRU10		X	X	X
1644	MIRU16		X	X	X
1955	Mtub21		X	X	
2059	MIRU20		X		X
2163b	QUB11b		X	X	
2165	ETRA		X	X	
2347	Mtub29		X		
2401	Mtub30		X	X	
2461	ETRB		X		
2531	MIRU23		X		X
2687	MIRU24		X		X
2996	MIRU26		X	X	X
3007	MIRU27	QUB5	X		X
3171	Mtub34		X		
3192	MIRU31	ETRE	X	X	X
3690	Mtub39		X	X	
4052	QUB26		X	X	
4156	QUB4156		X	X	
4348	MIRU39		X		X

* Наименования локусов приведены согласно <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruChooser.faces> [12].

Схемы MIRU-VNTR были разработаны на основе анализа ряда региональных и локальных коллекций штаммов, однако при этом особенности генетической структуры популяций *M. tuberculosis* в таких крупных регионах мира как территории бывшего СССР и стран Восточной Азии не были учтены в полной мере [2, 3, 5, 9, 10, 12]. Эти популяции

характеризуются относительным или абсолютным преобладанием штаммов генетического семейства Beijing, недостаточно дифференцируемых даже с применением 24-локусной схемы MIRU-VNTR-типирования. В этой связи, были дополнительно оценены так называемые гипервариабельные локусы VNTR (QUB3232, VNTR3820, VNTR4120 [6]) и

предложена оптимизированная схема субтипирования российской популяции Beijing на основе анализа 7 наиболее полиморфных локусов [1, 7]. Таким образом, в настоящее время при анализе российских изолятов *M. tuberculosis* наиболее дискриминирующими следует считать 7 локусов (Mtub21, QUB11b, MIRU26, QUB26, QUB3232, VNTR3820, VNTR4120) для штаммов генотипа Beijing и 15 локусов (Mtub04, ETR-C, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETR-A, Mtub30, MIRU26, MIRU31, ETR-E, Mtub39, QUB26) для штаммов других генотипов. По мере накопления данных о структуре популяции *M. tuberculosis* в России схемы MIRU-VNTR-типирования российских изолятов могут быть оптимизированы.

Результаты генотипирования изолятов *M. tuberculosis*, полученные с использованием методов, основанных на применении ПЦР, целесообразно дополнить данными о спектре мутаций, ассоциированных с устойчивостью *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам. В Российской Федерации эту информацию получают в процессе ПЦР-диагностики туберкулеза и ускоренного определения лекарственной чувствительности возбудителя путем выявления мутаций в генах *rpoB* (у рифампицин-резистентных штаммов), *katG*, *inhA* и межрегуляторной области генов *ahpC-oxuR* (у изониазид-резистентных штаммов) непосредственно в респираторном материале, например с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП» (ООО БИОЧИП-ИМБ) или комплекта реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ» (Компания Синтол) для ПЦР в формате реального времени.

Метод IS6110-RFLP-типирования (англ., Restriction Fragment Length Polymorphism - полиморфизм

длин фрагментов рестрикции) используют для выявления варибельности штаммов *M. tuberculosis*, обусловленной различиями в числе копий инсерционного элемента IS6110 (размером 1355 пар нуклеотидов, п.н.) и их расположении на хромосоме бактерии. Метод основан на анализе количества и длин фрагментов хромосомной ДНК, рестрицированной с помощью фермента Pvu II в области инсерционного элемента IS6110 – уникального генетического маркера микобактерий туберкулезного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*) [6, 11, 15].

Выделение в очагах туберкулеза штаммов *M. tuberculosis* с одинаковыми профилями IS6110 свидетельствует об их идентичности и служит доказательством эпидемиологической связи между заболеваниями, что позволяет достоверно установить источник или общность источника для нескольких заболеваний, а также подтвердить передачу возбудителя от больного контактным. Для системы эпидемиологического надзора не менее важно идентифицировать эпидемические штаммы на конкретной территории и следить за их распространением [1, 5, 7, 11, 12]. Большинство эпидемиологически несвязанных штаммов *M. tuberculosis* имеют индивидуальные профили IS6110 (рисунок 4).

Компьютерная обработка профилей IS6110 с помощью специального программного обеспечения позволяет создать локальные, а в перспективе – федеральный банки данных как основу для совершенствования эпидемиологического и микробиологического мониторинга туберкулеза.

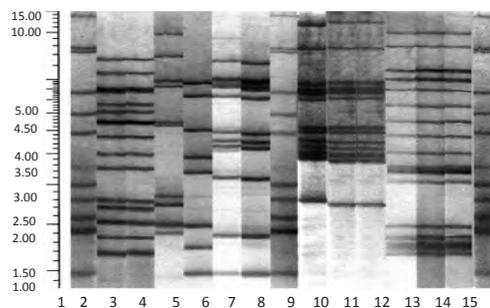


Рисунок 4. IS6110-RFLP профили ДНК штаммов *M. tuberculosis*.

Шкала слева – ДНК-маркер молекулярных масс. 1, 8, 15 - штамм *M. tuberculosis* 14323 (контрольный); 2, 3; 6, 7; 9-11 и 12-14 - штаммы с идентичными профилями из двух семейных очагов (эпидемиологически связанные случаи); 4, 5; 8 - штаммы с различными профилями (эпидемиологически несвязанные случаи).

Стратегия генотипирования возбудителя туберкулеза Полную характеристику популяции возбудителя туберкулеза в масштабах страны обеспечивает тотальное генотипирование всех изолятов *M. tuberculosis* (по аналогии с определением паттернов лекарственной чувствительности) с помощью

методов сполитипирования и MIRU-VNTR – типирования, которые основаны на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако наиболее целесообразным и наименее затратным в условиях широкого распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) в Российской Федерации представляется генотипирование МЛУ изолятов *M. tuberculosis* с помощью методов сполитипирования и MIRU-VNTR – типирования при подозрении на

принадлежность нескольких случаев заболевания к единой цепи заражений и для мониторинга циркулирующих МЛУ штаммов возбудителя.

Учитывая неоднородность российской популяции возбудителя туберкулеза (более 200 сполитипов, представляющих более 20 генетических семейств/линий) и доминирование штаммов эпидемиологически и клинически значимого генотипа Beijing (около 50% [1, 7]), целесообразно использовать следующую схему генотипирования *M. tuberculosis* (рисунок 5).

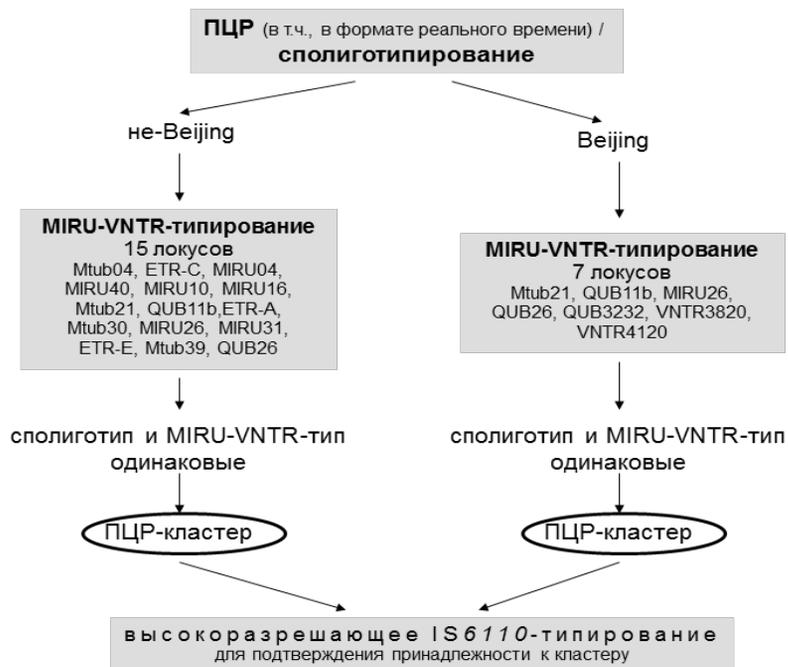


Рисунок 5. Схема генотипирования *M. tuberculosis*.

Согласно схеме (рисунок 5) на первом этапе осуществляют генотипирование возбудителя путем анализа образцов ДНК, выделенной непосредственно из исследуемого материала (мокрота) или из чистых культур *M. tuberculosis*. Для этого, в зависимости от оснащённости лаборатории, используют методы, основанные на ПЦР: сполитипирование для определения принадлежности изолята *M. tuberculosis* к генотипу Beijing или другим генотипам («не-Beijing») [14, 15] или ПЦР (в том числе, в формате реального времени, тест-система «Амплитуб-Beijing», ООО «Синтол», г. Москва).

Далее, образцы, содержащие ДНК *M. tuberculosis*, отнесенных к генотипу Beijing по результатам ПЦР и/или сполитипирования, подлежат MIRU-VNTR-типированию¹ с использованием 7 наиболее дискриминирующих локусов², а именно MIRU26,

¹ Штаммы Beijing характеризуют отсутствие 1-34 из 43 спейсеров в профиле сполитипирования.

² По мере накопления данных о профилях MIRU-VNTR-типирования российских штаммов *M. tuberculosis* количество и перечень локусов могут быть изменены.

QUB26, QUB11b, Mtub21, QUB3232, VNTR3820, VNTR4120 [1, 14, 15].

Образцы ДНК *M. tuberculosis* других генотипов, условно объединяемых в группу «не-Beijing», подлежат сполитипированию (если таковое не проведено) и MIRU-VNTR-типированию по 15 стандартным локусам (Mtub04, ETR-C, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETR-A, Mtub30, MIRU26, MIRU31, ETR-E, Mtub39, QUB26).

При регистрации результатов генотипирования отмечают все образцы, содержащие ДНК *M. tuberculosis* с одинаковыми сполитипами и одинаковыми MIRU-типами, относят их к определенному ПЦР-кластеру (Рисунок 5). За редким исключением *M. tuberculosis* с совпадающими генотипами получают от больных, вовлеченных в единую цепь заражений.

Цифровая интерпретация полученных результатов ПЦР-анализа существенно облегчает компьютерное сравнение профилей генотипирования изолятов *M. tuberculosis*, хранение и обмен информацией.

Для анализа ПЦР-кластера, включающего изоляты *M. tuberculosis* не менее 3 пациентов, на втором этапе (как правило, в специализированных лабораториях) проводят дальнейшее генотипирование ДНК, выделенной из чистых культур *M. tuberculosis*, используя метод IS6110-RFLP [13]. Сходство профилей IS6110-RFLP-типирования оценивают визуально или путем компьютерной обработки с помощью специального программного обеспечения.

Интерпретация результатов генотипирования изолятов *M. tuberculosis* в сопоставлении с эпидемиологическими данными

Эпидемиологическое обследование и противоэпидемические мероприятия, которые проводятся в обычной практике, не позволяют контролировать в полной мере эпидемический процесс в очагах туберкулеза³, поскольку опрос

³ Под эпидемическим очагом туберкулеза понимают «место пребывания источника *M. tuberculosis* вместе с окружающими его людьми и обстановкой в тех пределах пространства и времени, в которых возможно возникновение новых заражений и заболеваний». МУ № 2000/185 «Организация и содержание противоэпидемических мероприятий в очагах туберкулеза». СПб, 2001.

больного и контактных лиц не дает возможности верифицировать эпидемиологические связи между предполагаемым источником инфекции и вторичными случаями.

В случае подтверждения принадлежности изолятов *M. tuberculosis* к единому генетическому кластеру⁴ в зависимости от цели исследования и выбранного приоритета в порядке убывания (таблица 2) принимается решение о необходимости дальнейших действий для установления эпидемиологических связей между больными.

Установление генетических связей между изолятами *M. tuberculosis* путем сравнения их генотипов в сопоставлении с эпидемиологическими данными позволяет выявить больных, вовлеченных в единую цепь заражений, и отличить их от пациентов, у которых болезнь связана с реактивацией возбудителя в случаях инфицирования в относительно отдаленном прошлом [5].

⁴ Генетический кластер (genetic cluster) – два или более изолятов *M. tuberculosis*, имеющих одинаковые генотипы.

Таблица 2. Оценка приоритетности исследования генетических кластеров *M. tuberculosis*.

Приоритет	Тип кластера	Обоснование приоритета
1.	включает изоляты <i>M. tuberculosis</i> пациентов с подозрением на ложно-положительный результат культуральной диагностики туберкулеза	Необходимость выявления пациентов, у которых туберкулез отсутствует, и прекращение лечения
2.	включает изоляты <i>M. tuberculosis</i> трех и более больных из группы высокого риска при наличии возможной эпидемиологической связи	Необходимость подтверждения или исключения случаев свежего заражения в больших кластерах, включающих больных из группы высокого риска
3.	включает изоляты <i>M. tuberculosis</i> двоих больных из группы высокого риска при наличии возможной эпидемиологической связи	Малые кластеры при наличии пациентов из группы высокого риска требуют внимания
4.	включает изоляты <i>M. tuberculosis</i> трех и более больных из группы низкого риска при наличии возможной эпидемиологической связи	Требуется внимание изучение крупных кластеров
5**.	включает изоляты <i>M. tuberculosis</i> больных из группы высокого риска при отсутствии даже возможной эпидемиологической связи	Низкая вероятность установления новых эпидемиологических связей
6.	включает изоляты <i>M. tuberculosis</i> больных из группы низкого риска при отсутствии даже возможной эпидемиологической связи	Практически полное отсутствие вероятности установления новых эпидемиологических связей

Как правило, эпидемиологическому исследованию подлежат лишь высоко приоритетные генетические кластеры изолятов 1-3 [5].

Полученные результаты позволяют подтвердить или опровергнуть предположения о связи между случаями заболевания и, с некоторой долей вероятности, выявить скрытые пути передачи возбудителя, а также случаи ложноположительной интерпретации результатов культурального исследования.

Результаты генотипирования *M. tuberculosis*

должны быть интерпретированы в свете данных о наличии эпидемиологических связей между больными для того, чтобы выявить цепочку заражений и организовать необходимые противоэпидемические мероприятия, направленные на прекращение распространения штамма возбудителя или прекращение необоснованного лечения при диагностических ошибках, связанных с ложноположительным результатом лабораторной диагностики (Рисунок 6).

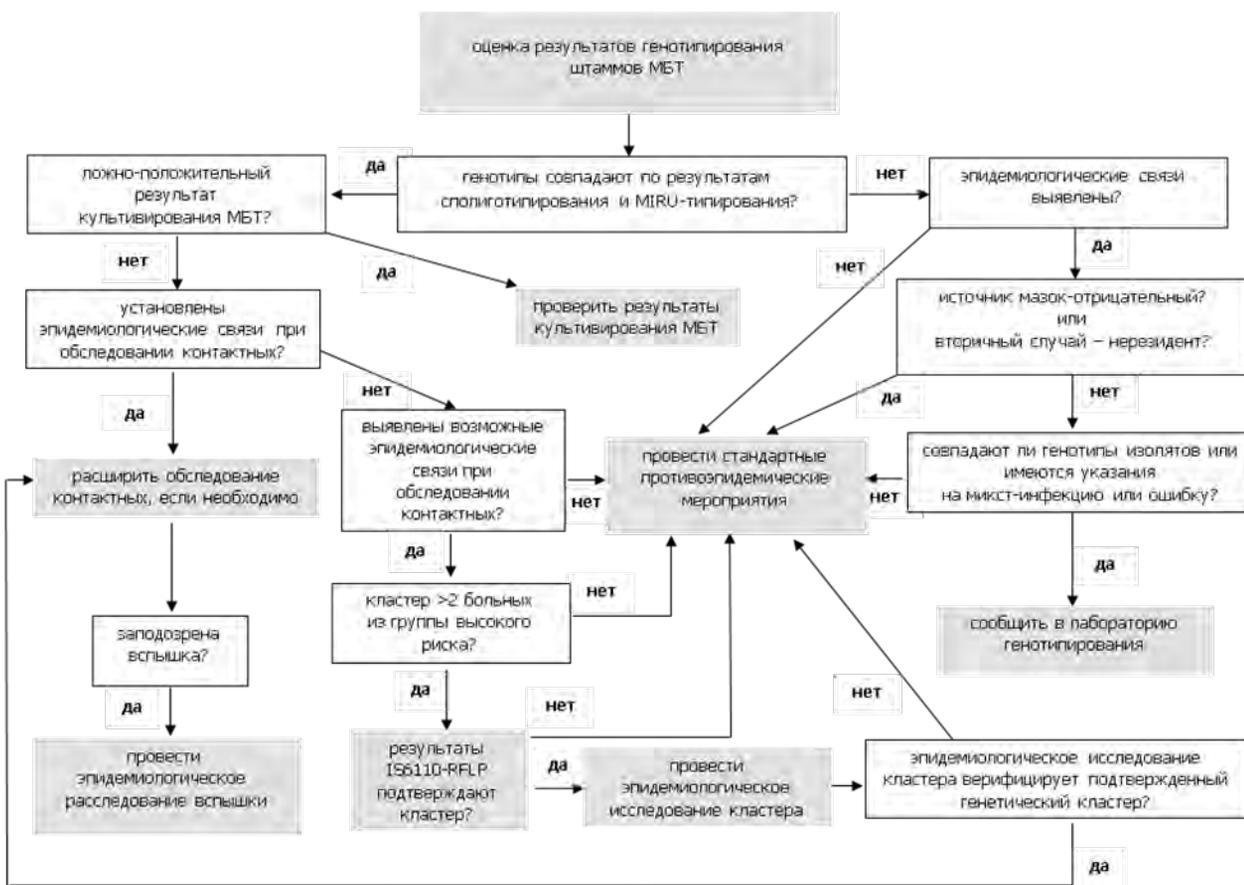


Рисунок 6. Схема анализа результатов генотипирования штаммов *M. tuberculosis* в эпидемиологических исследованиях [5].

Интерпретируя результаты генотипирования возбудителя, полагают, что больные, инфицированные штаммами *M. tuberculosis* с идентичными генотипами, вероятно, заразились друг от друга или от общего источника. Однако больных следует считать вовлеченными в одну и ту же цепь передачи возбудителя лишь при наличии установленной эпидемиологической связи, объясняющей, где и как могло произойти заражение. Иными словами, должны быть установлены пространственные (географические) и временные границы очага.

Таким образом, представителями эпидемиологически подтвержденного генетического кластера считаются изоляты *M. tuberculosis*, которые принадлежат к единому генетическому кластеру и были получены от больных с установленными эпидемиологическими связями.

Если генотипы изолятов, полученных от двух и более больных, не совпадают, это означает, что больные не вовлечены в одну и ту же цепь передачи возбудителя, т.е. заражение не имело места в течение предыдущих двух лет.

Более сложная ситуация возникает, когда генотипы изолятов, полученных от двух и более больных совпадают, т.е. изоляты принадлежат к одному и тому же кластеру, что предполагает заражение одним и тем же штаммом, однако при отсутствии эпидемиологической связи такие больные не считаются вовлеченными в единую цепочку передачи возбудителя (заражений).

Как правило, от одного источника заражаются 1-2 человека. Распространение определенного штамма возбудителя поддерживается годами, и кластеры могут включать сотни случаев. В таких кластерах первичные, вторичные и последующие источники идентифицировать нелегко. Наличие лишь возможной эпидемиологической связи (указаний на совместное проживание, вероятность общения по месту работы и в других местах, подверженность одинаковым факторам риска, случайные контакты и т.п.) требует сбора дополнительной информации для оценки вовлеченности больных в единую цепочку новых заражений (недавней передачи возбудителя).

По мере выявления эпидемиологически подтвержденных ПЦР-кластеров и выяснения динамики заражений появляется возможность установления источника (источников) заражения. Однако в ряде случаев источник заражения выявить не удается, что требует расширения границ эпидемиологических исследований.

Использование результатов генотипирования *M. tuberculosis* для мониторинга распространения туберкулеза

Основным количественным показателем оценки результатов генотипирования *M. tuberculosis* является частота кластеризации, представляющая собою отношение числа случаев, входящих в ПЦР-кластеры к числу случаев, не входящих в кластеры, выраженное в процентах.

Однако данный показатель не учитывает характера эпидемиологических связей между случаями. Поэтому более информативным является показатель частоты эпидемиологически подтвержденных заражений – процент числа случаев, входящих в ПЦР-кластеры, включающие изоляты *M. tuberculosis* с совпадающими генотипами, полученные от пациентов с эпидемиологическими связями, установленными при рутинном обследовании контактных.

Возможно также сравнение инцидентности кластеризованных и некластеризованных случаев, которые рассчитывают путем деления числа тех и других случаев в году на территориальную численность населения.

Список литературы

1. Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Старкова Д.А., Нарвская О.В. Высокоразрешающее типирование штаммов генотипа Beijing российской популяции *Mycobacterium tuberculosis* // Туберкулез и болезни легких, 2012.-N 7.-С.46-53.
2. Allix-Béguec C., Harmsen D., Weniger T., Supply P., Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46. — P. 2692–2699.
3. Allix-Béguec C., Fauville-Dufaux M., Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized *Mycobacterium tuberculosis* Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. — 2008. — Vol. 46. - №4. — P. 1398 – 1406.
4. Demay C., Liens B., Burguiere T., Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N. SITVITWEB – a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology // Infection, Genetics and Evolution. - 2012. – Vol. 12. - # 4. – P. 755-766.
5. Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC. - 2004. – 80 p.
6. Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, Kawakami Y, Ito M. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family // FEMS Microbiol Lett. 2007. – Vol. 270 – P.67-74.
7. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci // J. Clin. Microbiol. - 2008. - Vol. 46. - № 11. - P. 3576-3584.
8. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35. – P. 907 - 914.
9. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsche-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez MC., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Loch C., van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial

interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. - 2006. – Vol. 44. – P. 4498-4510.

10. Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soolingen D., Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units // J. Clin. Microbiol. – 2001 № 39. –P. 3563–3571.

11. Van Embden J., Cave M., Crawford J. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. – 1993. – V. 31. – P. 406-409.

12. Weniger T., Krawczyk J., Supply P., Niemann S, Harmsen, D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria // Nucleic Acids Res. – 2010. – Vol. 38. - Suppl. W326-331.

Информационно-методические документы

1. МУ № 2000/185 «Организация и содержание противоэпидемических мероприятий в очагах туберкулеза». СПб, 2001.

2. Пособие для врачей «Генетическое маркирование возбудителя туберкулеза и его применение в эпидемиологическом обследовании очагов». СПб, 2003. -12 с. (Утв. МЗ РФ 20.12.02, протокол № 5).

3. Пособие для врачей «Генотипирование возбудителя туберкулеза методом сполитипирования». СПб, 2004. – 19 с. (Утв. МЗ РФ 02.12.04, протокол № 5.)

4. Выявление микобактерий туберкулеза генотипа Beijing методом полимеразной цепной реакции. Методические рекомендации. СПб, 2010. – 12 с. (Утв. Комитетом по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, протокол № 3).