

© Коллектив авторов, 2012

И.В. КАРАНДАШОВА, Н.Н. ПИМЕНОВ, А.Д. НЕВЕРОВ, Г.В. МИХАЙЛОВСКАЯ, В.А. ДОЛГИН,
С.И. БРАСЛАВСКАЯ, С.В. КОМАРОВА, И.Н. ЛЫТКИНА, Н.И. ШУЛАКОВА, Г.А. ШИПУЛИН, В.П. ЧУЛАНОВ

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВСПЫШКИ ГЕПАТИТА А В МОСКВЕ

ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

ФГБУ Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина, Москва;
Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по г. Москве

В статье приведены результаты расследования крупной вспышки гепатита А, зарегистрированной в Москве в начале 2010 г., с использованием молекулярно-биологических методов. В результате проведенного исследования были выявлены штамм субтипа IA, вызвавший вспышку гепатита А в Москве, и генетически близкородственные ему штаммы, а также штаммы субтипов IA и IIIA, не связанные со вспышкой. Филогенетический анализ выявленных штаммов позволил обнаружить эпидемический очаг гепатита А в одном из образовательных учреждений Москвы, который не был связан с основной вспышкой. Показано, что при расследовании случаев групповых заболеваний гепатитом А важное значение имеют молекулярно-биологические методы, позволяющие установить или опровергнуть наличие эпидемиологической связи между различными случаями заболеваний и выявить завозные случаи инфекции

Ключевые слова: вирус гепатита А, вспышка гепатита А, генотип, субтип, штамм.

I.V. KARANDASHOVA, N.N. PIMENOV, A.D. NEVEROV, G.V. MIKHAILOVSKAYA, V.A. DOLGIN,
S.I. BRASLAVSKAYA, S.V. KOMAROVA, I.N. LYTKINA, N.I. SHULAKOVA, G.A. SHIPULIN, V.P. CHULANOV

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HEPATITIS A OUTBREAK IN MOSCOW

Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, Moscow;
A.N. Sysin Research Institute of Human Ecology and Environmental Hygiene, Moscow;
Moscow Department, Federal Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, Moscow

The paper presents the results of a molecular biological investigation of a large hepatitis A outbreak recorded in Moscow at the beginning of 2010. The investigation identified HAV subtype IA, which had caused the outbreak of hepatitis A in Moscow, and its genetically closely related strains and subtypes IA and IIIA, unassociated with the outbreak. Phylogenetic analysis of the identified HAV strains allowed one to disclose an epidemic focus of hepatitis A at one of the educational institutions of Moscow, which had not been linked with the major outbreak. The investigation of cases of group hepatitis A diseases has demonstrated that molecular biological methods that make it possible to establish or rule out an epidemiological relationship between different cases of the disease and to detect imported infection cases are of great importance.

Key words: hepatitis A virus, hepatitis A outbreak, genotype, subtype, strain.

В последние годы наблюдается значительное снижение интенсивности эпидемического процесса гепатита А (ГА) на территории Российской Федерации. С 2001 по 2010 г. показатель заболеваемости ГА снизился более чем в 12 раз (с 79,5 до 6,5 на 100 тыс. населения). Однако существующую эпидемическую ситуацию нельзя назвать

стабильной, поскольку увеличивается число лиц, восприимчивых к данной инфекции [1, 2], остается неудовлетворительным уровень санитарно-коммунального благополучия многих территорий страны, продолжается миграция населения из эндемичных по ГА стран [3].

Анализ заболеваемости ГА в Москве в период с 2001 по 2010 г. также демонстрирует выраженную тенденцию к снижению. При этом показатель заболеваемости ГА до 2009 г. ни разу не превысил общероссийский. Однако в 2010 г. в Москве произошел резкий рост числа зарегистрированных случаев ГА (1156), что обусловило почти двукратное увеличение показателя заболеваемости по

Для корреспонденции:

Карандашова Инга Вадимовна, канд. биол. наук,
ст. науч. сотр. лаб. вирусных гепатитов отд. молекулярной
диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ
эпидемиологии Роспотребнадзора
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиревская, д. 3а
Телефон: (8-495)974-96-46, доб. 1174
E-mail: inga.karandashova@pcr.ru

сравнению с предыдущим годом (10,97 на 100 тыс. населения в 2010 г. и 5,93 — в 2009 г.) и превышение в 1,7 раза показателя заболеваемости по стране в целом (рис. 1).

Основной причиной роста заболеваемости стало возникновение трех вспышек ГА, в которых пострадал 841 человек, что составило 72,8% от общего числа заболевших в 2010 г. Крупная вспышка произошла с 25 декабря 2009 г. по 15 марта 2010 г., в которой пострадали 828 человек, в том числе 61 (7,4%) житель Московской области. Среди заболевших было 67 (8,1%) детей до 17 лет. В ходе эпидемиологического расследования с факторным опросом заболевших было установлено, что значительная часть из них употребляла готовые салаты, приобретенные в магазинах одной из крупных торговых сетей, имеющей на территории Подмосквья собственный цех по производству салатной продукции.

Ранее при расследовании вспышек ГА традиционно использовали методы лабораторной диагностики, направленные на выявление анти-HAV IgM в образцах сыворотки крови больных и контактных лиц и антигена вируса гепатита А (ВГА) в образцах объектов окружающей среды. Развитие молекулярно-биологических методов в последние десятилетия позволило значительно расширить представления о ВГА, его характеристиках и свойствах. В 1987 г. была определена полная нуклеотидная последовательность генома вируса [4], в 1992 г. предложена первая классификация генотипов [5]. В настоящее время выделяют 6 генотипов ВГА (I–VI), при этом наиболее распространенными в мире являются генотипы IA и IIIA [6, 7]. Разработка молекулярно-биологических методов детекции и генотипирования возбудителей инфекционных болезней привела к их широкому внедрению как в клиническую практику, так и в работу специалистов, осуществляющих эпидемиологический надзор, в том числе для расследовании вспышек ГА [8, 9].

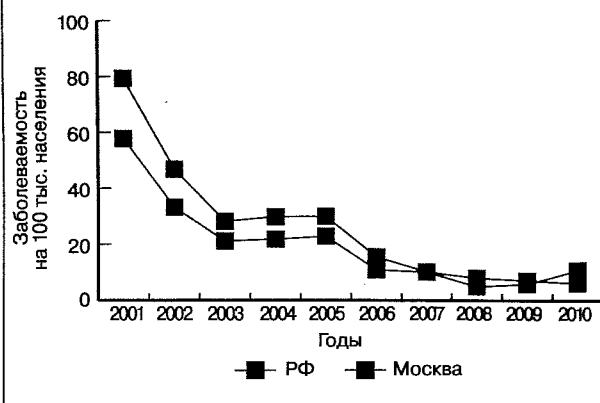
Цель настоящей работы — оценка возможностей молекулярно-биологических методов при расследовании вспышек ГА в условиях крупного мегаполиса.

Материалы и методы

В исследование было включено 189 образцов сыворотки крови больных ГА, 65 образцов салатной продукции и продовольственного сырья, 12 образцов элюатов водных проб и 8 образцов проб питьевой воды по 20 л, отобранных до проведения дезинфекционных мероприятий из распределительной водопроводной сети цеха по производству салатной продукции и скважин, расположенных на прилегающей к цеху территории.

Для оценки микробиологических показателей (общее микробное число, термотолерантные колиформные бактерии, колифаги, споры сульфитредуцирующих клостридий) исследовано 500 мл из каждой пробы воды. Для молекулярно-биологического исследования каждый образец воды был сконцентрирован на фильтровальном модуле с мембранами с усиленным положительным зарядом (до 40 мВ/см²). РНК ВГА выделяли

Рис. 1. Заболеваемость ГА в Российской Федерации и Москве в 2001–2010 гг. (по данным формы федерального статистического наблюдения № 2)



из 100 мкл образца сыворотки крови с помощью автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция). РНК ВГА, энтеровирусов, ротавирусов, астровирусов и норовирусов выделяли из 1000 мкл образцов концентратов и элюатов водных проб и смывов с образцов салатной продукции и продовольственного сырья с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Выявление РНК ВГА, энтеровирусов, ротавирусов, норовирусов и астровирусов проводили с использованием комплектов реагентов «АмплиСенс® HAV-FL» [10], «АмплиСенс® Enterovirus», «АмплиСенс® Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» соответственно. Все вышеуказанные комплекты реагентов и реагенты, используемые для проведения ПЦР и обратной транскрипции, производства ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Субтипирование ВГА проводили методом ПЦР с субтипспецифичными праймерами. Для определения штаммов проводили секвенирование двух вариабельных фрагментов генома ВГА: VP1/2В длиной 410 н.п. и 2С длиной 648 н.п. Реакцию циклического секвенирования и последующую очистку продуктов реакции осуществляли с использованием реактивов для секвенирования производства «Applied Biosystems» (США). Флуоресцентное секвенирование производили с использованием автоматического секвенатора 3100 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). Филогенетический анализ штаммов осуществлялся методом Minimum Evolution (MEGA 4.1), статистическую значимость филогенетических кластеров оценивали методом Interior-branch test (1000 повторов). Изоляты, идентичные в пределах двух секвенированных областей, принимали за один штамм. Штаммы, отличающиеся друг от друга не более чем на две нуклеотидные замены в пределах двух секвенированных областей, относили к генетически близкородственным штаммам.

Результаты и обсуждение

Среди всех образцов сыворотки крови 170 (89,9%) содержали РНК ВГА. Генотип ВГА был определен для 167 изолятов вируса, 155 (92,8%) из которых относились к субтипу IA и 12 (7,2%) – к субтипу IIIA.

Секвенирование вариабельных областей генома ВГА проведено для 151 изолята. Большинство изолятов (129; 85,4%) было представлено идентичным штаммом субтипа IA ВГА (U97MSK AVP1), что позволяет сделать вывод о едином источнике заражения и является доказательством того, что данный штамм стал причиной вспышки. Анализ доминирующего штамма в пределах VP1/2B области генома показал его высокое генетическое сходство со штаммом Moscow-2001 A2K54 (AY226602) из базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank, выявленным в Москве в 2001 г.

Филогенетический анализ показал, что доминирующий штамм относится к кластеру типичных для Европейской части РФ штаммов ВГА, однако значимо отличается от штаммов субтипа IA, выявленных при расследовании вспышек на территории РФ в течение предшествующих 5 лет (рис. 2). Так, вспышки ВГА в Нижнем Новгороде (2005 г.), Тверской обл. (2005 г.) и Рязанской обл. (2009 г.) были вызваны штаммами субтипа IA, образующими общий кластер, отличный от кластера штаммов московской вспышки. Вспышка ГА в Махачкале (2008 г.) была вызвана несколькими близкородственными штаммами ВГА, типичными для южных регионов европейской части РФ и Украины. Во время вспышек ГА в Республике Тыва в 2008 и 2010 гг. выявлялись штаммы субтипа IA вируса, уникальные для этого региона и образующие на филогенетическом дереве отдельный кластер. Для вспышки ГА в Сахалинской обл. (2006 г.) были характерны штаммы вируса, филогенетически близкие штаммам, выявлявшимся ранее в Средиземноморском регионе [11].

В период вспышки в Москве также были выявлены 5 штаммов, генетически близкородственных доминирующему штамму, которые образовывали с ним на филогенетическом дереве единый кластер, что может свидетельствовать об их эпидемиологической связи со вспышкой (см. рис. 2).

Кроме того, во время вспышки было выявлено 3 штамма субтипа IA, которые не кластеризовались с доминирующим штаммом, что позволяет сделать вывод об отсутствии связи данных штаммов со вспышкой. Один из этих штаммов (U60Z13), который был выявлен в 6 образцах сыворотки крови, неоднократно выявлялся в нескольких регионах европейской части России: во время вспышки ГА в Тверской обл. в 2005 г., в Новгородской обл. и в образце воды из Москвы-реки в 2007 г., а также стал причиной вспышки ГА в пос. Костино Рыбновского района Рязанской обл. в октябре 2009 г. Это позволяет считать данный штамм эндемичным для территории Европейской части РФ. Два других штамма не кластеризовались с типичными для Европейской части РФ штаммами, но попадали в филогенетический кластер штаммов, встре-

чающихся на территории стран СНГ. Случаи заболевания, вызванные данными штаммами, вероятнее всего, являются завозными из республик Средней Азии, так как близкие штаммы вируса ранее выявлялись в Таджикистане и Узбекистане. Значительные генетические отличия этих штаммов от доминирующего исключают их эпидемиологическую связь со вспышкой. Случаи ГА, вызванные данными штаммами, являются спорадическими, выявленными на фоне вспышечной заболеваемости.

В 12 исследованных образцах были выявлены штаммы субтипа IIIA ВГА, что однозначно исключает эпидемиологическую связь данных штаммов со вспышкой. Штаммы, выявленные в 11 образцах, значительно отличаются от штаммов, характерных для Европейской части РФ, и попадают в кластер штаммов субтипа IIIA, типичных для республик Средней Азии, что говорит о завозном характере данных случаев заболевания (рис. 3).

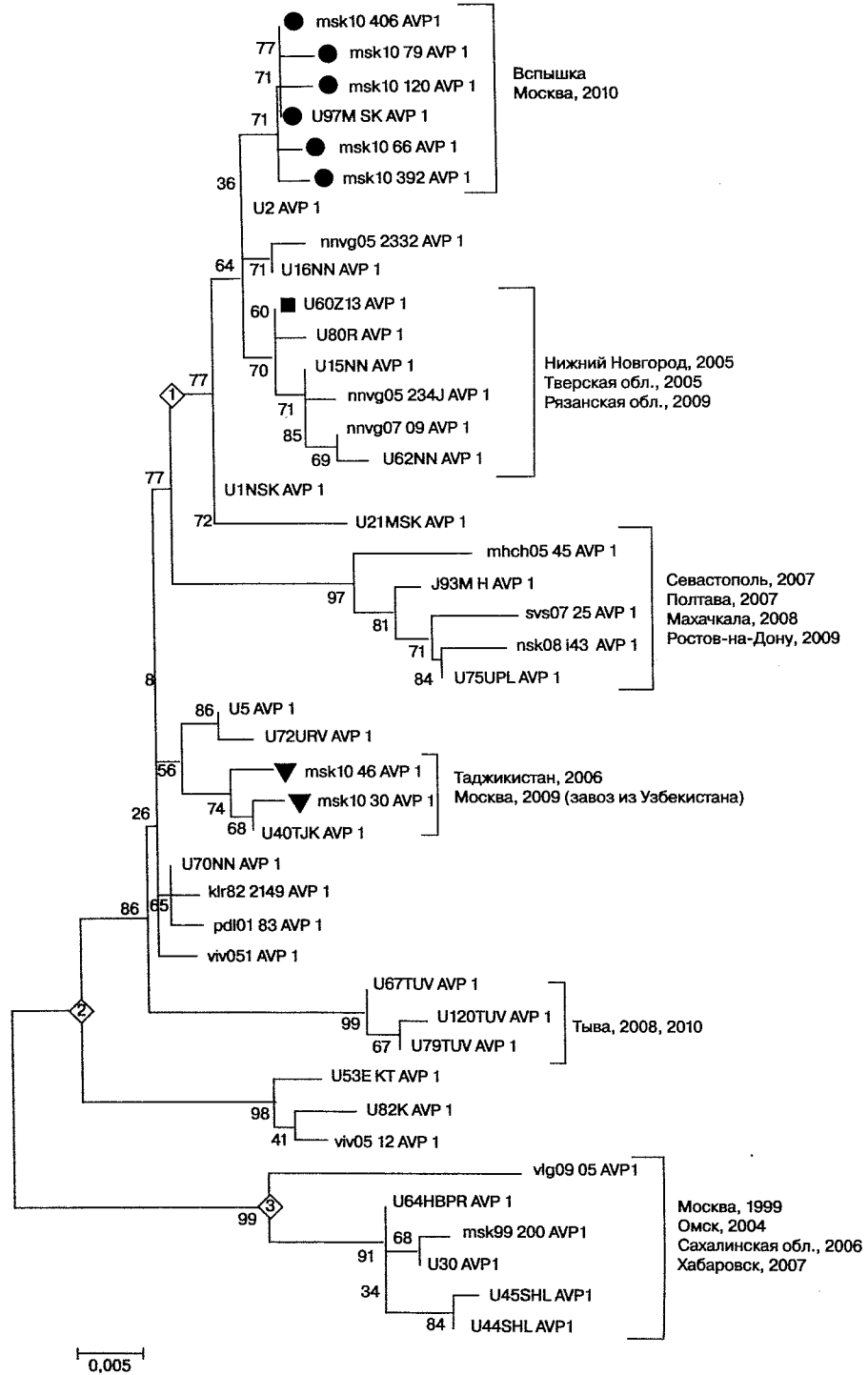
Особый интерес представляет тот факт, что среди выявленных штаммов субтипа IIIA был обнаружен идентичный штамм (U99 AVP1) в образцах сыворотки крови от трех заболевших педагогов одной из школ Москвы. Среди других сотрудников и учащихся данного образовательного учреждения в ходе эпидемиологического расследования были выявлены еще 7 случаев ГА. Таким образом, применение молекулярно-биологических методов позволило выявить эпидемический очаг ГА в образовательном учреждении, который не имел отношения к вспышке ГА в Москве, возникшей в тот же период. Остальные 8 выявленных штаммов вируса, попадающих в тот же филогенетический кластер, были уникальными для каждого образца. Случаи заболевания, вызванные данными штаммами, вероятнее всего, не имеют эпидемиологической связи, а являются отдельными случаями ГА, завезенными из республик Средней Азии. Один из случаев был вызван штаммом субтипа IIIA (msk10 119 AVP1), выявлявшимся ранее в Республике Саха, и нехарактерен для Средней Азии.

В образцах концентратов и элюатов водных проб и в смывах с образцов салатной продукции и продовольственного сырья РНК ВГА, энтеровирусов, ротавирусов, астровирусов и норовирусов не обнаружена. Результаты микробиологического исследования образцов воды по всем тестируемым показателям также были отрицательными, что свидетельствует об отсутствии фекального загрязнения анализируемых образцов.

Таким образом, в результате проведенного исследования был выявлен штамм, вызвавший вспышку ГА в Москве, и генетически близкородственные ему штаммы, а также штаммы, которые не имели эпидемиологической связи со вспышкой.

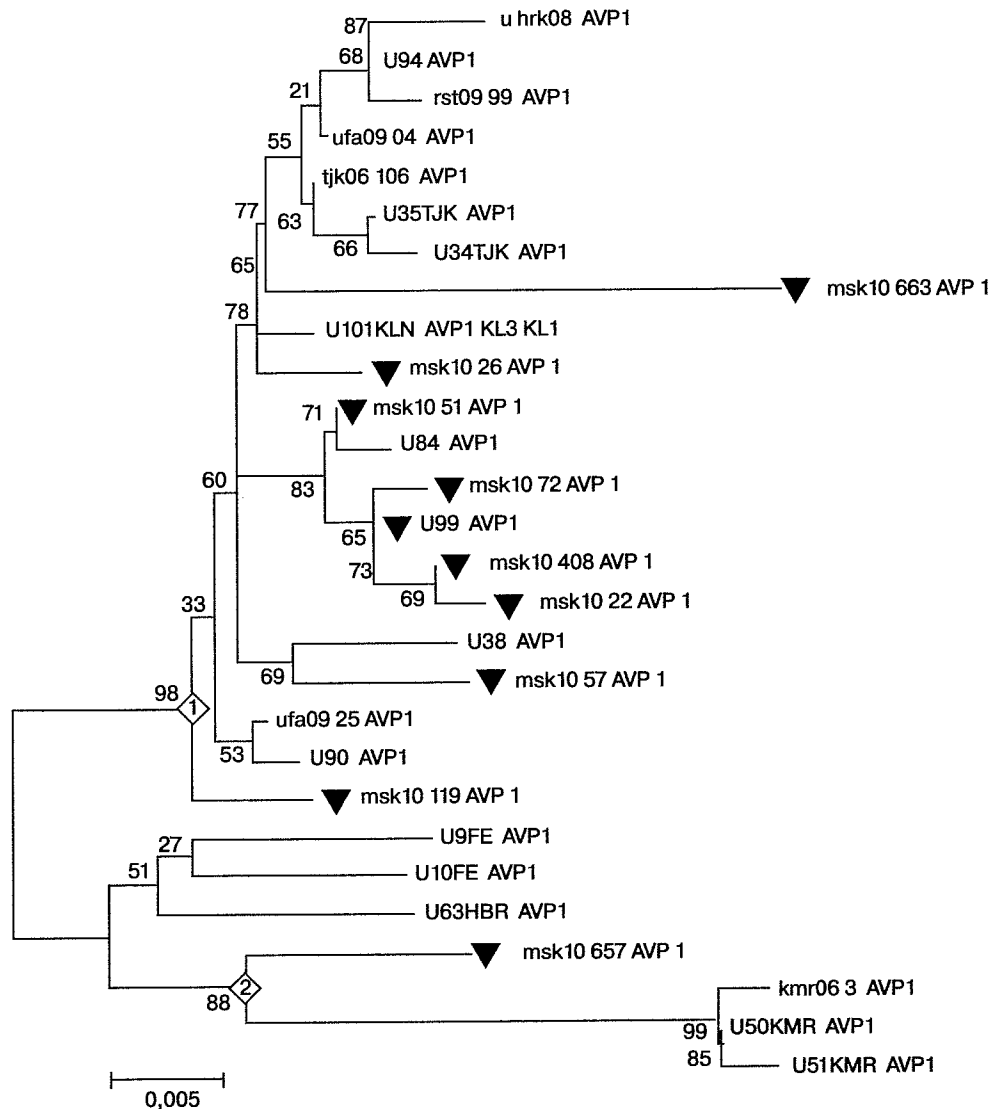
Молекулярно-биологические методы в настоящее время широко используются в практике эпидемиологических исследований, в том числе при расследовании вспышек энтеральных вирусных гепатитов. Среди молекулярных методов при расследовании вспышек ГА наиболее широко применяемыми и информативными являются методы,

Рис. 2. Филогенетическое дерево (по региону VP1/P2B) штаммов субтипа IA ВГА, выявляемых на территории России и сопредельных государств



1 — кластер штаммов, типичных для европейской части РФ;
 2 — кластер штаммов, встречающихся на территории стран СНГ;
 3 — кластер штаммов, встречающихся в Средиземноморском регионе.
 Штаммы, выявленные во время вспышки, отмечены геометрическими фигурами:
 кругом — штамм, вызвавший вспышку гепатита А в Москве (U97MSK AVP 1) и близкородственные ему штаммы,
 квадратом — штамм U60Z13,
 треугольником — штаммы, относящиеся к филогенетическому кластеру штаммов, встречающихся на территории стран СНГ

Рис. 3. Филогенетическое дерево (по региону VP1/P2B) штаммов субтипа IIIA ВГА, выявляемых на территории России и сопредельных государств



1 — кластер штаммов, типичных для республик Средней Азии;
 2 — кластер штаммов, встречающихся в азиатской части РФ.
 Штаммы, выявленные во время вспышки, отмечены треугольником.

основанные на ПЦР, секвенировании нуклеиновых кислот с последующим филогенетическим анализом. Комплексный анализ данных, полученных на разных этапах расследования с применением молекулярно-биологических методов, и данных классического эпидемиологического расследования позволяет сократить сроки расследования, более точно идентифицировать этиологический агент и источники инфекции и с высокой степенью надежности установить или опровергнуть факт связи отдельных случаев инфекции между собой, а также с выявленными источниками и выявить завозные случаи инфекции.

Литература

1. Мукомолов С.Л., Шляхтенко Л.И., Плотникова В.А. и др. Характеристика манифестного и скрытого компонентов эпидемического процесса гепатита А в городах России. ЖМЭИ 2001; 3: 35–39.
2. Быстрова Т.Н., Ефимов Е.И. Эволюция эпидемического процесса, стратегия и тактика вакцинопрофилактики гепатита А на территории крупного города средневропейской части России. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика 2011; 3(58): 82–86.
3. Опищенко Г.Г. Время контроля гепатита А в России. Эпидемиол. и сан. 2010; 2: 3–4.

4. *Cohen J.I., Rosenblum B., Ticehurst J.R.* Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *PNAS* 1987; 84 (8): 2497–2501.
5. *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; 73: 1365–1377.
6. *Costa-Mattioli M., J. Cristina, H. Romero et al.* Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J. Virol.* 2002; 76: 9516–9525.
7. *Lu L., Ching K. Z., de Paula V. S. et al.* Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J. Gen. Virol.* 2004; 85: 2943–2952.
8. *Мукомолов С.Л., Парков О.В., Давидкин И.И. и др.* Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вспышки гепатита А среди работников сети продовольственных магазинов. *Журн. микробиол.* 2008; 4: 42–45.
9. *Онищенко Г.Г., Шахгильдян И.В., Петров Е.Ю. и др.* Водная вспышка гепатита А в Нижнем Новгороде. *Эпидемиол. и инфекц. бол.* 2007; 3: 4–9.
10. *Карандашова И.В., Неверов А.Д., Долгин В.А., Чуланов В.П.* Разработка набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита А (HAV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиценс® HAV-FL». В кн.: Сборник трудов VII Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010». М., 2010; 5: 17–20.
11. *Неверов А.Д., Карандашова И.В., Долгин В.А. и др.* Молекулярно-эпидемиологическая характеристика групповой и спорадической заболеваемости гепатитом А в России и странах СНГ в 2005–2010 гг.: В кн.: Сборник трудов VII Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010». М., 2010; 1: 265–268.

Поступила 11.02.12

Сведения об авторах:

- Пименов Николай Николаевич**, аспирант ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
- Неверов Алексей Дмитриевич**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. вирусных гепатитов отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
- Михайловская Галина Валентиновна**, науч. сотр. лаб. вирусных гепатитов отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
- Долгин Вадим Александрович**, мл. науч. сотр. лаб. вирусных гепатитов отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; мл. науч. сотр. ФГБУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина
- Браславская Светлана Ивановна**, науч. сотр. группы клонирования отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
- Комарова Светлана Васильевна**, науч. сотр. лаб. вирусных гепатитов отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
- Лыткина Ирина Николаевна**, нач. отд. эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по г. Москве
- Шулакова Надежда Ивановна** – зам. нач. отд. эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по г. Москве
- Шипулин Герман Александрович**, канд. мед. наук, зав. отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
- Чуланов Владимир Петрович**, канд. мед. наук, зав. лаб. вирусных гепатитов отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора