

УДК 616.9-022.36-036.22

## Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций

И.А. Шагинян

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва, Россия

Внутрибольничные инфекции (ВБИ) являются одной из актуальных проблем, приобретающих с каждым годом все большую медицинскую и социальную значимость. В борьбе с ВБИ одним из существенных звеньев может стать постоянно действующая система мониторинга эпидемиологической обстановки. Важная роль в этой системе должна принадлежать микробиологической лаборатории, осуществляющей идентификацию и типирование возбудителей ВБИ с помощью молекулярно-генетических методов.

В статье представлена значимость использования молекулярно-генетических методов на различных этапах исследования ВБИ. Дана характеристика молекулярно-генетических методов исследования. Проанализированы молекулярные маркеры, на основе которых осуществ-

ляется генетическое типирование. Представлены критерии выбора молекулярно-генетических методов для эпидемиологических исследований ВБИ, правила интерпретации результатов типирования, разработанные для возбудителей ВБИ, оптимальные методы их типирования. Приведены доказательства, что молекулярно-генетические методы типирования возбудителей ВБИ представляют собой мощный инструмент госпитальных микробиологов, эпидемиологов и клинических врачей в борьбе с ВБИ. Подчеркивается необходимость создания референс-лабораторий генетического типирования возбудителей ВБИ для более эффективной борьбы с госпитальными инфекциями.

**Ключевые слова:** внутрибольничная инфекция, ДНК, генетические методы, молекулярная эпидемиология.

## Role and Significance of Molecular Methods in Epidemiological Analysis of Nosocomial Infections

I.A. Shaginyan

Research Institute of Epidemiology and Microbiology Named Under N.F. Gamaleya RAMS, Moscow

The problem of nosocomial infections remains the issue of the day and every year its medical and social significance becomes more and more relevant. Permanently working System for epidemiological monitoring could be one of major elements in the fight against nosocomial infections. Micro-

biological laboratories that identify and type nosocomial pathogens using molecular methods should be at the basis of the work of the System.

The article characterises molecular methods and their significance surveillance at various stages of nosocomial infections investigations. Molecular markers that lies at the basis of genetic typing are analysed in the paper. The article shows selection criteria for molecular methods used for nosocomial infections epidemiological research, as well as the test results interpretation principles worked out for nosocomial infection pathogens. Optimal methods for typing of pathogens are given in the article, that

Контактный адрес:

Игорь Андронникович Шагинян  
123098, Москва, ул. Гамалеи 18,  
лаборатория аналитической микробиологии  
НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.  
Тел.: (095) 193-55-94  
Эл. почта: 1570.g23@g23.relcom.ru

serve as a proof that molecular methods is a powerful tool of clinical microbiologists, epidemiologists and physicians in their struggle against nosocomial infections. The article underlines the necessity of initiating reference-laboratories for nosocomial

pathogens molecular typing that would make the fight against nosocomial infections more effective.

**Key words:** nosocomial infection, DNA, genetic methods, molecular epidemiology.

## Введение

Несмотря на значительный прогресс в различных областях медицины и здравоохранения, проблема *внутрибольничных инфекций* (ВБИ) остается одной из самых острых. С каждым годом она приобретает все большую медицинскую и социальную значимость. Во многих странах наблюдается рост заболеваемости ВБИ, что связано с увеличением частоты оперативных и инвазивных лечебных и диагностических процедур (хирургических, терапевтических, биопсий, пункций и т. д.), распространением в лечебно-профилактических учреждениях множественно-устойчивых штаммов микроорганизмов, изменением структуры популяции больных [1, 2].

В России проблема ВБИ является такой же актуальной, как и в других странах [3]. Ее актуальность подтверждается постоянно регистрируемыми вспышками ВБИ в лечебно-профилактических учреждениях страны, число которых не уменьшается, а в ряде регионов имеет тенденцию к росту. Поэтому на современном этапе требуется оптимизация мер борьбы с ВБИ и ее профилактики.

Мерой борьбы с ВБИ может стать постоянно действующая организационная система мониторинга эпидемиологической обстановки, в которой должны участвовать специалисты различного профиля. На основе этой системы должны разрабатываться мероприятия по предупреждению ВБИ и контролю за их выполнением. Одной из составляющих такого мониторинга в данной системе является деятельность микробиологической лаборатории, основные задачи которой состоят в идентификации возбудителей ВБИ и их типирование. Решение этих задач позволяет выявить возбудитель ВБИ, источник инфекции, раскрыть механизмы появления и циркуляции госпитальных штаммов.

*Цель настоящей статьи* – раскрыть роль и место современных молекулярно-генетических методов типирования, которые должны использоваться в системе эпидемиологического надзора за ВБИ.

## Значимость молекулярно-генетических методов на различных этапах исследования внутрибольничной инфекции

Установить роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе

ВБИ легче всего при анализе этапов исследования внутрибольничной вспышки. Как видно из данных табл. 1, на каждом этапе исследования ВБИ роль микробиологической лаборатории является одной из определяющих.

На этапах распознавания и выявления случаев ВБИ главные задачи состоят в микробиологическом подтверждении и точной идентификации возбудителя. На следующих этапах необходимо его типирование и использование результатов для характеристики вспышки, то есть для установления источника и механизмов передачи возбудителей ВБИ и ее резервуаров.

Наконец, на этапах противоэпидемических мероприятий микробиологической лабораторией осуществляется контроль их эффективности и разрабатывается система раннего предупреждения ВБИ.

Таким образом, типирование (“маркировка”) штаммов возбудителей ВБИ является существенной частью работы лаборатории клинической микробиологии при эпидемиологическом анализе госпитальных инфекций. Однако не каждый метод типирования позволяет объективно и полно решать те или иные задачи исследования внутрибольничной вспышки или случая ВБИ. В связи с этим приводим их характеристику.

## Характеристика методов типирования возбудителей внутрибольничных инфекций

Методы типирования ВБИ делят на фено- и генотипические.

*Фенотипические методы* – это методы, с помощью которых определяется характеристика, экспрессируемая микроорганизмами. *Генотипические методы* представляют собой методы исследования структуры ДНК.

Основой типирования является положение, суть которого состоит в том, что клонально родственные *изоляты* имеют определенную характеристику, или признаки, посредством которых они могут быть дифференцированы от неродственных изолятов. *Изолят* в данном понимании – это отдельная колония, которая происходит от единственной микробной клетки. *Штамм* – это набор изолятов, которые при анализе с помощью любых методов типирования неотличимы друг от друга, но могут быть дифференцированы от других изолятов.

**Таблица 1. Роль микробиологической лаборатории на различных этапах исследования вспышки внутрибольничной инфекции**

Этап исследования	Участие лаборатории
1. Распознавание проблемы: а) выявление случая; б) подтверждение появления заболевания в стационаре	1. Лабораторный надзор и ранняя система предупреждения: а) микробиологическое подтверждение
2. Завершение выявления случаев: а) достоверность сообщений; б) полнота сообщений; в) получение дополнительных данных	2. Получение точной микробиологической характеристики: а) поиск данных по другим случаям, анализ лабораторных методов; б) подготовка полных демографических данных; в) выделение новых культур (при необходимости)
3. Является ли это необычным? а) вычисление показателей случаев инфекции; б) сравнение со средними показателями заболеваемости; в) эпидемия – выше среднего уровня	3. Анализ архивных данных о появлении подобных случаев
4. Характеристика вспышки: а) демографические особенности больных; б) локализация; в) время	4. Один штамм или много: а) методы типирования
5. Формирование гипотезы о внутрибольничной вспышке: а) механизм передачи возбудителя; б) резервуары; в) факторы передачи	5. Выделение культур возбудителей из объектов окружающей среды, от медицинского персонала (при необходимости)
6. Инициирование мероприятий по борьбе со вспышкой внутрибольничной инфекции	6. Инициирование микробиологических исследований в мероприятиях по борьбе с внутрибольничными инфекциями
7. Продолжение наблюдения в целях обеспечения эффективности противоэпидемических мероприятий	7. Лабораторный надзор и система раннего предупреждения

Такие изоляты (штамм) клонально родственны друг другу. При этом клональность является не абсолютным, а относительным понятием, поскольку в строгом понимании клональными могут быть названы только те изоляты или штаммы, чьи геномы *секвенированы*, а их нуклеотидные последовательности полностью идентичны.

Методы типирования оцениваются по нескольким критериям. В соответствии с данными критериями (табл. 2) суммирована характеристика наиболее распространенных методов. Можно видеть, что по большинству показателей фенотипические методы значительно уступают генотипическим. Это связано с тем, что возможности фенотипических методов ограничены вследствие способности микроорганизмов изменять экспрессию соответствующих генов. Такие изменения могут происходить непредсказуемо или в ответ на влияние различных факторов окружающей среды.

Проблемы, связанные с недостатками фенотипических методов типирования, стимулировали развитие методов типирования, основанных на исследовании структуры ДНК. Предназначенные первоначально только для научных исследований, в настоящее время генотипические методы начинают занимать доминирующее место в решении различных проблем медицинской микробиологии и эпидемиологии.

### **Молекулярные маркеры, используемые в генетическом типировании**

Генетическое типирование основано на выявлении различий структуры ДНК интересующей исследователя выборки штаммов. Эти различия тестируются с помощью различных молекулярных маркеров. Наиболее распространенные из них можно разделить на 6 групп (табл. 3).

К **п е р в о й** группе маркеров относятся нуклеотидные последовательности, являющиеся спе-

Таблица 2. Характеристики методов типирования возбудителей внутрибольничных инфекций

Методы типирования	Доля типлируемых штаммов	Воспроизводи- мость	Разрешающая сила	Легкость	
				интерпретации	выполнения
Фенотипические:					
биотипирование	Все	Плохая	Плохая	Отличная	Отличная
устойчивость к антимикробным препаратам	Все	Удовлетвори- тельная	Плохая	Отличная	Отличная
серотипирование	Большинство	Хорошая	Удовлетво- рительная	Хорошая	Удовлетво- рительная
фаготипирование	Большинство	Удовлетвори- тельная	Удовлетво- рительная	Удовлетвори- тельная	Плохая
иммуноблоттинг	Все	Хорошая	Хорошая	Удовлетвори- тельная	Хорошая
МЭЭ (мультилокусный энзимэлектрофорез)	Все	Отличная	Хорошая	Отличная	Хорошая
Генотипические:					
плазмидный анализ	Большинство	Хорошая	Хорошая	Хорошая	Отличная
рестрикционный анализ хромосомной ДНК	Все	Хорошая	Хорошая	Плохая	Отличная
риботипирование	Все	Отличная	Удовлетво- рительная	Хорошая	Хорошая
пульс-электрофорез	Все	Отличная	Отличная	Отличная	Хорошая
ПДРФ-ПЦР	Все	Отличная	Хорошая	Отличная	Хорошая
ПП-ПЦР	Все	Хорошая	Хорошая	Удовлетвори- тельная	Хорошая
анализ нуклеотидной последова- тельности (секвенирование)	Все	Отличная	Отличная	Отличная	Удовлетво- рительная

цифическими сайтами для эндонуклеаз рестрикции. К данным методам относятся старые классические методы – исследование *полиморфизма длины рестрикционных фрагментов* (ПДРФ) хромосомной и плазмидной ДНК, саузерн-блоттинг, *пульс-электрофорез* (ПЭ), а также ряд методов ПЦР-типирования – ПЦР-ПДРФ, AFLP-ПЦР.

Данные методы основаны на том, что локализация сайтов распознавания эндонуклеаз рестрикции может быть полиморфной от штамма к штамму. Таким образом, термин ПДРФ отражает полиморфную природу локализации сайтов распознавания эндонуклеаз рестрикции.

Первым и до настоящего времени наиболее распространенным среди генотипических методов исследования, основанным на определении ПДРФ ДНК, остается *плазмидный анализ*. При длительном использовании плазмидного анализа в исследовании ВБИ выявлено два основных недостатка данного метода.

Во-первых, плазмиды могут теряться как спонтанно, так и легко приобретаться штаммом хозяина, и в таких случаях эпидемиологически родственные изоляты могут иметь различные плазмидные профили [4, 5, 6].

Во-вторых, многие клинические изоляты способны терять плазмиды, в связи с чем они стано-

вятся нетипируемыми при использовании плазмидного анализа [4].

Однако, несмотря на указанные недостатки, плазмидный анализ остается полезным и эффективным методом, прежде всего при оценке изолятов, получаемых в ограниченный отрезок времени в определенном месте, например во время острой вспышки инфекции в больнице или в одном из ее отделений.

ПЭ хромосомной ДНК [7, 8] считается “золотым стандартом” типирования многих видов патогенных микроорганизмов. Результаты исследований показали высокую разрешающую силу ПЭ, а в ряде случаев – его преимущество в сравнении с большинством фено- и генотипических методов.

С помощью компьютеризированной системы сканирования гелей и разработки программ стало возможным создание банка данных профилей ПЭ для всех микроорганизмов. Данная способность отражена в недавнем послании к президенту США, касающемся инициативы по безопасности пищевых продуктов. В нем предложено передавать информацию о фингерпринтинге ДНК возбудителей пищевых инфекций в FoodNet сайты, получаемые с помощью ПЭ в целях установления источника инфекции и создания электронной сети для быстрого сравнения фингерпринтов [9].

В середине 80-х и в начале 90-х годов много по-

Таблица 3. Молекулярные маркеры, используемые для типирования патогенных микроорганизмов

Молекулярный маркер	Мишень	Метод
Сайт рестрикции эндонуклеазы	Цельная хромосома Плазмида Ген или специфическая нуклеотидная последовательность Рестрицированные фрагменты ДНК	ПЭ, ПДРФ хромосомной ДНК, плазмидной ДНК ПДРФ гена, амплифицированного в ПЦР Саузерн-блот (риботипирование) АМП-ПДРФ-ПЦР (AFLP) Саузерн-блот
IS-элементы и повторы:	Рестрицированные фрагменты хромосомной ДНК	Саузерн-блот
а) IS-подобный фагу M13 б) REP, ERIC, BOX последовательности энтеробактерий и стрептококков в) IS 6110, IS1081 <i>M. tuberculosis</i> г) PGRS, MPTR, DR, ETR <i>M. tuberculosis</i>	Хромосома	ПЦР-ПДРФ, Rep-ПЦР, ERIC-ПЦР, ETR-ПЦР и др.
Случайные" повторы	Весь геном (хромосома + плазмид(а)ы + фаг(и))	RAPD (ПП)-ПЦР
Конформационные особенности однонитевой ДНК	Ген или специфическая нуклеотидная последовательность	ПЦР-SSCP-, К-ПЦР
Экспрессирующиеся гены	Весь геном (суммарная РНК)	RT-ПЦР + саузерн-блот анализ
Нуклеотидная последовательность	Ген или специфическая нуклеотидная последовательность	Секвенирование

лезной информации о генетической структуре популяций возбудителей инфекций получено с помощью рестрикционного анализа хромосомной ДНК возбудителей и его варианта – *саузерн-блот анализа* [10], в котором для облегчения учета в качестве маркера используются *зонды* [11].

В саузерн-блоте типирование осуществляется как бы по двум молекулярным маркерам: по сайтам рестрикции эндонуклеаз и по присутствию в рестрицированных фрагментах специфических нуклеотидных последовательностей, тестируемых с помощью зондов.

Наиболее распространенным вариантом саузерн-блот анализа является *риботипирование* [4, 12, 13], в котором в качестве зондов выступают нуклеотидные последовательности генов 16S и 23S рРНК и гипервариабельные нуклеотидные последовательности, рассеянные по геному многих патогенных видов бактерий [14].

С накоплением данных установлено, что риботипирование характеризуется умеренной разрешающей силой, в то время как разрешающая сила ПДРФ-саузерн-блоттинга при использовании в качестве зонда гипервариабельных последовательностей сопоставима с ПЭ.

Подобно ПЭ, анализ ПДРФ-саузерн-блоттинга может осуществляться с помощью компьютеризированной системы сканирования гелей и программ банка данных ПДРФ профилей. Саузерн-блот при использовании в качестве зонда IS 6110 является определяющим среди всех методов типирования возбудителя туберкулеза [15].

В начале 90-х годов для типирования патогенных микроорганизмов были разработаны и стали широко использоваться два варианта ПЦР, принципы которых подробно рассмотрены в 1994–1995 гг. в обзорах А. van Belkum [16], И.А. Шагиняна и А.Л. Гинцбурга [17].

В первом варианте ПЦР-ПДРФ амплифицируется генетический локус (ген или специфическая нуклеотидная последовательность) с помощью специфических праймеров. Далее продукт амплификации анализируется после расщепления эндонуклеазами рестрикции аналогично рестрикционному анализу. При оптимальном выборе амплифицируемого гена или нуклеотидной последовательности этот метод характеризуется высокой разрешающей силой. Примерами таких продуктов амплификации могут служить ген *ureC* *H. pylori* [18, 20], ген коагулазы у *S. aureus* [16], *katG* ген у *M. tuberculosis* [21].

ПЦР-ПДРФ может быть методом выбора для типирования ряда возбудителей вирусных инфекций. Некоторые из них способны вызывать вспышки ВБИ. Например, данный метод широко используется в эпидемиологических исследованиях инфекции, вызванной *вирусом гепатита С* (HCV).

F. Davidson et al. [22] разработали простой метод определения генотипа на основе анализа ПДРФ 5' нетранслируемой области генома HCV, позволившего авторам дифференцировать вирусные штаммы на 9 групп. С помощью ПЦР-ПДРФ изучено географическое распространение различных генотипов вируса гепатита С.

Ко второй группе молекулярных маркеров, используемых для типирования, относятся IS-элементы и повторяющиеся нуклеотидные последовательности, которые рассеяны по геному. Их расположение в хромосоме может варьировать от штамма к штамму. К методам типирования на основе ПЦР, в которых амплифицируются повторяющиеся последовательности, относятся Rep-ПЦР и RAPD-ПЦР.

В разработанной J. Versalovic и другими исследователями Rep-ПЦР [23, 24] амплифицируются повторяющиеся (repetitive) нуклеотидные последовательности, рассеянные по геномной ДНК [25, 26]. Для типирования используются две основные последовательности повторяющихся элементов – *повторяющиеся экстрагенные палиндромные элементы* (ПЭПЭ) и *внутригенные постоянные последовательности* (ВПП). Оба варианта имеют хорошую разрешающую силу на штаммовом уровне, в связи с чем Rep-ПЦР становится наиболее широко используемым методом ДНК-типирования.

Показано, что Rep-ПЦР имеет большую разрешающую силу, чем *мультилокусный энзимэлектрофорез* (МЭЭ). В ряде исследований показано, что метод Rep-ПЦР фактически сопоставим по разрешающей силе с ПЭ [27]. Rep-ПЦР можно стандартизовать, что позволяет осуществлять сравнительный анализ штаммов, выделенных в различных лабораториях.

ПП-ПЦР или ПЦР с использованием произвольных праймеров (RAPD) отнесена нами к третьей группе молекулярных маркеров или “случайных” повторов, и основана на использовании коротких произвольных олигонуклеотидных праймеров длиной 9–10 нп, которые гибридизуются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига. В данном варианте ПЦР-типирования короткие праймеры и низкая температура отжига используются для инициации амплификации нуклеотидных последовательностей в различных областях генома [17, 28, 29, 30].

К четвертой группе молекулярных маркеров нами отнесены маркеры, основанные на конформационных изменениях одонитевой ДНК, когда в тестируемой нуклеотидной последовательности наблюдаются точковые мутации. Эти точковые мутации способны изменять конформацию в одонитевых ДНК, которую можно тестировать в электрофорезе по различной подвижности конформационно отличающихся одонитевых ДНК.

Два метода – ПЦР-SSCP (single stranded conformational polymorphism) и CFLP-ПЦР, основанные на этом принципе, все шире используются для типирования патогенных микроорганизмов [31, 32].

К сожалению, еще нет достаточных данных о типировании патогенных микроорганизмов с помощью метода ПЦР-SSCP, чтобы оценить его разрешающую силу и воспроизводимость. Однако при оптимизации условий, в частности при правильном подборе праймеров, условий электрофореза (температура, концентрации геля и др.), который осуществляется, как и в ПП-ПЦР, методом проб и ошибок ПЦР-SSCP позволяет обеспечить высокий уровень выявления мутаций в большом количестве неохарактеризованных образцов.

Таким образом, ПЦР-SSCP может быть методом выбора в эпидемиологических исследованиях при необходимости анализа больших выборок штаммов патогенных микроорганизмов.

Метод ПЦР-типирования с использованием термостабильной эндонуклеазы – кливазы I (К-ПЦР), впервые описанный в 1996 г. [32], – является более сложным и характеризуется рядом недостатков (трудность интерпретации получаемых профилей, неудовлетворительная межлабораторная воспроизводимость метода), в связи с чем пока остается за пределами практических лабораторий.

В настоящее время для ряда научных исследований существует необходимость исследовать патогенные штаммы, находящиеся в различном физиологическом состоянии, например в обычной или некультивируемой форме, при изучении влияния какого-либо химического соединения на экспрессию генов патогенности, устойчивости, выявлении генетических отличий штаммов, вызывающих разные формы инфекции (острая или персистирующая), циркулирующих в окружающей и больничной среде, и т. д.

Один из оптимальных подходов – получение “молекулярных портретов”. Это позволяет установить генетические отличия у сравниваемой пары штаммов и не сходные (отличные) фрагменты далее выделять, клонировать и устанавливать их роль в изучаемом явлении. Такой молекулярный маркер назван нами *экспрессирующимися генами*.

Секвенирование последовательностей, амплифицируемых в ПЦР, объединяет все методы типирования. Рассмотренные методы основаны на различиях структуры ДНК. В связи с этим кажется вероятным, что лучшим методом типирования является секвенирование. Однако это далеко не так, несмотря на значительное упрощение и автоматизацию в последние годы методики секвенирования.

Прежде всего следует помнить, что данным методом анализируется только очень малая часть хромосомы микроорганизма. В отличие от методов ПЭ, Rep-ПЦР или ПП-ПЦР с помощью данного метода тестируется только незначительный участок хро-

мосомы, который потенциально может варьировать у штаммов бактерий. В связи с этим такая малая часть анализируемой ДНК должна отвечать нескольким критериям, чтобы ее можно было использовать для дифференциации штаммов.

**В о - п е р в ы х**, структура тестируемого гена или участка ДНК должна представлять собой вариабельную последовательность, фланкированную консервативными участками. Это позволяет проводить амплификацию последовательности с помощью ПЦР и типировать всех представителей вида.

**В о - в т о р ы х**, вариабельность внутри выбранного гена или последовательности должна быть в такой степени значимой, чтобы типировать различные штаммы определенного вида. И, наконец, выбранная для исследования последовательность не должна горизонтально передаваться в другие штаммы вида.

К сожалению, нуклеотидных последовательностей, отвечающих приведенным критериям, среди бактерий не так уж и много. Наиболее часто используемые для идентификации нового вида микроорганизмов гены 16S рРНК дают незначительную вариацию у штаммов определенного вида, а эффективность использования для типирования межгенной области между генами 16S и 23S рРНК варьирует от вида к виду [30].

Таким образом, метод секвенирования может стать "золотым стандартом" типирования патогенных микроорганизмов только после того, как для каждого вида возбудителей ВБИ будут идентифицированы видоспецифические генетические локусы, обеспечивающие с высокой разрешающей силой дифференциацию штаммов. Возможно, мы будем знать такие последовательности в 2010 г. К этому времени, как полагают, будут секвенированы полные геномы более чем у 100 видов патогенных микроорганизмов.

В отличие от бактерий для типирования вирусов ДНК секвенирование может считаться "золотым стандартом". Секвенирование ДНК характеризуется значительно большей разрешающей силой для определения генотипов HCV по сравнению с другими методами. Оно является единственным методом, с помощью которого могут быть выявлены мутации лекарственной устойчивости HCV [33].

Участки ДНК, используемые для генетического типирования вирусов и выявления мутаций лекарственной устойчивости, являются короткими и хорошо охарактеризованными последовательностями, отвечающими критериям, предъявляемым методиками секвенирования нуклеиновых кислот.

В настоящее время разрабатываются технологии на основе одновременного секвенирования не-

скольких генов, что увеличивает разрешающую силу таких методов и, следовательно, позволяет получать значительно более объективные и достоверные результаты. И хотя данные технологии еще несколько лет будут за пределами доступности практических микробиологических лабораторий, их будущее чрезвычайно привлекательно.

### **Критерии выбора молекулярно-генетических методов для эпидемиологических исследований**

Среди многочисленных генотипических методов типирования возбудителей инфекций (см. табл. 2), казалось бы, не составляет большого труда выбрать наиболее совершенный метод для эпидемиологических исследований ВБИ. Из данных табл. 2 видно, что такие методы, как ПЦР-ПДРФ, ПП-ПЦР, ПЭ и плазмидный анализ легко выполняемы, характеризуются хорошей воспроизводимостью и достаточной разрешающей силой. При этом ПЭ превосходит упомянутые методы по большинству показателей. Однако стоимость оборудования, как и стоимость одного исследования, превышает стоимость совокупного оборудования, используемого в ПЦР-ПДРФ, ПП-ПЦР и плазмидном анализе. Это обстоятельство может препятствовать их внедрению в арсенал лабораторий клинической микробиологии.

Помимо такого важного фактора, как источник финансирования лаборатории, выбор молекулярно-генетического метода зависит также от квалификации персонала. Перспективным для эпидемиологических исследований является ПЦР-SSCP, хотя до настоящего времени, как уже отмечалось, ни его разрешающая сила, ни воспроизводимость при типировании патогенных микроорганизмов еще не установлены.

Методы секвенирования ДНК пока недоступны для практических лабораторий, так как требуют не только дорогостоящего оборудования, но и специальных знаний и навыков на этапах выполнения исследования.

Кроме того, нуклеотидное секвенирование, которое называют "будущим молекулярной эпидемиологии", имеет ряд нерешенных и невыясненных проблем.

**В о - п е р в ы х**, фактически для любого возбудителя бактериальной природы не идентифицированы локусы с подходящей вариабельностью последовательности, которые бы выявляли эпидемиологически значимый штамм.

**В о - в т о р ы х**, до сих пор неясно, является ли секвенирование единственного локуса достаточным, чтобы убедительно дифференцировать штамм [30].

И, наконец, в - т р е т ь и х, автоматизированное секвенирование пока недоступно большинству не только практических, но и научных учреждений вследствие значительной стоимости оборудования (более 80 тыс. долларов США).

Несомненно, что в ближайшие годы эти проблемы будут решены, стоимость оборудования, которая постоянно снижается, уменьшится до приемлемого уровня. Тогда, вероятно, нуклеотидное секвенирование станет “золотым стандартом” в типировании патогенных микроорганизмов.

Вместе с тем для типирования вирусов ДНК секвенирование является единственным методом, удовлетворяющим цели мониторинга генетических изменений и выявления мутаций лекарственной устойчивости.

Один из важнейших критериев, предъявляемых к молекулярно-генетическим методам типирования, – способность осуществлять анализ большого количества образцов. Для лабораторий, проводящих обширные эпидемиологические исследования, данный критерий может являться определяющим. В таких случаях наиболее предпочтительными молекулярно-генетическими методами типирования могут быть разнообразные тест-системы, основанные на ПЦР, с помощью которых в ограниченный период можно тестировать сотни изолятов.

Хранение генетических профилей, то есть создание базы данных, также является важным критерием выбора метода, особенно в лабораториях крупных стационаров и больниц. В этом отношении предпочтительны такие методы, как ПЭ, ПЦР-ПДРФ, Рер-ПЦР и саузерн-блот анализ.

Резюмируя данный раздел, можно констатировать, что на выбор метода влияют несколько факторов. Суть основного условия состоит в том, что микробиологическая лаборатория должна быть готова осуществлять анализ изолятов фактически всех видов возбудителей, вызывающих ВБИ. В соответствии с этим выбранный метод должен обеспечивать тестирование максимального круга возбудителей.

Используемый метод должен обладать высокой воспроизводимостью и разрешающей силой, а получаемые результаты – легко учитываться и интерпретироваться без привлечения дополнительной экспертизы.

Выбор метода должен основываться на данных литературы, свидетельствующих о его эффективности при использовании в других лабораториях.

И, наконец, при выборе молекулярно-генетических методов необходимо учитывать стоимость не только первоначального основного оборудования, но и дополнительного, а также стоимость реактивов на проведение постоянных исследований.

Проанализировав современные молекулярно-генетические методы типирования возбудителей инфекций и помня о том, что пока нет “золотого стандарта” для методов типирования, можно прийти к выводу, что оптимальным для лаборатории является внедрение в ее практику как минимум двух доступных методов.

Наиболее экономичным вариантом для типирования возбудителей госпитальных инфекций являются *рестрикционный анализ плазмид* (РАП), так как многие возбудители ВБИ являются плазмидо-содержащими видами, а также рестрикционный анализ ампликонов (ПЦР-ПДРФ), получаемых в ПЦР. При этом оборудование для ПЦР может использоваться не только для типирования, но и для индикации возбудителей инфекций. Может использоваться также РАП с комплексе с ПЭ, характеризующимся высокой разрешающей силой и хорошей воспроизводимостью. Однако последний метод является дорогостоящим.

### **Интерпретация результатов типирования**

Общепринято, что клон – это “один или более генетически идентичных микроорганизмов, происходящий от одного общего предшественника” [4]. Однако пока не существует ни одного метода типирования, позволяющего получать данные об идентичности двух полных геномов микроорганизмов. В связи с этим множество изолятов, представляющих единственный тип по нескольким фенотипическим признакам, обозначают как “*неотличимые*”.

Для методов, характеризующихся высокой разрешающей силой, позволяющих постоянно дифференцировать эпидемиологически не связанные штаммы, описание “неотличимые” дает убедительные основания полагать, что сравниваемые изоляты родственны как генетически, так и эпидемиологически [34].

Один из подходов, примиряющий биологическую и инструментальную вариабельность, наблюдаемую при молекулярном типировании, с необходимостью предоставлять клиницистам и эпидемиологам ценную информацию заключается в том, чтобы связать генетическое родство с различной вероятностью клинического или эпидемиологического сходства [35].

Об изолятах, чьи профили типирования неотличимы, дается информация о том, что они представляют собой единственный штамм. Среди ряда изолятов обычно определяется наиболее распространенный (или “модальный”) типовой штамм, который считается вспышечным.

Изоляты, чьи профили типирования отличаются

ся от этого модального профиля единственным генетическим событием, оцениваются как близкородственные и, “возможно, представляющими часть вспышки”. Изоляты, чьи профили отличаются двумя генетическими событиями, считаются, возможно, родственными генетически и, вероятно, принадлежащими к части вспышки. Изоляты, отличающиеся от модального профиля на 3 и более генетических события, считаются генетически отличными и не являются частью вспышки [34].

Одно генетическое событие, возникающее в микроорганизме под воздействием различных условий (например, в результате лечения, перехода возбудителя из одной среды обитания в другую, передачи в новый сайт тела макроорганизма), может быть обусловлено *инсерциями* (вставками), *делециями* (выпадениями), перестройками участков хромосомы, а также заменой единственного нуклеотидного основания ДНК.

Такие генетические изменения могут изменять как сайт рестрикции, локализованный в определенном участке хромосомы, так и не влиять на сайт рестрикции. При изменении сайта рестрикции в случаях инсерции и делеции будут наблюдаться различия в позициях 3 рестриционных фрагментов по сравнению с “модальным” штаммом. Перестройка приведет к перемещению сайта рестрикции, что вызовет появление картины, где один из рестриционных фрагментов будет обладать большей молекулярной массой, а прилегающий фрагмент – меньшей.

При сравнении с “модальным” штаммом в данном варианте будут наблюдаться различия в позициях 4 фрагментов рестрикции. Все указанные отличия можно тестировать, используя только метод ПЭ (табл. 4). Учитывая также то обстоятельство, что с помощью данного метода анализируется около 90% бактериальной хромосомы (данные, получаемые при суммировании рестриционных фрагментов размером от 500 до 50 kb), ряд исследователей предлагает считать ПЭ “золотым стандартом” среди многочисленных методов генетического типирования.

Правомерность этого утверждения мы оставляем на суд читателей, снабдив его дополнительной информацией о том, что среднее число рестриционных фрагментов в ПЭ для анализа обычно составляет 12–15 фрагментов, а такие генетические события, как инсерции или делеции, способны изменять ПДРФ только у около 8% рестрицированных фрагментов, чтобы исследователь мог наблюдать изменения в их электрофоретической подвижности с помощью ПЭ. Вместе с тем при использовании ПЭ в эпидемиологических исследованиях

ВБИ необходимо руководствоваться правилом F.C. Tenover et al. [8, 34].

Изоляты, отличающиеся на 3 и менее позиции рестриционных фрагментов, необходимо считать эпидемиологически родственными и являющимися субтипами эпидемического штамма. Соответственно изоляты, различающиеся в позициях более чем 3 фрагментов, могут представлять значительно более сложные эпидемиологические взаимосвязи и должны исследоваться дополнительными методами, если этого требует эпидемиологическая ситуация.

Следует подчеркнуть, что данное правило распространяется только на анализ изолятов, циркулирующих в определенной (то есть госпитальной среде), где различия и сходство исследуются непосредственно для выяснения эпидемиологической ситуации. При сравнении же изолятов, выделенных в разных регионах и из различных объектов окружающей среды (то есть в глобальном плане), аналогичные рестриционные фрагменты у изолятов различного происхождения не обязательно будут отражать генетическое родство (идентичность) равнозначных хромосомных участков.

И, наконец, окончательное решение о том, включать ли данные о близкородственных и, возможно, родственных изолятах в описание эпидемической вспышки, основывается на интеграции всей информации, включающей микробиологические, клинические и эпидемиологические данные, характеризующие конкретную ВБИ или ее вспышку.

С помощью эпидемиологического и микробиологического мониторинга выявляется вспышка, как правило, при росте показателей инфекций, вызываемых определенными видами в конкретном стационаре, выделении одного и того же вида микроорганизмов у больных или при выявлении изолятов, имеющих другие биотипы или спектры устойчивости к антимикробным препаратам при сравнении с циркулировавшими ранее в больнице штаммами.

Таким образом, постоянный эпидемиологический мониторинг и рутинная лабораторная оценка изолятов являются практическими эпидемиологическими инструментами мониторинга, ведущая роль в котором принадлежит микробиологической лаборатории.

Когда наличие внутрибольничной вспышки подтверждается результатами эпидемиологических исследований, тогда использование молекулярных методов типирования должно подтвердить, что изоляты, выделенные в период вспышки, представляют собой единственный штамм, послуживший ее причиной. В такой последовательности и используется метод типирования для того, чтобы подтвердить обоснованность клинической или эпидемио-



фицированы двумя различными штаммами [41]. Поликлональная инфекция и колонизация также продемонстрированы у больных, инфицированных и колонизированных другими видами бактерий, включая *S. aureus* у госпитализированных больных, *P. aeruginosa* при кистозном фиброзе и *H. pylori* при гастрите [18, 42, 43]. Эти данные свидетельствуют о том, что у инфекций могут быть различные механизмы их патогенеза и развития.

### Примеры молекулярного типирования некоторых возбудителей внутрибольничных инфекций

Рассмотрим использование следующих 4 методов типирования – РАП, рестрикционный анализ хромосомной ДНК (РАХ), ПЭ и ПЦР – оптимальных для анализа возбудителей инфекционных болезней с точки зрения критериев, предъявляемых к методам типирования. Из числа возбудителей рассмотрим лишь те виды, которые чаще всего вызывают вспышки ВБИ.

***S. aureus*.** Из-за частой связи с госпитальными вспышками и множественной устойчивости к антибиотикам изоляты *S. aureus* являются предметом многочисленных эпидемиологических исследований и тестированы всеми доступными методами типирования [4, 10, 27, 39].

РАП оказался полезным для расшифровки многих вспышек, а ПЭ показал высокую разрешающую силу при типировании госпитальных штаммов, особенно MRSA [30, 39].

По нашим данным, для типирования MRSA оптимальными являются саузерн-блот с использованием в качестве зонда гипервариабельных последовательностей ДНК фага M13, ПП-ПЦР типирование и анализ фрагментов рестрикции коагулазного гена, амплифицированного в ПЦР возбудителя [10]. Показано, что вспышки ВБИ, вызываемые MRSA, обусловлены одним генотипическим вариантом, тогда как спорадическая внутрибольничная заболеваемость вызывается различными генотипическими вариантами MRSA [14].

Кроме того, установлено, что плазмидный анализ, в котором исследуется структура внехромосомной ДНК, независимой от генома клетки-хозяина, высокоэффективен при дифференциации вспышечных штаммов от контрольных, но менее эффективен при выявлении вспышечных штаммов.

Таким образом, анализ этих данных подтверждает сделанный нами ранее вывод, что в сложных или неопределенных ситуациях только использование комбинации методов может предоставить эпидемиологам наиболее объективную информацию.

**Коагулазоотрицательные стафилококки.** Как и в случаях ВБИ, обусловленных *S. aureus*, РАП и ПЭ являются достаточно эффективными методами типирования коагулазоотрицательных стафилококков. Хотя фенотипическая характеристика говорит о значительных вариациях у изолятов *S. epidermidis*, результаты генотипического анализа свидетельствуют о том, что клинически значимые штаммы обычно представлены генотипически ограниченным числом вариантов [5].

Так, идентичные риботипы выявлены среди клинически значимых штаммов разных регионов. При исследовании изолятов, выделенных из крови новорожденных, лечившихся в палатах интенсивной терапии, установлена эндемическая персистенция идентичных генотипов с помощью ПЭ [36]. Эти факты дают основание полагать, что определенные линии или генотипы *S. aureus* могут иметь значительно большую патогенность, возможно, связанную с такими факторами вирулентности, как поверхностные адгезины [36].

**Энтерококки.** ПЭ и ПЦР-типирование с использованием произвольных праймеров представляются методом выбора для анализа бактерий рода *Enterococcus* [38, 44, 48].

***E. coli* и другие представители семейства *Enterobacteriaceae*.** ПЭ наиболее эффективный метод дифференциации изолятов *E. coli*. Соответственно он обладает большей разрешающей силой, чем МЭЭ или риботипирование [35]. Это показано при типировании изолятов, выделенных от больных пиелонефритами, а несколько позднее – при анализе 160 изолятов, выделенных из крови больных в Массачусетсе и Калифорнии (США) и Найроби (Кения) [45]. Хотя имеется значительно меньше данных о типировании других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, однако показано, что ПЭ высокоэффективен при дифференциации изолятов видов родов *Klebsiella* и *Enterobacter* [37].

Анализ продуктов Рер-ПЦР при типировании представителей семейства *Enterobacteriaceae* показал, что данный метод сопоставим по разрешающей силе с МЭЭ [24]. При исследовании механизмов формирования эпидемиологически значимых штаммов *K. pneumoniae* в отделении новорожденных в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН нами было показано, что наиболее репрезентативными методами решения этой задачи является плазмидный анализ в сочетании с двумя вариантами саузерн-блот гибридизации – риботипированием и исследования ПДРФ с помощью зонда ДНК фага M13 [47].

Серотипирование остается основной характеристикой в типировании изолятов бактерий рода

*Salmonella* и, как показано, хорошо коррелирует с различными генетическими линиями [4]. Дифференциация изолятов одного серотипа остается затруднительной. Возможно, это обстоятельство отражает ограниченность генетического разнообразия.

Недавно было показано, что использование в качестве зонда IS200, видоспецифического мульткопийного IS-элемента, выявляемого в хромосоме бактерий рода *Salmonella*, позволяет дифференцировать штаммы одного серотипа и фаготипа [46].

Удовлетворительные результаты нами получены и при использовании ПП-ПЦР типирования для анализа фенотипически идентичных изолятов *S. enteritidis*, выделенных в ограниченный период в одном из отделений 1-й инфекционной больницы Москвы.

Первоначальное предположение о внутрибольничной вспышке после генетического типирования не подтвердилось, так как штамм, выделенный от предполагаемого источника, сотрудника пищеблока, без клинических проявлений сальмонеллеза, оказался генотипически отличным от штаммов *S. enteritidis*, выделенных от больных сальмонеллезом, поступивших от больницы из разных районов Москвы. Высказано предположение, что, возможно, в Москве циркулирует штамм *S. enteritidis* определенного генотипа, способный вызвать острую кишечную инфекцию.

**Виды рода *Pseudomonas* и другие грамотрицательные аэробы.** ПЭ высокоэффективен при анализе изолятов *P. aeruginosa*, *B. cepacia* и видов рода *Acinetobacter* [42, 43]. Эффективными, по нашим данным, являются варианты ПЦР типирования с использованием произвольных праймеров и амплификация интерспейсерной области рНК генов *P. aeruginosa* и *B. cepacia*.

**Микобактерии туберкулеза.** С увеличением числа случаев туберкулеза, связанных со СПИДом, и распространением вспышек, вызванных множественно-устойчивыми штаммами, типирование

*M. tuberculosis* стало чрезвычайно актуальным. Современный метод выбора типирования микобактерий – это саузерн-блот, в котором анализируются ПДРФ с помощью зонда IS 6110 [15]. Методы, основанные на ПЦР, могут быть альтернативой данному подходу. Некоторые варианты этих методов уже описаны [10].

## Заключение

Использование молекулярных методов типирования возбудителей должно стать мощным подспорьем в работе госпитальных эпидемиологов при реализации программ борьбы с ВБИ, а также врачей при лечении госпитализированных больных. В будущем молекулярно-генетическое типирование, вероятно, станет рутинным методом в микробиологических лабораториях.

В связи с увеличением числа видов микроорганизмов, способных вызывать ВБИ, и трудностями не только их типирования, но и идентификации, далеко не каждая микробиологическая лаборатория больницы или клиники способна корректно идентифицировать и типировать возбудителей ВБИ.

Поэтому в системе эпидемиологического контроля за ВБИ должны быть созданы референс-лаборатории, специалисты которых владели бы современными методами идентификации и дифференциации возбудителей ВБИ. С учетом рассмотренных положений они должны работать в тесном взаимодействии с клиницистами и госпитальными эпидемиологами над решением разнообразных проблем ВБИ.

Кроме того, одной из основных задач таких референс-лабораторий должно являться внедрение в практику новых экономичных методов идентификации и типирования. При внедрении такой программы в практику здравоохранения можно будет надеяться не только на успех в борьбе с ВБИ, но также и на решение фундаментальных и прикладных проблем микробиологии и эпидемиологии этих инфекций.

## Литература

1. Козлов Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль. Клинический микробиологический журнал 2000; 1;2:16-30.
2. Покровский В.И. Проблемы внутрибольничных инфекций. Эпидемиол и инфекц бол 1996; 2:4-9.
3. Генчиков Л.А. Эпидемиология внутрибольничных инфекций. В кн.: Проблемы инфектологии. М.: Медицина; 1991. р. 323-9.

4. Arbeit R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. Manual Clin microbiol. ASM Press; 1996. p. 190-208.
5. Archer G.L., Karchmer A.W., Vishniavsky N., et al. Plasmid-pattern analysis for the differentiation of infecting from non-infecting *Staphylococcus epidermidis*. J Infect Dis 1984; 149:913-20.
6. Wachmuth K. Genotypic approaches to the diagnosis of bacterial infections: plasmid analysis and gene probes. Infect Control 1985; 6:100-9.

7. Schwartz D.C., Cantor C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37:67-75.
8. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.
9. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, U.S. Environmental protection agency, and Centers for Diseasecontrol and prevention. Food safety from farm to table: a national food safety initiative Report to the president. Washington: Food and Drug Administration; 1997. p.3.
10. Шагинян И.А., Першина М.Ю. Генетические маркеры в эпидемиологии бактериальных инфекций. *Журн микробиол* 1997; 4:54-9.
11. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503-17.
12. Olsen G.J., Woese C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB* 1993; 7:113-23.
13. Stull T.L., LiPuma J.J., Edling T.D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis* 1988; 157:280-6.
14. Шагинян И.А. Идентификация и типирование патогенных бактерий: современные подходы. *Вестн РАМН* 2000; 1:22-8.
15. Troesch A., Nguyen H., Miyada C.G., et al. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999; 37:242-5.
16. Van Belcum A. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7:174-84.
17. Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. ПЦР-генетическое типирование возбудителей бактериальных инфекций. *Генетика* 1995; 31:600-10.
18. Fujimoto S., Marshall B., Blaser M.J. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1994; 33:331-4.
19. Rubin L.G. Bacterial colonization and infection resulting from of a single organism. *Rev Infect Dis* 1987; 9:488-93.
20. Shortridge V.D., Stone G.G., Flamm R.K., et al. Molecular typing of *Helicobacter pylori* isolates from a multicenter U.S. clinical trial by ureC restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; 35:471-3.
21. Brow M., Oldenburg M.C., Lyamichev V. et al. Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and *Mycobacterium tuberculosis* katG genes by structure-specific endonuclease cleavage. *J Clin Microbiol* 1996; 34:3129-37.
22. Davidson F., Simmonds P., Ferguson J.C., et al. Survey of major genotypes and subgenotypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5 non-coding region. *J Gen Virol* 1995; 76:1197-204.
23. Versalovic J., Kapur V., Koeuth T., et al. DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced Repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:23-9.
24. Woods C.R., Versalovic J., Koeuth T., et al. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by Repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2921-9.
25. Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. ERIC sequences: a novel family of Repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991; 5:825-34.
26. Koeuth T., Versalovic J., Lupski J.R. Differential subsequence conservation of interspersed Repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* 1995; 5:408-18.
27. DelVecchio V.G., Petroziello J.M., Gress M.J., et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced Repetitive-sequence PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2141-4.
28. Arbeit R.D., Maslow J.N., Mulligan M.E. Polymerase chain reaction-mediated genotyping in microbial epidemiology. *Clin Infect Dis* 1994; 18:1018-9.
29. Caetano-Anolles G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technol* 1991; 9:553-7.
30. Olive D.M., P.Bean. Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1661-9.
31. Maddox L.O., Li P., Bennett A., et al. Comparison of SSCP analysis for mutation detection in the human iduronate 2-sulfatase gene. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43:1163-71.
32. Marshall D.J., Heisler L.M., Lyamichev V., et al. Determination of hepatitis C virus genotype in the United States by cleavage fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3156-62.
33. Sreevatsan S., Bookout J.B., Ringris F.M., et al. Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1895-901.
34. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18:426-39.
35. Arbeit R.D., Arthur M., Dunn R.D., et al. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis* 1990; 161:230-5.
36. Huebner J., Pier G.B., Maskow J.N., et al. Endemic nosocomial transmission of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia strains in a neonatal ICU over a 10-year period. *J Infect Dis* 1994; 169:526-31.
37. Maslow J.N., Brecher S., Adams K.S. et al. Relationship between indole production and the differentiation of *Klebsiella* species: indole-positive and negative isolates of *Klebsiella* determined to be clonal. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2000-3.
38. Barbier N., Saulnier P., Chachaty E., et al. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34:106-9.

39. Maslow J.N., Brecher S., Durbin A., et al. Diversity among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from patients with long-term colonization. Proceedings of Annual Meeting of American Infectious Disease Society, 1993; abstract 143.
40. Speaker M.G., Milch F.A., Shah M.K., et al. Role of external bacteriae flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. Ophthalmology 1991; 98:639-50.
41. Slutsky A.M., Arbeit R.D., Barber T.W., et al. *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS detected by pulsed field gel electrophoresis of sequential clinical isolates. J Clin Microbiol 1994; 32:1773-8.
42. Boukadida J., de Montalembert M., Lenoir G., et al. Molecular epidemiology of chronic pulmonary colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. J Med Microbiol 1993; 38:29-33.
43. Grundmann, Schneider H.C., Hartung D., et al. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1995; 33:528-34.
44. Kuhn I., Burman L., Haeggman S., et al. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. J Clin Microbiol 1995; 32:2812-7.
45. Maslow J.N., Mulligan M.E., Adams K.S., et al. Bacterial adhesins and host factors in the development and outcome of *Escherichia coli* bacteremia. Clin Infect Dis 1993; 17:89-97.
46. Stanley J., Baquar N., Threlfale E.J. Genotypes and phylogenetic relationships of *Salmonella typhimurium* are defined by molecular fingerprinting of IS200 and 16S *rrn* loci. J Clin Microbiol 1993; 139:1133-40.
47. Гинцбург А.Л., Шагинян И.А. Роль молекулярно-генетических технологий в повышении качества диагностики инфекционных заболеваний. В кн.: Материалы Всерос. конф. "Внутриутробные инфекции плода и новорожденного". Саратов; 2000. р. 47-9.
48. Patterson J.E., Wanger A., Zscheck K.K., et al. Molecular epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:302-5.