

УДК

Молекулярно-генетическое типирование штаммов *Legionella pneumophila* и *Legionella* spp., выделенных на территории Российской Федерации

О.Л. Воронина^{1,2}, М.С. Кунда¹, В.Г. Лунин¹, Т.И. Карпова¹, И.С. Тартаковский¹¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАМН, Москва, Россия

На основе международных стандартов молекулярно-генетического типирования легионелл (SBT и EQA протоколов Европейской рабочей группы по легионеллезу – EWGLI) охарактеризованы штаммы *Legionella pneumophila* и *Legionella species*, выделенные в Российской Федерации за последние годы при профилактическом мониторинге и во время эпидемической вспышки, а также представленные в коллекции НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (*Gamaleya Institute Collection of Legionellosis* – GICL). Установлено, что для 31 нового штамма из 3 регионов РФ характерно 19 аллельных профилей. Показано, что

наиболее часто среди отечественных штаммов встречаются профили 1, 4, 3, 1, 1, 1, 6 и 6, 10, 19, 28, 19, 4, 3. Идентифицировано 9 новых аллельных профилей, ранее не зарегистрированных в базе EWGLI. На основе EQA протокола секвенирования *mip*-гена установлена видовая принадлежность 3 новых штаммов *Legionella species*: 2 – *L. gratiana* и 1 – *L. gormanii*. Ранее идентифицированные виды не тестировались на территории РФ.

Ключевые слова: SBT и EQA протоколы EWGLI, легионеллез, *Legionella pneumophila*, *Legionella* spp., аллельный профиль штаммов.

Molecular typing of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. strains, isolated in the Russian Federation

O.L. Voronina^{1,2}, M.S. Kunda¹, V.G. Lunin¹, T.I. Karpova¹, I.S. Tartakovskiy¹¹ N.F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, RAMS, Moscow, Russia² A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Moscow, Russia

On the base of international standards of molecular-genetic typing (SBT protocol and EQA scheme using DNA sequencing of the *mip*-gene of the European Working Group for Legionella Infections – EWGLI) were described the strains of *Legionella pneumophila* and *Legionella species*, isolated in the Russian Federation during the last years at the monitoring and at the epidemic outbreak, and strains, presented in *Gamaleya Institute Collection of Legionellosis* (GICL). It was determined that 31 new strains from 3 Russian Federation's regions belonged to

19 allelic profiles. It was revealed, that profiles 1, 4, 3, 1, 1, 1, 6 и 6, 10, 19, 28, 19, 4, 3 were most abundant among the native strains. 9 new allelic profiles were identified, which were not earlier submitted in EWGLI base. On the base of EQA scheme using DNA sequencing of the *mip*-gene the species identification of three new *Legionella*'s strains were made: 2 - *L. gratiana* и 1 - *L. gormanii*. The identified strains were not tested in R F's territory earlier.

Key words: SBT and EQA protocols of EWGLI, legionellosis, *Legionella pneumophila*, *Legionella* spp., strains allelic profile.

Контактный адрес:
О.Л. Воронина

Введение

Немногим более 30 лет прошло со времени обнаружения возбудителя легионеллеза. За этот период произошло не только стремительное развитие биохимических, молекулярно-биологических методов и технической базы, необходимой для их автоматизации и сокращения времени анализа, но и наступило понимание важности совместных действий государств в мониторинге инфекций и локализации эпидемических вспышек. В 1986 г. для объединения усилий специалистов европейских стран в борьбе с легионеллезом была создана Европейская рабочая группа по легионеллезу (The European Working Group for Legionella Infections – EWGLI). Один из элементов EWGLI – EWGLINET – образован решением Европарламента в 1998 г. для надзора за вспышками легионеллеза во время путешествий (Travel Associated Legionnaires' Disease). Членами EWGLINET в настоящее время являются 24 страны Евросоюза. 11 стран сотрудничают с этой организацией, в том числе Россия, Канада, Австралия, США и др.

Для повышения эффективности контактов между странами необходимо было разработать схему типирования легионелл, хорошо воспроизводимую в разных лабораториях. Опробовав несколько методических подходов, описанных нами ранее [1], эксперты EWGLI остановили свой выбор на схеме, основанной на многолокусном генотипировании. В 2005 г. она включала секвенирование фрагментов 6 генов: *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA* [2]. При этом *flaA* ген кодирует флагеллин, *pilE* – пилин, *asd* – аспарат β-семиальдегид дегидрогеназу (ЕС 1.2.1.11), *mip* – белок, способствующий инфицированию макрофагов, *tompS* – большой белок наружной мембраны, *proA* – γ-глутамил-фосфатредуктазу – фермент, участвующий в синтезе пролина. В 2007 г. схема была дополнена анализом еще одной мишени – *neuA* гена, кодирующего цитидил-синтазу N-ацетилнейраминовой кислоты [3]. Все гены операционные и испытывают селективное давление.

В настоящее время методика оформлена в виде протокола (STB protocol) [4], создана база последовательностей фрагментов по каждому гену (SBT database, version 3.0). По версии создателей базы, каждая такая последовательность называется аллель. В базе данных представлены выявленные аллели (типы) для фрагментов 7 генов. Количество последовательностей в базе пополняется по мере обнаружения и проверки новых вариантов. Сравнение с базой данных позволяет записать аллельный профиль штамма, перечисляя в

установленном порядке (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA*, *neuA*) номер аллеля, с которым обнаружено 100% сходство для каждого из 7 генов. Если сходство не составляет 100%, то аллель считается не определенным и вместо его номера предварительно записывается «0». После анализа данных представителями EWGLI аллелю может быть присвоен новый номер.

Для оценки стабильности, воспроизводимости и доступности схемы для лабораторий, оснащенных оборудованием для секвенирования разных поколений, EWGLI регулярно проводит рассылку панелей штаммов легионелл в микробиологические лаборатории стран, сотрудничающих с EWGLINET. Как показал анализ результатов, 100% совпадение аллельного профиля с заранее определенным для штаммов наблюдается в лабораториях с большим опытом секвенирования и анализа последовательностей [5].

Важной характеристикой схемы типирования в микробиологии является коэффициент дискриминации *D*, введенный P.R. Hunter и M.A. Gaston и показывающий с какой вероятностью схема различает близкородственные штаммы. При значении *D* более 0,90 результаты типирования интерпретируются с достаточной долей достоверности [6]. Для протокола SBT (6 генов) значение *D* составляло 0,932 на панели для 79 штаммов. Введение дополнительной мишени, *neuA* гена, увеличило *D* до 0,963 [3].

Для типирования вида легионелл EWGLI утвердила схему EQA, основанную на амплификации и секвенировании относительно протяженного и достаточно вариабельного фрагмента *mip* гена.

Схемы EQA и STB были использованы нами в проведенном исследовании ранее зарегистрированных в коллекции НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (*Gamaleya Institute Collection of Legionellosis – GICL*) штаммов легионелл и новых штаммов, выделенных в 2005–2008 гг.

Материал и методы исследования

В исследование были включены коллекционные штаммы легионелл различных видов, штаммы *L. pneumophila* разных серогрупп из GICL, а также штаммы легионелл, выделенные в разных регионах РФ в 2005–2008 гг.

Образцы окружающей среды (воду и смывы биопленок) исследовали в соответствии с МУК 4.2.22-17-07 [7]. Выделение легионелл из клинического материала и из образцов окружающей среды проводили на среде ВМРА (Oxoid, Basingstoke, Великобритания).

Идентификацию колоний легионелл осуществ-

ляли с помощью набора для латекс-агглютинации «Dry Spot» (Oxoid, Basingstoke, Великобритания). Набор позволяет различать изоляты *L. pneumophila* серогруппы 1 (Sg 1), *L. pneumophila* Sg 2-14 и *Legionella* spp.

ДНК легионелл выделяли с использованием набора «DNA-Extra-Sorb» (лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных конструкций ВНИИ СБ РАСХН).

Аmplification и секвенирование фрагментов генов *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA*, *neu A* проводили согласно протоколу SBT (Sequence-Based Typing) EWGLI [4], используя следующие реактивы: Hot rescue DNA pol, ПЦР буфер 10x (лаб. молекулярной диагностики и генно-инженерных конструкций ВНИИ СБ РАСХН), dNTP 5 mM (Medigen), праймеры (ЗАО «Синтол»), набор реактивов для секвенирования к прибору 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi).

Аmplification и секвенирование протяженного фрагмента гена *mip* с целью идентификации вида легионелл выполняли по протоколу EWGLI (External Quality Assurance – EQA – scheme) [8].

После проведения ПЦР при наличии в пробе только основного продукта очистку и концентрирование проводили с помощью набора «DNA-Extra-Sorb». Для проб, содержащих минорные дополнительные продукты, применяли процедуру препаративного электрофореза в агарозном геле с последующим вырезанием фрагментов геля, элюцией ДНК и концентрированием. Пробы концентрировали до 10–20 нг/мкл.

Секвенирование фрагментов ДНК проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/

Hitachi).

Анализ последовательностей и выравнивание выполняли с помощью программы CLUSTAL W (1.83). Видовую идентификацию легионелл на основе последовательностей гена *mip* осуществляли с применением геномной и программной базы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы с целью отработки методики и систематизации коллекционного материала выборку штаммов легионелл различных видов проводили с применением EQA схемы. Коллекционная выборка включала 10 штаммов. Результаты идентификации представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, молекулярно-генетическое типирование на основе секвенирования фрагмента гена *mip* подтвердило видовую принадлежность выбранных коллекционных штаммов. Штаммы вида *L. longbeachae* (Long Beach-4 и Tucker-1) совпали по последовательности на 99%, высокое сходство показали последовательности штаммов *L. parisiensis* и *L. anisa* – 94%. Штаммы других видов отличались между собой и от штамма *L. pneumophila* на 14% и более, что согласуется с данными R.M. Ratcliff и соавт. [9], основоположников методической схемы.

На основе отработанной методики были типированы штаммы, выделенные из образцов окружающей среды в городе Верхняя Пышма. Как следует из данных табл. 1, штаммы Pyshma-7 и Pyshma-15 идентифицированы как *L. gratiana*, а штамм Pyshma-8 – как *L. gormanii*.

При анализе штаммов *L. pneumophila* по схеме EQA было идентифицировано 26 коллекционных

Таблица 1. Результаты идентификации видовой принадлежности штаммов легионелл

| № штамма в GICL | Видовая принадлежность штамма легионелл | Соответствие последовательности фрагмента гена <i>mip</i> в BLAST |
|-----------------|---|---|
| GICL 3001 | <i>L. longbeachae</i> Long Beach-4 | <i>L. longbeachae</i> isolate WA265-W AJ810226.1 |
| GICL 3002 | <i>L. longbeachae</i> Tucker-1 | <i>L. longbeachae</i> ATCC 33484 |
| GICL 3003 | <i>L. feeleii</i> WO-44C | <i>L. feeleii</i> U92205 |
| GICL 3004 | <i>L. oakridgensis</i> OR-10 | <i>L. oakridgensis</i> U92214 |
| GICL 3005 | <i>L. hackeliae</i> Lansing-2 | <i>L. hackeliae</i> U92207 |
| GICL 3006 | <i>L. parisiensis</i> PF-209C-C2 | <i>L. parisiensis</i> U92215 |
| GICL 3007 | <i>L. anisa</i> WA-316-C3 | <i>L. anisa</i> U91607 |
| GICL 3008 | <i>L. erythra</i> SE-32A-C8 | <i>L. erythra</i> U92203 |
| GICL 3009 | <i>L. micdadei</i> TATLOCK | <i>L. micdadei</i> AF023175.1 |
| GICL 3011 | <i>L. dumoffii</i> NY-23 | <i>L. dumoffii</i> AF022313 |
| GICL 3013 | <i>Legionella</i> spp. Pyshma-7 | <i>L. gratiana</i> U92206 |
| GICL 3014 | <i>Legionella</i> spp. Pyshma-8 | <i>L. gormanii</i> str. IMVS-LC0777C AF047748.1 |
| GICL 3016 | <i>Legionella</i> spp. Pyshma-15 | <i>L. gratiana</i> U92206 |

штаммов и 31 штамм, изолированный из образцов, взятых в нескольких регионах РФ в 2005-2008 гг. Все штаммы были типированы как *L. pneumophila* со степенью сходства последовательностей фрагмента гена *mip* 95-100%.

На следующем этапе работы для более подробного типирования штаммов *L. pneumophila* мы применили протокол SBT, первоначально протестировав 26 коллекционных штаммов, отнесенных к разным серогруппам (Sg). В выборке было 19 представителей Sg 1, 2 – Sg 4 и по одному от Sg 3, 5, 6, 7 и 8. Следует отметить, что ранее этот подход в основном применялся для типирования штаммов *L. pneumophila* Sg 1. Однако в работах V. Gaia и соавт. описано типирование штаммов *L. pneumophila* Sg 6, 8, и 10 [2]. В последней публикации P.C. Lück и соавт. продемонстрировано применение протокола SBT для типирования штаммов *L. pneumophila* Sg 4, 5, 8 и 10 [10], штаммы *L. pneumophila* Sg 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13 охарактеризованы M. Coscollá и F. González-Candelas [11]. Таким образом, штамм серогруппы 7 (GICL 6. Chicago 8) типирован нами впервые.

Результаты определения аллельного профиля штаммов представлены в табл. 2. В последнюю колонку таблицы внесены данные номера аллельного профиля, так называемого ST (*sequence type*). Номер ST присваивается аллельному профилю по решению EWGLI после регистрации профиля в базе данных. Как следует из табл. 2, штаммы Flint и Albuquerque относятся к ST 1, наиболее часто встречающемуся профилю среди европейских штаммов легионелл. Так, из 105 клинических изолятов, полученных из разных городов Германии, 20 изолятов J. Borhardt и соавт. отнесли к ST 1 [12]. Из 31 изолята, выделенного в неблагополучной по легионеллезу провинции Аликанте (Испания) из окружающей среды, 10 относятся к ST 1 [11]. Следует отметить, что ST 1 наиболее часто встречается и среди японских изолятов *L. pneumophila*. J. Amezuga-Маекава и соавт. тестировали его у 12 из 31 изолята. Заметим, что 10 из 12 изолятов с ST 1 были выделены из градирен, а 2 относятся к клиническим изолятам [13].

Больше всего в коллекции оказалось штаммов с ST 36. Этот аллельный профиль также характерен для европейских клинических изолятов легионелл [12]. Только по одной позиции (*pro A*) от ST 36 отличен профиль штаммов Philadelphia-1. Аллельный профиль этого штамма приведен в статье V. Gaia и соавт. как типичный для серогруппы 1 [2].

Еще 4 коллекционных штамма (Knoxvill-1, Bellingham-1, 5-2 и Cambridge-2) могут быть отнесены к установленным EWGLI ST58, 62, 61 и 80 соот-

ветственно, т.е. такие аллельные профили встречаются часто среди европейских изолятов.

Обращают на себя внимание штаммы Draginovo-1, Draginovo-2 и Bolgar, имеющие одинаковый аллельный профиль. Штаммы выделены из окружающей среды в разных районах Болгарии. Их аллельный профиль уникален и не имеет аналогов в базе EWGLI.

Следует отметить, что штаммы серогруппы 8 Concord-3 и серогруппы 6 Chicago-2 совпали по аллельным профилям со штаммами соответствующих серогрупп, приведенными в работе V. Gaia и соавт. [2].

Таким образом, выборка коллекции легионелл представлена видами, различающимися по вирулентности, и штаммами *L. pneumophila* различных серогрупп, имеющими как типичные европейские, так и уникальные аллельные профили.

С 2005 г. по начало 2008 г. коллекция пополнялась штаммами из 3 регионов России: Московской области, Ханты-мансийского автономного округа и Свердловской области. На следующем этапе работы мы протестировали новые штаммы по протоколам EQA и SBT.

По данным, полученным в рамках протокола EQA, штаммы *L. pneumophila* разделились на 6 подгрупп. Как показали дальнейшие исследования аллельных профилей, подгруппы соответствуют номеру аллеля *mip* гена (табл. 3). Как видно из табл. 3, наиболее представительна подгруппа аллеля 28, включающая 13 штаммов, 11 из которых выделены из источников с интенсивным протоком воды.

Следующая по численности подгруппа аллеля 3 содержит 7 штаммов, 2 из которых (Pyshma-9 и Pyshma-17) идентичны по аллельному профилю, 2 (Pyshma-3 и TOTAL-1) различаются между собой только по одной позиции, а еще 2 (Pyshma-10 и Pyshma-14) сходны по 5 из 7 аллелей.

В подгруппе аллеля 1 пять из шести штаммов идентичны, а шестой, Pyshma-5, имеет отличия по двум аллелям, т.е. это подгруппа очень сходных штаммов.

Подгруппа аллеля 10 представлена двумя идентичными штаммами (Pyshma-12 и Pyshma-27) и одним отличным, Pyshma-1, являющимся клиническим изолятом. И, наконец, подгруппы аллеля 8 и нового аллеля включают по одному штамму.

Анализ полных аллельных профилей исследованных штаммов представлен в табл. 4. Штаммы зарегистрированы как в GICL, так и в коллекции EWGLI (EUL), номера регистрации отражены в графах табл. 4. Как следует из табл. 4, среди штаммов, выделенных из окружающей среды, наиболее часто встречается аллельный профиль 1, 4, 3, 1, 1, 1,

Таблица 2. Результаты идентификации аллельного типа коллекционных штаммов *Legionella pneumophila*

| № | № штамма в GICL | Штамм | Аллельный профиль | | | | | | | | |
|----|-----------------|----------------------------|-------------------|-------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|----|----|
| | | | <i>flaA</i> | <i>pilE</i> | <i>asd</i> | <i>mip</i> | <i>mompS</i> | <i>proA</i> | <i>neuA</i> | Sg | ST |
| 1 | GICL 18 | Flint | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | GICL 19 | Albuquerque | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | GICL 12 | Vibr. | 6 | 4 | 3 | 28 | 1 | 1 | 6 | 1 | – |
| 4 | GICL 13 | Knoxvill-1 | 7 | 10 | 17 | 10 | 5 | 4 | 13 | 1 | 58 |
| 5 | GICL 21 | I-H | 6 | 10 | 15 | 3 | 9 | 14 | 6 | 1 | – |
| 6 | GICL 16 | 82A3105 | 6 | 10 | 5 | 3 | 9 | 1 | 6 | 1 | – |
| 7 | GICL 1 | Philadelphia-1, ATCC 33152 | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 4 | 1 | 1 | – |
| 8 | GICL 2 | Philadelphia 2 | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 9 | 1 | 1 | 36 |
| 9 | GICL 20 | 194-H | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 9 | 1 | 1 | 36 |
| 10 | GICL 11 | Togus-1 | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 9 | 1 | 1 | 36 |
| 11 | GICL 22 | 1M | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 9 | 1 | 1 | 36 |
| 12 | GICL 23 | 2M | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 9 | 1 | 1 | 36 |
| 13 | GICL 24 | 3M | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 9 | 1 | 1 | 36 |
| 14 | GICL 25 | 4M | 3 | 4 | 1 | 1 | 14 | 9 | 1 | 1 | 36 |
| 15 | GICL 26 | 5-2 | 8 | 10 | 3 | 15 | 18 | 1 | 6 | 1 | 62 |
| 16 | GICL 3 | Bellingham-1 | 7 | 6 | 17 | 3 | 24 | 11 | 11 | 1 | 61 |
| 17 | GICL 9 | Draginovo-1 | 4 | 8 | 11 | 23 | 40 | 12 | 2 | 1 | – |
| 18 | GICL 10 | Draginovo-2 | 4 | 8 | 11 | 23 | 40 | 12 | 2 | 1 | – |
| 19 | GICL 17 | Bolgar | 4 | 8 | 11 | 23 | 40 | 12 | 2 | 1 | – |
| 20 | GICL 7 | Bloomington-2 | 7 | 6 | 17 | 20 | 13 | 11 | 3 | 3 | – |
| 21 | GICL 14 | Los-Angeles-1 | 11 | 14 | 16 | 25 | 7 | 13 | 6 | 4 | – |
| 22 | GICL 4 | Portland-1 | 3 | 13 | 1 | 17 | 14 | 9 | 7 | 4 | – |
| 23 | GICL 8 | Cambrige-2 | 7 | 6 | 3 | 8 | 13 | 11 | 3 | 5 | 80 |
| 24 | GICL 5 | Chicago-2 | 3 | 10 | 1 | 3 | 14 | 9 | 9 | 6 | – |
| 25 | GICL 6 | Chicago 8 | 2 | 6 | 17 | 14 | 12 | 8 | 6 | 7 | – |
| 26 | GICL 15 | Concord-3 | 8 | 1 | 22 | 30 | 6 | 10 | 6 | 8 | – |

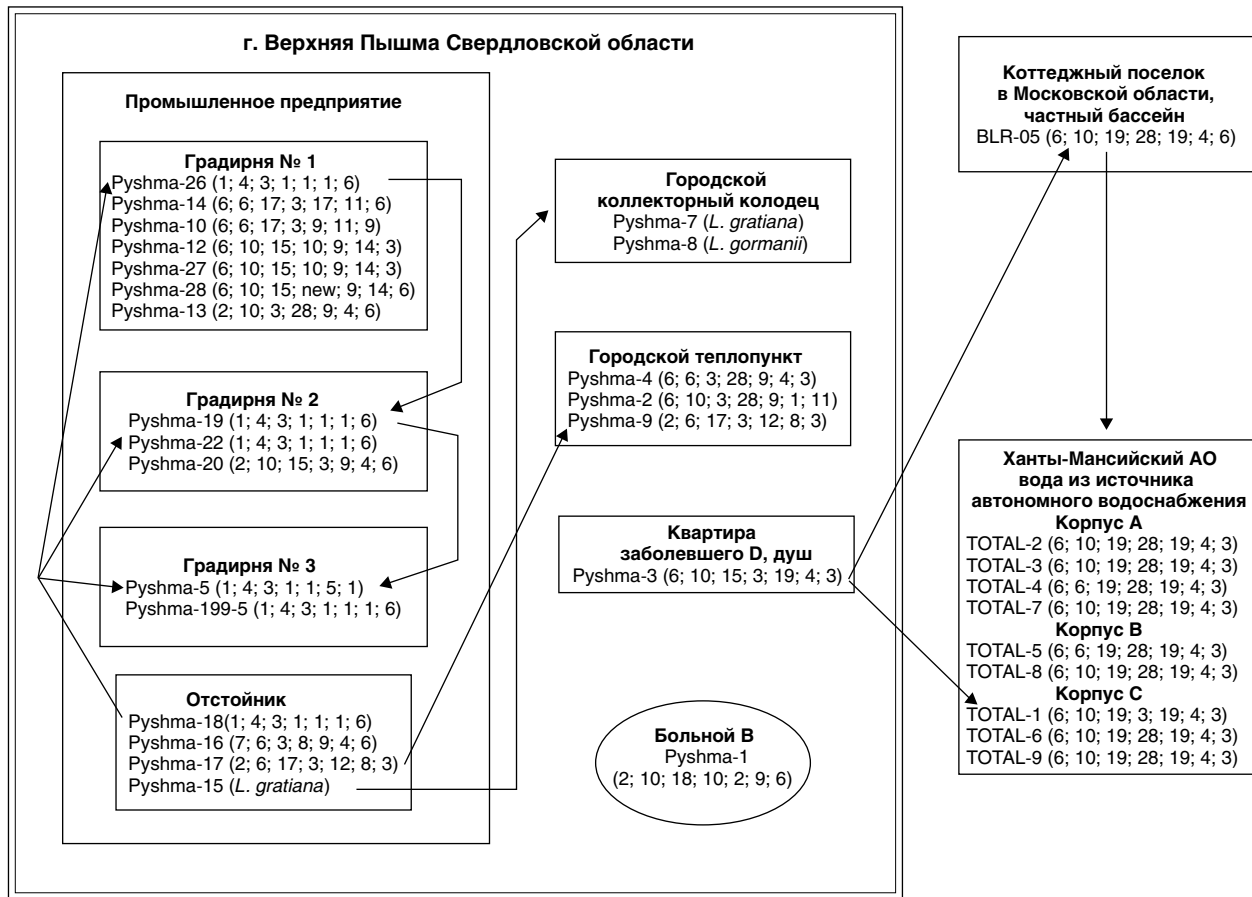
6, (ST 7), характерный и для европейских штаммов, например, для штамма Hanover 1 [12]. Сходный с ним аллельный профиль штамма Pyshma-5, ST 320, определен и у европейского изолята München 5 [12].

Следующая подгруппа идентичных штаммов (TOTAL-2, TOTAL-3, TOTAL-6, TOTAL-7, TOTAL-8, TOTAL-9) имеет аллельный профиль, часто встречающийся в базе данных EWGLI. Ему присвоен ST 292. Близкий профиль у штамма BLR-05. Он имеет ST 191.

Полные аналоги в базе EWGLI найдены нами для штаммов Pyshma-3 и Pyshma-13. Штамм, аналогичный по аллельному профилю Pyshma-13, был обнаружен P.C. Lück и соавт. в воде госпиталя и отнесен к Sg 10 [10]. Такой же профиль, установленный для штамма Sg 10, приводят в своей работе V. Gaia и соавт. [2].

Аналогов, различающихся по одной позиции, имеют в базе EWGLI клинический штамм Pyshma-1, штаммы из окружающей среды Pyshma-2, Pyshma-12, TOTAL-1. Штамм, сходный с TOTAL-1 по 6 позициям аллельного профиля (301BP: 6, 10, 19, 3, 19, 4) был идентифицирован японскими исследователями. J. Amemura-Маекава и соавт. выделили его как из воды бассейна, так и у пациента, посетившего этот бассейн и заболевшего легионеллезом [13].

Штаммы Pyshma-20, Pyshma-4, Pyshma-10, Pyshma-16, Pyshma-9, Pyshma-17, Pyshma-14, TOTAL-4 и TOTAL-5 уникальны по аллельному профилю, так как не имели аналогов в базе данных EWGLI. После регистрации аллельных профилей штаммов в базе данных им присвоены номера ST, указанные в табл. 4.



Распределение штаммов *L. pneumophila* различных аллельных профилей и *Legionella* spp по районам города Верхняя Пышма и регионам РФ.

Стрелки соединяют сходные по аллельному профилю штаммы из разных источников.

Распределение штаммов определенных аллельных профилей по тестированным территориям представлено на рисунке. Задействованные в мониторинге территории отличались по объему обследованных популяций легионелл. Однако, как видно из рисунка, во всех популяциях, достаточно удаленных друг от друга, наблюдаются штаммы со сходными аллельными профилями TOTAL-BLR на объектах с интенсивным протоком воды (бассейн, душ, автономная система водоснабжения). Таким образом, можно констатировать, что в 3 регионах страны на подобных объектах циркулируют близкие по аллельному профилю штаммы *L. pneumophila*. Поскольку штамм со сходным аллельным профилем был выделен J. Ametuga-Маекава и соавт. также из воды бассейна [13], то возможно, что штаммы с такими характеристиками колонизируют систему водоснабжения с определенной скоростью протока.

Популяция, обследованная более подробно, является городом-сателлитом Екатеринбурга. Здесь

на относительно небольшой территории наблюдается исключительная гетерогенность штаммов легионелл. Мы выделили как штаммы нескольких видов (отстойник, городской коллекторный колодец), так и штаммы *L. pneumophila* разных серогрупп, представляющие 14 аллельных профилей.

Наибольшим разнообразием штаммов отличались градирни промышленного предприятия. Из литературы известно, что объекты, на которых происходит испарение и конденсация воды в больших объемах, являются «настоящими инкубаторами» легионелл [14, 15]. Санитарный контроль над ними должен проводиться регулярно. St. Engelhart и соавт. отмечают, что при оценке эпидемической ситуации на конкретном объекте, имеющем градирни, следует обратить особое внимание на анализ аллельных профилей штаммов, выделенных из градирен [16].

Обращает на себя внимание идентичность аллельных профилей ряда штаммов, колонизирующих объекты промышленного предприятия и

Таблица 3. Распределение штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных в 2005–2008 гг., по подгруппам в соответствии с аллелем *mip* гена

| Тип | Аллель <i>mip</i> | Штаммы |
|-----------------------------------|-------------------|--|
| Philadelphia-1 | 1 | Pyshma-5 (1; 4; 3; 1; 1; 5; 1) |
| | | Pyshma-199-5 (1; 4; 3; 1; 1; 1; 6) |
| | | Pyshma-18 (1; 4; 3; 1; 1; 1; 6) |
| | | Pyshma-19 (1; 4; 3; 1; 1; 1; 6) |
| | | Pyshma-22 (1; 4; 3; 1; 1; 1; 6) |
| | | Pyshma-26 (1; 4; 3; 1; 1; 1; 6) |
| ATCC 33215 | 3 | Pyshma-3 (6; 10; 15; 3; 19; 4; 3) |
| | | Pyshma-9 (2; 6; 17; 3; 12; 8; 3) |
| | | Pyshma-10 (6; 6; 17; 3; 9; 11; 9) |
| | | Pyshma-14 (6; 6; 17; 3; 17; 11; 6) |
| | | Pyshma-17 (2; 6; 17; 3; 12; 8; 3) |
| | | Pyshma-20 (2; 10; 15; 3; 9; 4; 6) |
| | | TOTAL-1 (6; 10; 19; 3; 19; 4; 3) |
| CDC F1053 | 8 | Pyshma-16 (7; 6; 3; 8; 9; 4; 6) |
| ATCC 43703 | 10 | Pyshma-1 (2; 10; 18; 10; 2; 9; 6) |
| | | Pyshma-12 (6; 10; 15; 10; 9; 14; 3) Pyshma-27 (6; 10; 15; 10; 9; 14; 3) |
| Corby | 28 | Pyshma-2 (6; 10; 3; 28; 9; 1; 11) |
| | | Pyshma-4 (6; 6; 3; 28; 9; 4; 3) |
| | | Pyshma-13 (2; 10; 3; 28; 9; 4; 6) |
| | | Pyshma-24 (12; 12; new; 28; 17; new; -) |
| | | BLR-05 (6; 10; 19; 28; 19; 4; 6) |
| | | TOTAL-2 (6; 10; 19; 28; 19; 4; 3) |
| | | TOTAL-3 (6; 10; 19; 28; 19; 4; 3) |
| | | TOTAL-4 (6; 6; 19; 28; 19; 4; 3) |
| | | TOTAL-5 (6; 6; 19; 28; 19; 4; 3) |
| | | TOTAL-6 (6; 10; 19; 28; 19; 4; 3) |
| TOTAL-7 (6; 10; 19; 28; 19; 4; 3) | | |
| TOTAL-8 (6; 10; 19; 28; 19; 4; 3) | | |
| TOTAL-9 (6; 10; 19; 28; 19; 4; 3) | | |
| Corby 99% | New | Pyshma-28 (6; 10; 15; new; 9; 14; 6) |

системы городского водоснабжения (соответствия показаны стрелками на рисунке).

Во время вспышки легионеллеза в городе Верхняя Пышма был выделен только один клинический штамм. Как видно из рисунка, его аллельный профиль отличен от профилей всех тестированных штаммов. Для заключения об источнике заболевания нам не достает информации о состоянии воды в системе водоснабжения квартиры заболевшего легионеллезом больного В.

Таким образом, мы исследовали 31 новый штамм *L. pneumophila*, 30 из которых были выделены из окружающей среды и один – от больного. Они представляют 19 аллельных профилей. На территории трех объектов РФ наиболее часто встречаются профили 1, 4, 3, 1, 1, 1, 6 и 6, 10, 19, 28, 19, 4, 3.

Подытоживая проведенное исследование, мы оценили коэффициент дискриминации для схемы SBT (7 генов) на нашей выборке, включавшей 57 штаммов. Он составил 0,967, что еще раз подчеркивает большие диагностические возможности протокола EWGLI.

Результат введения дополнительного аллеля *neu A* мы можем продемонстрировать и более наглядно на наших данных. Одной из причин введения дополнительной мишени была гетерогенность группы штаммов, отнесенной к ST 1, который ранее записывался как 1, 4, 3, 1, 1, 1. Действительно, даже в GICL есть штаммы Pyshma-199-5, Pyshma-18, Pyshma-19, Pyshma-22, Pyshma-26 с аллельным профилем 1, 4, 3, 1, 1, 1, 6 и штаммы Flint и Albuquerque с профилем 1, 4, 3, 1, 1, 1, 1. Без седьмой мишени мы бы не смогли их различить.

Увеличение коэффициента *D* возможно при сочетании в анализе бактерий нескольких схем типирования. Например, S. Ratzow и соавт. подчеркивали, что при использовании совместно с протоколом SBT (7 генов) моноклональных антител, различающих подгруппы *L. pneumophila* серогруппы 1, значение *D* возрастало до 0,98 [3].

Известно, что моноклональные антитела, идентифицирующие подгруппы Sg 1, получают на О-полисахариде [17]. Следовательно, антитела дополняют схему SBT (7 генов) продуктом еще одного – восьмого гена, кодирующего липополисахарид легионелл. Поэтому возможны несоответствия между аллельным профилем и серогруппой или подгруппой Sg 1, определенными для штаммов. M. Coscollá и соавт. называют это несоответствие неконгруэнтностью, приводя пример, когда близкие по аллельному профилю штаммы относятся к разным серогруппам и наоборот [18]. В нашем исследовании также наблюдались штаммы с одинаковым аллельным профилем, но принадлежащие к разным серогруппам: Pyshma-9 (Sg 1) и Pyshma-17 (Sg 2-14). St. Engelhart и соавт. констатируют отнесение к разным подгруппам по моноклональному типу изолятов очень близких аллельных профилей: mab-type Knoxville (1, 4, 3, 1, 1, 1, 1) и mab-type Oxford (1, 4, 3, 25, 1, 1, 11) [16]. Одним из объяснений этого несоответствия является рекомбинация между геномами легионелл разных серогрупп и даже разных видов [11].

Отмеченные сложности не умаляют возможно-

Таблица 4. Результаты молекулярно-генетического типирования штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных в 2005–2008 гг.

| № п/п | № штамма в GICL | № штамма в EUL | Штамм | Аллельный профиль | | | | | | | | |
|-------|-----------------|----------------|--------------|-------------------|-------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|------|-----|
| | | | | <i>flaA</i> | <i>pilE</i> | <i>asd</i> | <i>mip</i> | <i>mompS</i> | <i>proA</i> | <i>neuA</i> | Sg | ST |
| 1 | GICL 37 | EULVO971 | Pyshma-5 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 5 | 1 | 1 | 320 |
| 2 | GICL 39 | EULVO973 | Pyshma-199-5 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 7 |
| 3 | GICL 46 | EULVO998 | Pyshma-18 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 7 |
| 4 | GICL 47 | EULVO985 | Pyshma-19 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 7 |
| 5 | GICL 49 | EULVO987 | Pyshma-22 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 7 |
| 6 | GICL 51 | EULVO990 | Pyshma-26 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1 | 7 |
| 7 | GICL 33 | EULVO968 | Pyshma-1 | 2 | 10 | 18 | 10 | 2 | 9 | 6 | 1 | 308 |
| 8 | GICL 48 | EULVO986 | Pyshma-20 | 2 | 10 | 15 | 3 | 9 | 4 | 6 | 2–14 | 326 |
| 9 | GICL 36 | EULVO970 | Pyshma-4 | 6 | 6 | 3 | 28 | 9 | 4 | 3 | 3 | 319 |
| 10 | GICL 40 | EULVO981 | Pyshma-10 | 6 | 6 | 17 | 3 | 9 | 11 | 9 | 2–14 | 323 |
| 11 | GICL 34 | EULVO969 | Pyshma-2 | 6 | 10 | 3 | 28 | 9 | 1 | 11 | 1 | 310 |
| 12 | GICL 41 | EULVO982 | Pyshma-12 | 6 | 10 | 15 | 10 | 9 | 14 | 3 | 1 | 324 |
| 13 | GICL 52 | EULVO991 | Pyshma-27 | 6 | 10 | 15 | 10 | 9 | 14 | 3 | 1 | 324 |
| 14 | GICL 53 | – | Pyshma-28 | 6 | 10 | 15 | new | 9 | 14 | 6 | 2–14 | – |
| 15 | GICL 44 | EULVO983 | Pyshma-16 | 7 | 6 | 3 | 8 | 9 | 4 | 6 | 1 | 325 |
| 16 | GICL 38 | EULVO972 | Pyshma-9 | 2 | 6 | 17 | 3 | 12 | 8 | 3 | 1 | 321 |
| 17 | GICL 45 | EULVO984 | Pyshma-17 | 2 | 6 | 17 | 3 | 12 | 8 | 3 | 2–14 | 321 |
| 18 | GICL 43 | EULVO989 | Pyshma-14 | 6 | 6 | 17 | 3 | 17 | 11 | 6 | 1 | 327 |
| 19 | GICL 35 | EULVO997 | Pyshma-3 | 6 | 10 | 15 | 3 | 19 | 4 | 3 | 3 | 147 |
| 20 | GICL 26 | EULVO980 | BLR-05 | 6 | 10 | 19 | 28 | 19 | 4 | 6 | 2–14 | 191 |
| 21 | GICL 27 | EULVO979 | TOTAL-1 | 6 | 10 | 19 | 3 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 322 |
| 22 | GICL 28 | EULVO978 | TOTAL-2 | 6 | 10 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 292 |
| 23 | GICL 29 | EULVO977 | TOTAL-3 | 6 | 10 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 292 |
| 24 | GICL 32 | EULVO976 | TOTAL-6 | 6 | 10 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 292 |
| 25 | GICL 30 | EULVO993 | TOTAL-4 | 6 | 6 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 329 |
| 26 | GICL 31 | EULVO999 | TOTAL-5 | 6 | 6 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 329 |
| 27 | GICL 54 | EULVO994 | TOTAL-7 | 6 | 10 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 292 |
| 28 | GICL 55 | EULV1000 | TOTAL-8 | 6 | 10 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 292 |
| 29 | GICL 56 | EULVO996 | TOTAL-9 | 6 | 10 | 19 | 28 | 19 | 4 | 3 | 2–14 | 292 |
| 30 | GICL 42 | EULVO988 | Pyshma-13 | 2 | 10 | 3 | 28 | 9 | 4 | 6 | 2–14 | 17 |
| 31 | GICL 50 | – | Pyshma-24 | 12 | 12 | New | 28 | 17 | New | – | 1 | – |

сти использования схем SBT и EQA в таксономии легионелл и эпидемиологии легионеллеза.

Заключение

Международные стандарты молекулярно-генетического типирования легионелл, разработанные EWGLI, широко используются различными группами исследователей для характеристики как клинических штаммов легионелл, так и штаммов, выделенных из окружающей среды [5, 10, 11, 13]. Типирование с применением SBT-протокола стало обязательным инструментом эпидемиологическо-

го исследования при вспышках легионеллезной инфекции. В Российской Федерации данный методический подход был впервые применен при исследовании крупной эпидемической вспышки пневмоний легионеллезной этиологии в городе Верхняя Пышма Свердловской области [1, 19].

В нашей работе диагностика на основе секвенирования была использована для характеристики более широкого спектра штаммов легионелл из 3 регионов Российской Федерации. Идентифицированы штаммы видов легионелл, ранее не выявлявшихся на территории РФ: *L. gra-*

tiana и *L. gormanii*. Показана высокая дискриминирующая способность SBT-протокола, позволившая различить 19 аллельных профилей у 31 штамма *L. pneumophila*, выделенного на территории России. Наибольшую гетерогенность популяции легионелл по аллельному профилю мы отметили в эпидемическом очаге инфекции. Вместе с тем, штаммы со сходными аллельными профилями (ST 147, 191, 292, 322, 329) были зафиксированы в регионах

страны, удаленных друг от друга. Ряд выделенных штаммов легионелл характеризует уникальный аллельный профиль, не имевший ранее аналогов в базе данных EWGLI. Проведенные исследования подтвердили перспективность использования SBT протокола и EQA схемы секвенирования *mip*-гена для характеристики и идентификации штаммов легионелл, циркулирующих на территории Российской Федерации.

Литература

1. Воронина О.Л., Лунин В.Г. Молекулярно-генетическое типирование *Legionella pneumophila* серогруппы 1, выделенных в г. Верхняя Пышма, с использованием международных стандартов. ЖМЭИ. 2008, (2):в печати.
2. Gaia V., Fry N. K., Afshar B., et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 2005; 43:2047-52.
3. Ratzow S., Gaia V., Helbig J.H., Fry N. Lück P.C. Addition of neu A, the gene encoding N-acylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol 2007; 45:1965-8.
4. European Working Group for *Legionella* Infections Sequence-Based Typing (SBT) protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* Version 3.0, October 2007.
5. Afshar B., Fry N.K., Bellamy W., et al. External quality assessment of a DNA sequence-based scheme for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* by an international network of laboratories. J Clin Microbiol 2007; 45:3251-6.
6. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26:2465-6.
7. Методические указания по выявлению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды. МУК 4.2.22-17-07. 2007.
8. Fry N.K., Afshur B., Bellamy W., et al. Identification of *Legionella* spp. By 19 European reference laboratories: result of the European Working Group for Legionella Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools. Clin Microbiol Infect 2007; 13:1119-24.
9. Ratcliff R.M., Lanser J.A., Manning P.A., Heuzenroeder M.W. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. J Clin Microbiol 1998; 36:1560-7.
10. Lück P.C., Schneider T., Wagner J., et al. Community-acquired Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10 linked to the private home. J Med Microbiol 2008; 57:240-3.
11. Coscollá M., González-Candelas F. Population structure and recombination in environmental isolates of *Legionella pneumophila*. Environmental Microbiol 2007; 9:643-56.
12. Borhardt J., Helbig J.H., Lück P.C. Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27:29-36.
13. Amemura-Maekawa J., Kura F., Chang B., Watanabe H. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. Microbiol Immunol 2005; 49:1027-33.
14. Müller R.D., Kenepf K.A Risk assesment for Legionnaires'disease based on routine surveillance of cooling tower for Legionellae. In: Barbaree J.M., Breiman R.F., Dufour A.P. (Eds) Legionella: Current status and emerging perspectives. American Society for Microbiology. Washington, DC, 1993, 40-3.
15. Müller R.D., Kenepf K.A Legionella in cooling towers: use of Legionella-total bacterial ratios. In: Muilenberg M. B. H. (Eds) Aerobiology. CRC Press, Boca Raton, FL. 1996, 99-107.
16. Engelhart St., Pleischl St., Lück P.C., et al. Hospital-acquired legionellosis originating from a cooling tower during a period of thermal inversion. Int J Hyg Environ Health 2007, Sep 14: in press.
17. Method for detection of *Legionella* bacteria employing purified antigen-specific antibodies. European Patent EP1107773.
18. Coscollá M., Gosalbers M.J., Catalán V., González-Candelas F. Genetic variability in environmental isolates of *Legionella pneumophila* from Comunidad Valenciana (Spain). Environ Microbiol 2006; 8:1056-63.
19. Тартаковский И.С., Гинцбург А.Л., Михайлова Д.О., и соавт. Применение стандартов лабораторной диагностики легионеллеза во время эпидемической вспышки пневмонии в городе Верхняя Пышма Свердловской области. Клин микробиол антимикроб химиотер 2007; 9(4):361-8.