

УДК 577.29

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ — ИНФОРМАТИВНЫЙ ПОДХОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭКОЛОГИИ

О.Л. Воронина, М.С. Кунда, В.Г. Лунин, А.Л. Гинцбург

(НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН; e-mail: kirolg3@newmail.ru)

Применение мультилокусного секвенирования в исследовании штаммов *Legionella pneumophyla*, выделенных на территории России, позволило получить данные для молекулярно-экологического анализа сложившейся обстановки. Штаммы грунтовых вод показали сходные аллельные профили в разных удаленных регионах страны. Мутационные процессы в условиях градиен и в областях застоя воды автономной системы водоснабжения имели сходную направленность. При формировании клональных комплексов преобладал механизм рекомбинации. На основе сравнения аллельных профилей штаммов с базой данных EWGLI дана эпидемиологическая оценка изученных штаммов.

Ключевые слова: мультилокусное секвенирование (MLST), аллельный профиль, клональный комплекс, изменение единичного локуса (SLV).

Мультилокусное секвенирование (Multi Locus Sequence Typing, MLST) — удобный инструмент молекулярной экологии, позволяющий различать штаммы одного вида микроорганизмов. Развитие подхода началось в 1998 г. с работ М.С.Ј. Maiden и соавт. [1]. В настоящее время он используется более чем для 25 групп микроорганизмов.

Контроль легионеллезной инфекции предполагает анализ состояния воды в централизованных и автономных системах водоснабжения, системах конденсации воды (градирнях). Для эффективного контроля на базе Европейской рабочей группы по легионеллезу (The European Working Group for Legionella Infections, EWGLI) разработана схема MLST штаммов *L. pneumophyla* [2]. Эту схему используют в анализе лаборатории 34 стран, в том числе и России. Апробирование методики большим количеством исследователей позволяет вовремя исправлять недостатки и вносить коррективы. Например, в 2007 г. схема была дополнена седьмой мишенью для секвенирования с целью увеличения ее дифференцирующей способности [3]. Централизованный контроль результатов позволяет вводить проверенные новые аллели и аллельные профили. Информация об эпидемической значимости штаммов, доступ к которой получают зарегистрированные пользователи, занимающиеся анализом штаммов *L. pneumophyla*, помогает в оценке штаммов, обнаруженных на контролируемом объекте.

В России схему MLST стали применять с 2007 г., прежде всего при расследовании вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма Свердловской области [4, 5]. В дальнейшем при мониторинге объектов в этом городе и в других регионах России нами было проанализировано 133 штамма. Данные, полученные в результате мультилокусного секвениро-

вания, легли в основу аналитической работы по молекулярной экологии, представляемой в настоящей публикации.

Материалы и методы

ДНК легионелл выделяли с использованием набора “DNA-Extra-Sorb” (лаб. молекулярной диагностики и геноинженерных конструкций ВНИИ СБ РАСХН). Амплификацию и секвенирование протяженного фрагмента гена *mip* с целью идентификации вида легионелл выполняли по протоколу EWGLI (External Quality Assurance (EQA) scheme), основанному на методике R.M. Ratcliff с сотр. [6]. Амплификацию и секвенирование фрагментов генов *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA*, *neuA* для определения аллельного профиля штаммов *L. pneumophyla* проводили согласно протоколу SBT EWGLI [2], как описано ранее [7], с использованием прибора 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 программного средства BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) и базы данных EWGLI [2]. Для построения дерева сходства штаммов *L. pneumophila* на основе аллельных профилей использовали алгоритм UPGMA из пакета PHYLIP ver. 3.68 для визуализации результатов анализа — программу Phylodendron ver. 0.8d, beta [8].

Результаты и обсуждение

133 штамма *L. pneumophyla*, проанализированные с помощью MLST, были зарегистрированы в

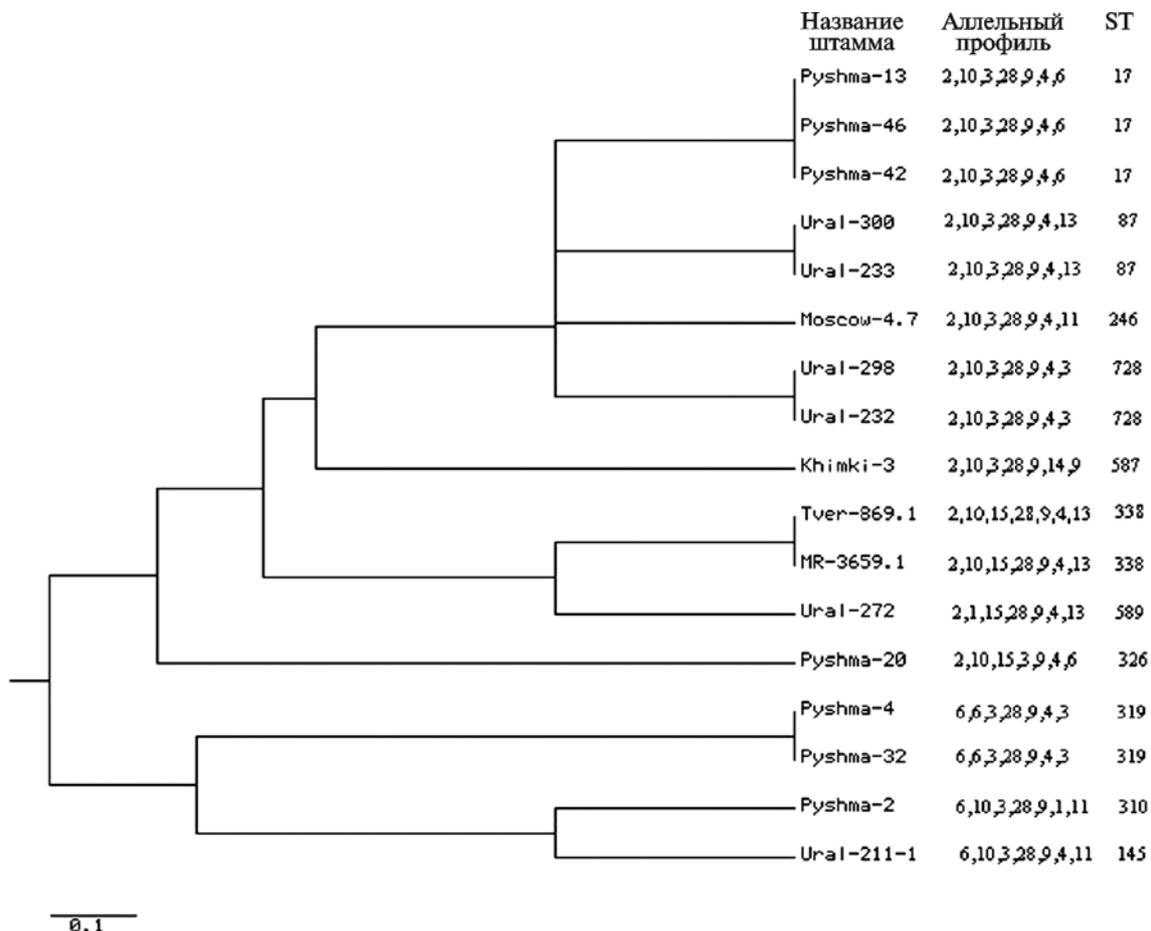
базе данных EWGLI (EULV 0968—0973, 0976—0994, 0996—1000, 1914—1948, 2003, 2004, 2009, 2047, 2048, 2586, 2683—2707, 2741—2743, 2993, 2995, 2996, 2998, 2999, 3001, 3003, 3004—3019, 3021, 3023, 3056, 3290—3298) [2] и отнесены к 51 типу последовательностей (sequence type, ST). 16 штаммов из грунтовых вод принадлежало к ST 292, 14 штаммов градирен — к ST 324.

Следует отметить, что штаммы, выделенные из воды систем водоснабжения в различных, в том числе отдаленных, регионах России (Московской, Тверской, Свердловской областях, Ханты-Мансийском автономном округе, ХМАО), имели идентичные или аналогичные аллельные профили. Например, штаммы с ST 114 и 191 были обнаружены как в Московской обл., так и в Свердловской, а штаммы с ST 338 — в Московской и Тверской. Штаммы с ST 292 системы автономного водоснабжения ХМАО только по одному локусу аллельного профиля отличались от штаммов с ST 191 Московского региона и Свердловской обл.

Мониторинг градирен г. Верхняя Пышма, включавший 4 этапа забора проб, показал быструю изменчивость штаммов *L. pneumophila* особенно в летний период высоких температур и влажности. Наиболь-

шим процентом замен отличались локусы генов *pilE* и *tompS*. Анализ штаммов, выделенных из автономной системы водоснабжения Московского региона, позволил выявить как штаммы, аналогичные штаммам из грунтовых вод, так и штаммы, имеющие аллельный профиль, сходный со штаммами градирен. Например, штамм Khimki-6, выделенный из области застоя воды, только по одному локусу аллельного профиля отличался от штаммов градирен с ST 321. Эти данные позволяют предположить подобие процессов изменчивости в условиях градирен и застоя воды.

17 из проанализированных штаммов формировали аллельные комплексы с заменой в одном (single locus variation, SLV) или двух локусах (рисунок). В трех случаях замены связаны с геном *neu A*, а в остальных с генами *fla A*, *pil E*, *asd*, *pro A*. Только переход от ST 728 к ST 87 посредством замены аллеля 3 гена *neu A* на аллель 13 обусловлен изменением единичного основания в последовательности, что может быть объяснено мутацией. В остальных примерах SLV формирование новых аллелей генов вызвано несколькими заменами в последовательности нуклеотидов, что свидетельствует о произошедшей рекомбинации. Подход оценки реком-



UPGMA дерево сходства штаммов *L. pneumophila*, формирующих клональные комплексы, построенное на основе аллельных профилей

бинационных событий на основе количества измененных оснований в сравниваемых аллелях гена при SLV был предложен D.S. Guttman с сотр. и получил название метода клонального разнообразия [9]. Применение этого метода при анализе изменений аллелей генов *Escherichia coli* на основе данных о 527 ST показало преобладание рекомбинаций над мутациями в 5,18 раза [10].

Подход MLST получает преимущества при анализе штаммов потенциальных патогенов при наличии базы данных, включающих как клинические штаммы, так и выделенные из окружающей среды. База данных EWGLI содержит информацию о 4102 штам-

мах, отнесенных к 818 ST [2]. Сопоставление аллельных профилей проанализированных штаммов, выделенных на территории России, с данными базы EWGLI показало, что штаммы с ST 59, 521, 320 и 7 имеют наибольшее количество аналогов среди штаммов, выделенных из клинического материала. Эти данные подчеркивают эпидемиологическую опасность указанных штаммов.

Таким образом, метод MLST штаммов *L. pneumophila* продемонстрировал свою эффективность как в анализе изменчивости штаммов, так и в оценке их эпидемиологической значимости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. N 6. P. 3140—3145.

2. Официальный сайт Европейской рабочей группы по легионеллезу (URL: <http://www.ewgli.org> 13.04.2010).

3. Ratzow S., Gaia V., Helbig J.H., Fry N. Lück P.C. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains // J. Clin. Microbiol. 2007. Vol. 45. N 6. P. 1965—1968.

4. Яцишина С.Б., Астахова Т.С., Романенко В.В. и др. Применение молекулярно-генетических методов при исследовании вспышки болезни легионеров в г. Верхняя Пышма // ЖМЭИ. 2008. № 2. С. 23—29.

5. 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. С. 20—23.

6. 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. Vol. 36. N 6. P. 1560—1567

7. Воронина О.Л., Кунда М.С., Лунин В.Г., Карпова Т.И., Тартаковский И.С. Молекулярно-генетическое типирование штаммов *Legionella pneumophila* и *Legionella species*, выделенных на территории Российской Федерации // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008. Т. 10. № 2. С. 154—162.

8. Основной сайт PubMLST факультета зоологии Оксфордского университета Великобритании (URL: <http://pubmlst.org> 15.04.2010).

9. Guttman D.S., Dykhuizen D.E. Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination not mutation // Science. 1994. Vol. 266. P. 1380—1383.

10. Diancourt L., Passet V., Chervaux Ch., Garault P., Smokvina T., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73. N 20. P. 6601—6611.

Поступила в редакцию
16.04.10

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING IS IMPORTANT APPROACH OF MOLECULAR ECOLOGY

O.L. Voronina, M.S. Kunda, V.G. Lunin, A.L. Gintsburg

Application of multilocus sequence typing for investigation of *Legionella pneumophila* strains isolated in Russia allowed us to obtain data for molecular-ecological analysis of the situation. Strains from subterranean waters demonstrated similar allelic profiles in different distant regions of country. The mutation process had similar direction in conditions of cooling towers and water stagnations in autonomous water supply system. Recombinations predominated during clonal complexes forming. On the bases of comparison of allelic profiles with EWGLI data base epidemiological appreciation of investigated strains was given.

Key words: multilocus sequence typing (MLST), allelic profile, clonal complex, single locus variation (SLV).

Сведения об авторах

Воронина Ольга Львовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биологически активных наноструктур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Тел. 8-499-193-61-19, 8-916-224-86-83; e-mail: kirolg3@newmail.ru

Кунда Марина Сергеевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории биологически активных наноструктур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Тел. 8-499-193-61-19; e-mail: mar-kunda@rambler.ru

Лунин Владимир Глебович — канд. биол. наук, зав. лабораторией биологически активных наноструктур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Тел. 8-499-193-61-19; e-mail: lunin1955@gmail.com

Гинцбург Александр Леонидович — акад. РАМН, докт. биол. наук, директор НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Тел. 8-499-193-30-01; e-mail: gintsburg@riem.ru