

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-85-91

УДК 616-022(470)

С.А. Портенко, А.С. Абдрашитова, Н.Е. Щербакова, П.С. Ерохин, Я.М. Краснов, Н.П. Гусева,  
Н.А. Шарапова, С.А. Щербакова, В.В. Кутырев

## РАСШИРЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ ЛЕГИОНЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ВО ВРЕМЯ ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2013–2014 гг.

ФКВЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Цель работы** – провести расширенное изучение штаммов легионелл, выделенных из эпидемиологически значимых объектов окружающей среды во время подготовки и проведения массовых мероприятий. **Материалы и методы.** В работе использованы 53 штамма *Legionella pneumophila*, выделенные из эпидемиологически значимых объектов окружающей среды на территориях ряда субъектов Российской Федерации в 2013–2014 гг. во время подготовки и проведения массовых мероприятий (XXVII Всемирная летняя Универсиада, Казань; XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры, Сочи; Летняя оздоровительная кампания в 2014 г., Республика Крым; IV Каспийский саммит, Астрахань, 2014 г.). Изучение штаммов осуществляли с помощью методов мультилокусного секвенирования, времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS) и атомно-силовой микроскопии. Типирование штаммов легионелл методом мультилокусного секвенирования проводили в соответствии с алгоритмом Европейской исследовательской группы по легионеллезу Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila*. **Результаты и обсуждение.** На территории Республики Крым и городов Казань, Сочи, Астрахань выделены и охарактеризованы штаммы возбудителя легионеллеза *L. pneumophila*. По результатам слайд-агглютинации 17 штаммов *L. pneumophila* отнесены к 1-й серогруппе, 37 – к 2–14-й серогруппам. На основании данных, полученных методом мультилокусного секвенирования в соответствии с алгоритмом Европейской рабочей группы по надзору за легионеллезом, определены аллельные профили всех изученных штаммов *L. pneumophila*, установлена их принадлежность к семи сиквенс-типам. Методом времяпролетной масс-спектрометрии идентифицированы штаммы легионелл, изучены их белковые профили, сформирована база данных. С помощью метода сканирующей зондовой микроскопии получена информация о морфологии клеток 18 штаммов легионелл и особенностях их поверхностных структур. Таким образом, получены данные о молекулярно-генетических, протеомных и морфометрических особенностях штаммов возбудителя легионеллеза, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах на территории Российской Федерации.

**Ключевые слова:** легионеллез, массовые мероприятия, *Legionella pneumophila*, мониторинг, бактериологический метод, мультилокусное секвенирование, времяпролетная масс-спектрометрия, атомно-силовая микроскопия.

Корреспондирующий автор: Портенко Светлана Анатольевна, e-mail: portenko\_sa@microbe.ru.

Для цитирования: Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Щербакова Н.Е., Ерохин П.С., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Расширенное изучение штаммов легионелл, выделенных из объектов окружающей среды во время подготовки и проведения массовых мероприятий в Российской Федерации в 2013–2014 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:85–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-85-91

S.A. Portenko, A.S. Abdrashitova, N.E. Shcherbakova, P.S. Erokhin, Ya.M. Krasnov, N.P. Guseva,  
N.A. Sharapova, S.A. Shcherbakova, V.V. Kutyrev

## Extensive Studies of *Legionella* Strains Isolated from the Environmental Objects during Preparation and Holding of Mass Events in the Russian Federation in 2013–2014

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Abstract. Objective of the work** was to conduct an extended study of *Legionella* strains isolated from epidemiologically significant environmental objects during the preparation and conduct of mass events in the territory of the Russian Federation in 2013–2014. **Materials and methods.** Studied were 53 strains of *Legionella pneumophila*, isolated from epidemiologically significant objects during the preparation and conduct of a number of mass events (ME): XXVII World Summer Universiade, XXII Olympic Winter Games and XI Paralympic Winter Games, Sochi; Summer Health Promotion Campaign in 2014, Republic of Crimea; IV Caspian Summit, Astrakhan, 2014. Strains were analyzed using multilocus sequencing, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS) and atomic force microscopy. *Legionella* strains were typed by multilocus sequencing in accordance with the algorithm of the European Legionellosis Research Group “Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila*”. **Results and discussion.** Strains of *L. pneumophila*, legionellosis agent, were isolated in the territory of the Republic of Crimea, Moscow, Kazan, Sochi, Astrakhan and characterized. According to the results of slide agglutination, 17 *L. pneumophila* strains were assigned to 1 serogroup, 37 – to 2–14 serogroups. Based on the data obtained by multilocus sequencing, in accordance with the algorithm of the European Working Group on Legionellosis Surveillance, allelic profiles of all the studied *L. pneumophila* strains were identified; their belonging to 7 sequence types was established. Using the method of time-of-flight mass spectrometry, legionella strains were characterized, their protein profiles were studied, and a database was formed. Using the method of scanning probe microscopy, information was obtained on the morphology of the cells of 18 legionella strains and the features of their surface structures. Using the methods of multilocus sequencing, time-of-flight mass

spectrometry, and atomic force microscopy, molecular-genetic, proteomic, and morphometric features of Legionellosis pathogen strains that circulate in epidemiologically significant sites in the Russian Federation were determined.

**Key words:** legionellosis, mass events, *Legionella pneumophila*, monitoring, bacteriological method, multilocus sequencing, time-of-flight mass spectrometry, atomic force microscopy.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Svetlana A. Portenko, e-mail: portenko\_sa@microbe.ru.

**Citation:** Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Shcherbakova N.E., Erokhin P.S., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Shcherbakova S.A., Kuttyrev V.V. Extensive Studies of Legionella Strains Isolated from the Environmental Objects during Preparation and Holding of Mass Events in the Russian Federation in 2013–2014. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 4:85–91. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-85-91

Received 27.11.19. Accepted 03.12.19.

Portenko S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8334-9173>

Бактерии рода *Legionella* являются типичными представителями пресноводных экосистем, при этом количество этих микроорганизмов в природных условиях незначительно и не представляет опасности для человека [1]. В искусственных водных системах (водоснабжения и охлаждения воздуха, бассейнах и т.д.) создаются более благоприятные условия для роста и размножения легионелл, что приводит к накоплению возбудителя в высокой концентрации, представляющей опасность для заражения человека [2].

Ежегодно в различных странах мира регистрируются эпидемические вспышки легионеллеза, связанные с системами водоснабжения. В России крупная вспышка легионеллезной инфекции зарегистрирована летом 2007 г. в городе Верхняя Пышма, число госпитализированных составило 202 человека, из них у 74 лабораторно подтвержден диагноз «легионеллез», в том числе у 4 пациентов – смертно [3].

Основными факторами передачи легионеллезной инфекции являются мелкодисперсный водный аэрозоль и вода, контаминированные возбудителем, поэтому системы кондиционирования и водоснабжения в отелях, аквапарках, на спортивных и других объектах могут представлять опасность для заражения людей. В странах Европейского союза наблюдается подъем заболеваемости легионеллезом с 2013 по 2017 год: от 1,2 случаев на 100 тыс. в 2013 г. до 1,8 в 2017 г. В 2017 г. количество случаев этой инфекции увеличилось на 30 % по сравнению с 2016 г., зафиксировано 9238 случаев легионеллеза, связанного с поездками – travel-associated Legionnaires' disease (TALD), из которых 8624 (93 %) подтверждены лабораторно [4]. По данным отечественных исследователей, на территориях таких субъектов Российской Федерации, как Москва, Московская область, Белгород, Нижний Новгород, Омск, Самара, Тверская и Свердловская области, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, уровень контаминации *Legionella pneumophila* систем горячего водоснабжения превышает 90 % [5, 6]. Учитывая, что методов специфической профилактики легионеллезной инфекции не разработано, единственным подходом к предотвращению вспышек этого заболевания можно назвать мониторинг возбудителя в эпидемиологически значимых объектах окружающей среды и своевременное проведение профилактических мероприятий.

Перечень, порядок и периодичность обследования объектов, а также критерии оценки уровня их контаминации легионеллами регламентированы рядом нормативно-методических документов (НМД): СП 3.1.2.2626-10, МУК 4.2.2217-07 и МУ 3.1.2.2412-08. Продолжительность культурального метода, применяющегося в этих целях, может достигать 10 сут, а идентификация выделенных культур – до 2–3 сут. В последние годы для идентификации штаммов легионелл широкое применение получили методы MALDI-TOF масс-спектрометрии и мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) [7–9].

Данные подходы позволяют не только определить таксономическую принадлежность патогена, но и выявить отличия между штаммами возбудителя, в том числе и в зависимости от их географической принадлежности (места выделения).

**Цель** исследования – провести расширенное изучение штаммов легионелл, выделенных из эпидемиологически значимых объектов окружающей среды на территории Российской Федерации во время подготовки и проведения массовых мероприятий с помощью методов мультилокусного секвенирования, времяпролетной масс-спектрометрии и атомно-силовой микроскопии.

## Материалы и методы

В работе использованы 53 штамма *L. pneumophila*, выделенные из систем горячего водоснабжения на территориях ряда субъектов Российской Федерации в 2013–2014 гг. во время подготовки и проведения массовых мероприятий (ММ): XXVII Всемирная летняя Универсиада в Казани; XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры в Сочи [10]; Летняя оздоровительная кампания в 2014 г. в Республике Крым [11]; IV Каспийский саммит в Астрахани, 2014 г.

Хранение выделенных культур легионелл осуществляли при температуре -20 °С в 1 % протеозопептонном бульоне, рН 6,9 (Himedia, Индия) с добавлением 50 % глицерина (Panreac, Испания). Штаммы легионелл культивировали в соответствии с МУК 4.2.2217-07, применяли питательные среды, зарегистрированные в установленном порядке на территории Российской Федерации: забуференный угольно-дрожжевой агар с ростовой и селек-

тивной добавками (Oxoid, Великобритания; Conda, Испания). Определение принадлежности легионелл к серогруппе осуществляли методом латекс-агглютинации с использованием набора Legionella latex test (Oxoid, Великобритания).

Для экстракции геномной ДНК штаммов *L. pneumophila* применяли набор «ДНК-сорб-В» (ООО «Интерлабсервис», Россия). Амплификацию и секвенирование фрагментов семи генов *L. pneumophila* (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA* и *neuA*) проводили в соответствии с протоколом типирования штаммов *L. pneumophila* методом мультилокусного секвенирования – Sequence-Based Typing (SBT) Европейской рабочей группы по надзору за легионеллезом (EWGLI, [www.ewgli.org]). Этот протокол является международным стандартом типирования штаммов легионелл. Он нашел широкое применение при изучении штаммов *L. pneumophila*, выделенных из объектов окружающей среды [12].

Секвенирование полученных фрагментов ДНК выполняли на генетическом анализаторе ABI 3500xL (Applied Biosystems, США), для анализа полученных последовательностей легионелл и их выравнивания применяли программу MEGA 7.0. Для определения аллельного профиля и сиквенс-типа (ST) изучаемых штаммов использовали базу данных EWGLI SBT на сайте www.ewgli.org.

Подготовку образцов для исследования методом MALDI-ToF-MS проводили в соответствии с МР 4.2.0089-14, используя для экстракции белков метод прямого нанесения образцов на мишень. Сбор исходных спектров анализируемых образцов проводили на масс-спектрометре Microflex™ LT (Bruker Daltonics, Германия). Учет и интерпретацию результатов проводили в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения «MALDI Biotyper 3.0 RTC» (Bruker Daltonics, Германия), сравнивая полученные спектры с референсными. Учет и интерпретацию результатов проводили в автоматическом режиме. По окончании процесса идентификации программа отображала результат, приводя наиболее релевантную исходному спектру таксономическую единицу базы данных с указанием значения коэффициента соответствия (Score Value).

Подготовку культур легионелл к исследованиям с помощью метода АСМ проводили в соответствии с МУ 1.3.3103-13. Морфометрический анализ клеток легионелл осуществляли методом сканирующей зондовой микроскопии (полуконтактная атомно-силовая микроскопия) с использованием сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (НТ-МДТ, Россия) в режиме прерывистого контакта следующими методами: полуконтактным и рассогласования. Значения основных параметров сканирования определяли в соответствии с методическими рекомендациями «Оптимизация параметров сканирования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии» (утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 22.10.2013 г.).

Обработку изображений проводили в программе Nova (ООО «НТ-МДТ СИ», Россия).

## Результаты и обсуждение

При исследовании 53 штаммов *L. pneumophila* в реакции латекс-агглютинации (набор для идентификации легионелл и определения серогрупп *L. pneumophila* Legionella latex test, Oxoid) 16 культур отнесены к 1 серогруппе, 37 – к 2–14 серогруппам.

Анализ данных 16 штаммов *L. pneumophila* 1 серогруппы (1 Sg) выявил у семи штаммов аллельный профиль 1, 4, 3, 1, 1, 1, 1, что определяет их принадлежность к ST-1. Штаммы *L. pneumophila* 1 Sg ST-1 обнаружены на территории Республики Крым, а также в городах Астрахань и Сочи. По результатам исследований пяти штаммов *L. pneumophila* (Астрахань) отнесены к генотипу ST-345 (аллельный профиль 6, 10, 19, 3, 19, 4, 11), четыре штамма *L. pneumophila* (Республика Крым) – к генотипу ST-967 (аллельный профиль 2, 10, 3, 3, 9, 14, 3). Для одного из штаммов *L. pneumophila* 1 Sg, выделенных из объектов окружающей среды в Астрахани (аллельный профиль 6, 10, 19, 3, 19, 1, 11), сиквенс-тип не определен (таблица).

При изучении 37 штаммов *L. pneumophila* 2-14 Sg выявлена их принадлежность к семи сиквенс-типам. К ST-114 (аллельный профиль 3, 6, 1, 6, 14, 11, 9) отнесены 7 штаммов (1 – Сочи, 6 – Казань); к ST-366 (аллельный профиль 2, 10, 3, 3, 9, 4, 6) – 9 штаммов (6 – Сочи, 3 – Республика Крым); к ST-87 (аллельный профиль 2, 10, 3, 28, 9, 4, 13) – 3 штамма, Сочи; к ST-967 (2, 10, 3, 3, 9, 14, 3) – 10 штаммов, Республика Крым. Для штаммов, выделенных в Сочи, для одного определен генотип ST-856 (аллельный профиль 5, 1, 22, 30, 6, 10, 1) и для еще одного – ST-698 (аллельный профиль 7, 10, 17, 3, 17, 11, 9). Для шести штаммов *L. pneumophila* 2-14 Sg, Астрахань, имеющих аллельный профиль 3, 6, 1, 6, 17, 11, 9, сиквенс-тип не определен, также как и для указанного выше штамма 1 Sg, выделенного на той же территории.

При исследовании 53 штаммов легионелл методом MALDI-ToF-MS установлена их принадлежность к виду *L. pneumophila*, при этом коэффициент соответствия Score Value для всех изученных штаммов находился в диапазоне 2,0–2,3, что свидетельствует о достоверности полученных результатов идентификации до вида. С использованием полученных данных проведен кластерный анализ изучаемых штаммов с референтными MSP штаммов, представленных в базе данных программы Bruker Daltonic, поддерживаемых в фондах Американской коллекции типовых культур (ATCC) и Германской коллекции микроорганизмов и культур клеток (DSM). В итоге кластеризации спектры распределились на две основные ветви дендрограммы, на одной из которых располагаются только штаммы из DSM коллекции, на второй – MSP штаммов легионелл, выделенных



Характеристика штаммов *L. pneumophila*, выделенных из систем горячего водоснабженияCharacteristics of *L. pneumophila* Strains Isolated from Hot Water Supply System

Номер штаммов <i>Legionella pneumophila</i> Strain No <i>Legionella pneumophila</i>	Серогруппа Serogroup	Алельный профиль <i>flaA</i> , <i>pilE</i> , <i>asd</i> , <i>mip</i> , <i>tompS</i> , <i>proA</i> , <i>neuA/MLST</i> <i>Allele Profile flaA, pilE, asd, mip, tompS,</i> <i>proA, neuA/MLST</i>	Сиквенс-тип Sequence-type	Наименование мероприятия, место выделения, год* Event, site of isolation, year*
0007, 0030, 0225, 0228, 0303 698/1	1	1, 4, 3, 1, 1, 1, 1	1	2
1067, 1068, 1081, 1082, 1083		6, 10, 19, 3, 19, 4, 11	345	3
700, 702, 703, 881		2, 10, 3, 3, 9, 14, 3	967	4
1084		6, 10, 19, 3, 19, 1, 11	н/о	3
0034		1, 4, 3, 1, 1, 1, 1	1	4
0177, 0209, 0444	2-14	2, 10, 3, 28, 9, 4, 13	87	2
1/52, 2/53, 3/54, 4/55, 5/56, 8/81		3, 6, 1, 6, 14, 11, 9	114	2
0004				1
0042, 0155, 0156, 0262, 0263, 0264		2, 10, 3, 3, 9, 4, 6	366	2
674, 676, 678				3
0169		7, 10, 17, 3, 17, 11, 9	698	2
0073		5, 1, 22, 30, 6, 10, 1	856	2
698/2-14, 699, 701, 882, 1045, 1046		2, 10, 3, 3, 9, 14, 3	967	3
1078, 1088, 1089		3, 6, 1, 6, 1, 11, 9	1999	4
1071		3, 6, 1, 6, 17, 11, 9	н/о	4
1072, 1073		3, 13, 1, 14, 9, 9, 3	н/о	4
1074, 1075, 1090		3, 6, 1, 6, 4, 11, 9	н/о	4

Примечание: н/о – не определяется; \*1 – XXVII Всемирная летняя универсиада в Казани, 2013 г.; 2 – XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры в Сочи, 2014 г.; 3 – Летняя оздоровительная кампания в 2014 г. в Республике Крым, Севастополь; 4 – IV Каспийский саммит в Астрахани, 2014 г.

Note: n/i – not identified, \*1 – XXVII World Summer Universiade in Kazan, 2013; 2 – XXII Olympic Winter Games and XI Paralympic Winter Games in Sochi, 2014; 3 – Summer Health Promotion Campaign, 2014 in the Republic of Crimea, Sevastopol; 4 – IV Caspian Summit, Astrakhan, 2014.

на территории России и из коллекции ATCC. Следует отметить, что спектры штаммов *L. pneumophila* ATCC 35251 TW VUN и ATCC 33216 TW VUN, а также два штамма из изученных нами (1067, Астрахань и 0030, Сочи) сформировали два отдельных кластера, соответственно, в пределах второй основной ветви. Остальные MSP штаммов легионелл распределились на дендрограмме по шести подгруппам, в четырех из которых, наряду со штаммами, выделенными на территории России, присутствуют штаммы из коллекции ATCC, а в двух – только спектры изучаемых нами штаммов (рис. 1).

Необходимо отметить, что использованная в работе база данных «MALDI Biotyper 3.0 RTC» не содержит последовательности штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных на территории Российской Федерации. Полученные нами масс-спектры 53 штаммов легионелл использованы при формировании базы данных «Белковые профили масс-спектров штаммов *Legionella pneumophila* для программы MALDI Biotyper». Созданная база данных предназначена для работы с программным комплексом MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия), содержит совокупность упорядоченных значений белковых масс-спектров штаммов *L. pneumophila*, выделенных на территории России, и является дополнением к библиотеке референсных масс-спектров микроорганизмов III–IV групп патогенности Bruker Daltonics программы MALDI Biotyper.

Методом АСМ исследовано 18 штаммов *L. pneumophila* (Казань, Астрахань), для всех штам-

мов получены сходные значения линейных размеров и среднеарифметической шероховатости, которые варьировали в диапазонах  $(1,8 \pm 0,4) \times (0,3 \pm 0,07) \times (0,25 \pm 0,05)$  мкм и 15–30 нм (рис. 2).

Вопросы типирования *L. pneumophila* актуальны как при расследовании эпидемических вспышек легионеллеза, так и для характеристики штаммов, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах. Среди методов молекулярного типирования наиболее перспективным подходом для практического внедрения представляется мультилокусное секвенирование – SBT, характеризующееся высокой воспроизводимостью и дискриминирующей способностью. Исследование, проводимое с этой целью, включает изучение полиморфизма семи генов, кодирующих белковые структуры (*fla*, *pile*, *tompS*), фактор вирулентности (*mip*) и ферменты метаболизма *L. pneumophila* (*asd*, *proA*, *neuA*) [13].

Все изученные штаммы возбудителя легионеллеза принадлежали к девяти сиквенс-типам. Более половины культур отнесены к пяти генотипам: ST-967 – 10 штаммов, ST-366 – 9 штаммов, ST-1 и ST-114 – по 7 штаммов, ST-345 – 5 штаммов. Сиквенс-типы ST-87, ST-968, ST-856 и ST-1999 встречались реже – к каждому из них принадлежали от 3 до 1 из изученных штаммов *L. pneumophila*. При анализе полученных данных выявились определенные отличия в распространении генотипов возбудителя легионеллеза на разных территориях.

Так, при проведении XXVII Всемирной летней универсиады в Казани (2013 г.) из проб объектов

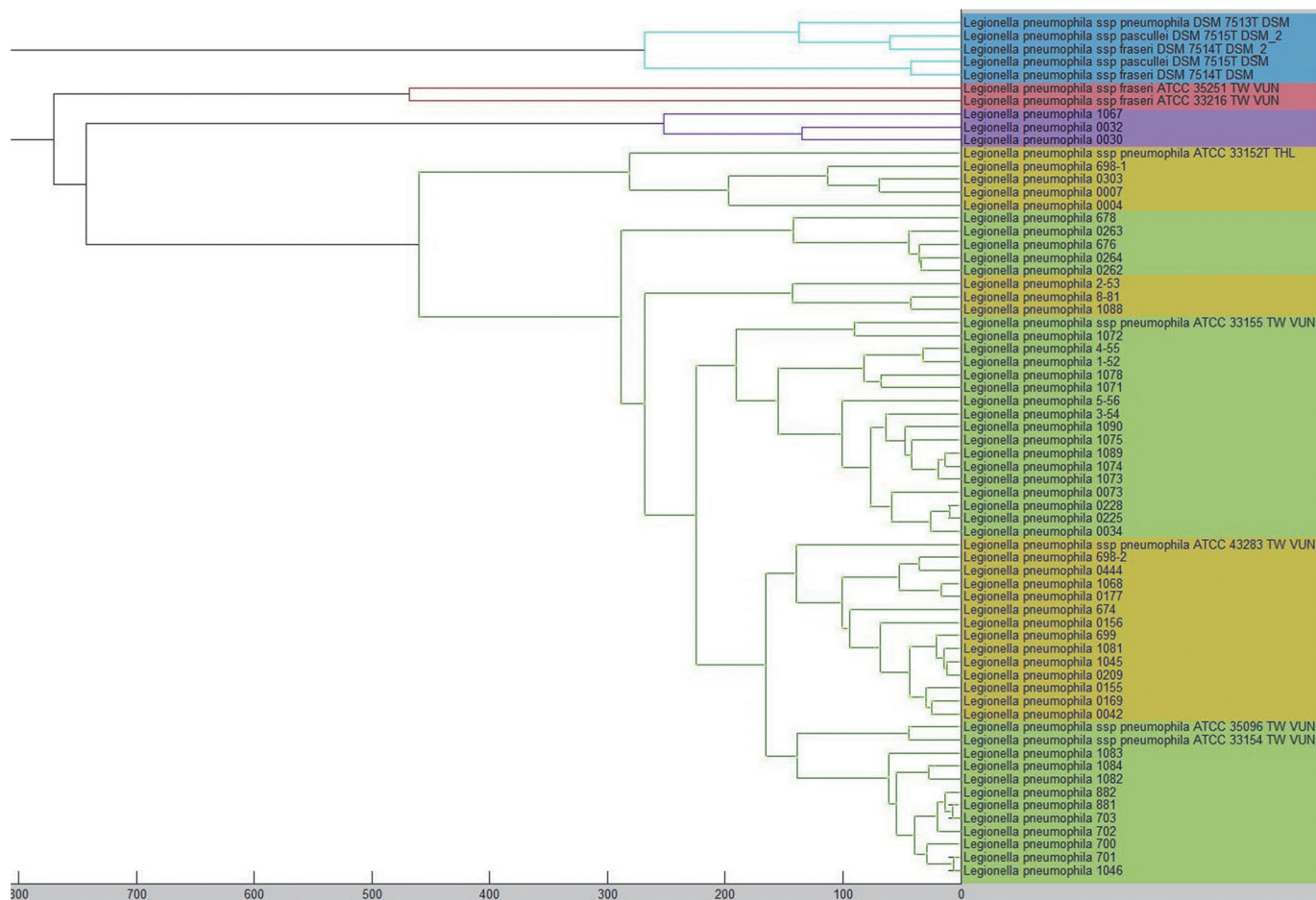


Рис. 1. MSP-дендрограмма белковых профилей штаммов *L. pneumophila*, выделенных на территории Российской Федерации и штаммов возбудителя легионеллеза из базы данных MALDI Biotyper 3.0 RTC

Fig. 1. MSP-dendrogram of protein profiles of *L. pneumophila* strains isolated in the territory of the Russian Federation and legionellosis agent strains from the database “MALDI Biotyper 3.0 RTC”

окружающей среды выделено шесть штаммов возбудителя легионеллеза, которые в 100 % случаев принадлежали к сиквенс-типу ST-114 (2–14 серогруппы). Тогда как из 18 штаммов *L. pneumophila*, выделенных во время подготовки и проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи, по 6 культур легионелл относились к ST-1 и ST-366, 3 культуры – к ST-87 и по 1 культуре –

к ST-114, ST-698 и ST-856. При проведении летней оздоровительной кампании в 2014 г. в Республике Крым (Севастополь) выделено 14 штаммов возбудителя легионеллеза, из них 10 принадлежали к сиквенс-типу ST-967, 3 – к ST-366, 1 – к ST-1.

Особый интерес представляют результаты исследования культур *L. pneumophila*, изолированных в рамках подготовки и проведения IV Каспийского саммита в 2014 г. в Астрахани. Из 15 изученных штаммов возбудителя легионеллеза только в 8 случаях удалось определить сиквенс-тип: ST-345 (5 культур) и ST-1999 (3 культуры). Для остальных изолятов получены новые молекулярные профили, которые не представлены в базе данных EWGLI SBT.

В настоящее время база данных EWGLI SBT включает в себя последовательности более 13 тыс. штаммов *L. pneumophila*, из них около 4,5 тыс. – выделенных из объектов окружающей среды, а также более чем 2,8 тыс. сиквенс-типов легионелл. Однако полученные нами данные и сообщения ряда исследователей указывают на то, что не всегда с помощью данного алгоритма возможно получить полноценные данные и провести типирование штаммов *L. pneumophila*, что инициирует работу по созданию новых методических подходов в этом направлении.

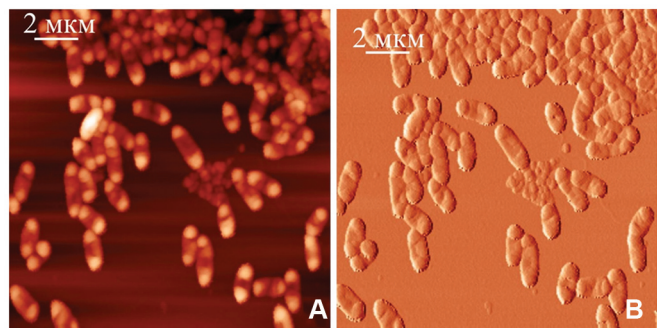


Рис. 2. AFM изображения штамма *L. pneumophila* 1089 (Астрахань, 2014 г.):

A – полуконтактный метод, B – метод рассогласования

Fig. 2. AFM visualization of *L. pneumophila* 1089 strain (Astrakhan, 2014):

A – tapping method; B – mismatch method



С помощью исследований методом MALDI-ToF-MS получены результаты, свидетельствующие об определенных отличиях белковых профилей штаммов *L. pneumophila* 1067 (Астрахань) и 0030 (Сочи), от остальных изученных штаммов, выделенных на территории Российской Федерации, а также от штаммов легионелл из коллекций ATCC и DSM. Сформированная нами база данных «Белковые профили масс-спектров штаммов *Legionella pneumophila* для программы MALDI Biotyper» является пополняемой и позволяет проводить идентификацию и сравнительный анализ масс-спектров штаммов *L. pneumophila*, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах на территории Российской Федерации.

Результаты морфометрического анализа, проведенного методом АСМ, позволили получить подробную информацию о морфологии клеток легионелл и особенностях их поверхностных структур.

Таким образом, на территории Казани, Сочи, Астрахани и Республики Крым из систем горячего водоснабжения выделены и охарактеризованы штаммы возбудителя легионеллеза *L. pneumophila*. С помощью методов мультилокусного секвенирования и АСМ получены данные о молекулярно-генетических и морфометрических свойствах штаммов возбудителя легионеллеза, циркулирующих в эпидемиологически значимых объектах на территории Российской Федерации. Получено свидетельство о регистрации базы данных «Белковые профили масс-спектров штаммов *Legionella pneumophila* для программы MALDI Biotyper» № 2018620064 от 11.01.2018 г.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### Список литературы

- van Heijnsbergen E., de Roda Husman A.M., Lodder W.J., Bouwknegt M., Docters van Leeuwen A.E., Bruin J.P., Euser S.M., den Boer J.W., Schalk J.A.C. Viable *Legionella pneumophila* bacteria in natural soil and rainwater puddles. *J. Appl. Microbiol.* 2014; 117(3):882–90. DOI: 10.1111/jam.12559.
- Карпова Т.И., Тартаковский И.С. Особенности эпидемиологии и лабораторной диагностики легионеллеза. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2015; 4:51–8.
- Онищенко Г.Г., Лазикова Г.Ф., Чистякова Г.Г., Демина Ю.В., Никонов Б.И., Романенко В.В., Смирнова С.С., Терентьева Л.Н., Малоземова Т.Ю., Ирижепова О.В., Гаврилова Н.А., Аввакумова Н.П., Шитоева Е.В. Эпидемиологическая характеристика вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2008; 2:82–5.
- Legionnaires' disease Annual Epidemiological Report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. P. 2.
- Дронина Ю.Е., Тартаковский И.С., Садретдинова О.В., Карпова Т.И., Новокшона И.В., Груздева О.А., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н. Серологическая характеристика штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных из потенциально опасных водных систем в Российской Федерации в 2007–2011 годах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012; 2:23–28.
- Тартаковский И.С., Груздева О.А., Галстян Г.М., Карпова Т.И. Профилактика, диагностика и лечение легионеллеза. М.: Студия МДВ; 2013. 344 с.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A. *Legionella* contamination in warm water systems: a species-level survey. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2018; 221(2):199–210. DOI: 10.1016/j.ijheh.2017.10.011.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A.J. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiol. Methods.* 2016; 127:154–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.05.028.
- Zhan X.-Y., Zhu Q.-Y. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. *PLoS ONE.* 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986.
- Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Portenko S.A., Gusev A.S., Potchareva E.S., Savelyeva I.V., Volynkina A.S., Savelyev V.N., Михайлова М.Е., Кузнецова И.В., Бобенко О.А., Ефременко Д.В., Казакова Е.С., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Касьян И.А., Билько Е.А., Мицевич Е.В., Мицевич И.П., Платонов М.Е., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В., Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Малай В.И., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Бирюков В.А., Божко И.И., Щербина Л.И., Погудина О.А. Организация обследования и выявление возбудителя легионеллеза в объектах окружающей среды в период подготовки и проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 2:50–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-50-53.
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Дикова С.П., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Казакова Е.С., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Куклев В.Е., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Карнаухов И.Г. Итоги работы СПЭБ Роспотребнадзора по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия в период летней оздоровительной кампании 2014 г. в Крымском федеральном округе. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 4:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-45-48.
- Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Luck P.C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T.G. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(5):2047–52. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005.
- Lück C., Fry N.K., Helbig J.H., Jarraud S., Harrison T.G. Typing methods for *Legionella*. In: Buchrieser C., Hilbi H., editors. *Legionella. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. NJ, Totowa: Humana Press; 2013. Vol. 954. P. 119–48. DOI: 10.1007/978-1-62703-161-5\_6.

#### References

- van Heijnsbergen E., de Roda Husman A.M., Lodder W.J., Bouwknegt M., Docters van Leeuwen A.E., Bruin J.P., Euser S.M., den Boer J.W., Schalk J.A.C. Viable *Legionella pneumophila* bacteria in natural soil and rainwater puddles. *J. Appl. Microbiol.* 2014; 117(3):882–90. DOI: 10.1111/jam.12559.
- Karpova T.I., Tartakovsky I.S. [Peculiarities of epidemiology and laboratory diagnosis of legionellosis]. *Infektsionnyye Bolezni. Novosti, Mneniya, Obucheniye [Infectious Diseases. News, Opinions, Training]*. 2015; 4:51–8.
- Onishechenko G.G., Lazikova G.F., Chistyakova G.G., Demina Yu.V., Nikonov B.I., Romanenko V.V., Smirnova S.S., Terentyeva L.N., Malozemova T.Yu., Irizhepova O.V., GavriloVA N.A., Avvakumova N.P., Shitoeva E.V. [Epidemiologic characteristic of Legionnaire's disease outbreak in town Verkhnyaya Pyshma]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2008; 2:82–5.
- Legionnaires' disease Annual Epidemiological Report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019. P. 2.
- Dronina Yu.E., Tartakovsky I.S., Sadretdinova O.V., Karpova T.I., Novokshonova I.V., Gruzdeva O.A., Karazhas N.V., Rybalkina T.N. [Serologic characteristic of *Legionella pneumophila* strains isolated from potentially dangerous water systems in russian federation in 2007–2011]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2012; 2:23–8.
- Tartakovsky I.S., Gruzdeva O.A., Galstyan G.M., Karpova T.I. [Prophylaxis, Diagnostics, and Treatment of Legionellosis]. Moscow; 2013. 344 p.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A. *Legionella* contamination in warm water systems: a species-level survey. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2018; 221(2):199–210. DOI: 10.1016/j.ijheh.2017.10.011.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A.J. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiol. Methods.* 2016; 127:154–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.05.028.
- Zhan X.-Y., Zhu Q.-Y. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. *PLoS ONE.* 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986.
- Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Portenko S.A., Gusev A.S., Potchareva E.S., Savelyeva I.V., Volynkina A.S., Savelyev V.N., Михайлова М.Е., Кузнецова И.В., Бобенко О.А., Ефременко Д.В., Казакова Е.С., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Касьян И.А., Билько Е.А., Мицевич Е.В., Мицевич И.П., Платонов М.Е., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В., Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Малай В.И., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Бирюков В.А., Божко И.И., Щербина Л.И., Погудина О.А. Организация обследования и выявление возбудителя легионеллеза в объектах окружающей среды в период подготовки и проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015; 2:50–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-50-53.

S.A., Gus'kov A.S., Pochtareva E.S., Savel'eva I.V., Volynkina A.S., Savel'ev V.N., Mikhailova M.E., Kuznetsova I.V., Bobenko O.A., Efremenko D.V., Kazakova E.S., Krasovskaya T.Yu., Kuklev V.E., Kas'yan I.A., Bil'ko E.A., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Platonov M.E., Teimurazov M.G., Polosenko O.V., Eldinova V.E., Boiko E.A., Malay V.I., Klindukhov V.P., Grechanaya T.V., Nikolaevich P.N., Biryukov V.A., Bozhko I.I., Shcherbina L.I., Pogudina O.A. [Management of the investigation and detection of legionellosis agent in the environmental samples during the preparation and holding of the XXII Winter Olympics and XI Paralympics in Sochi]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 2:50–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-50-53.

11. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dikova S.P., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kazakova E.S., Portenko S.A., Krasovskaya T.Yu., Sharova I.N., Kuklev V.E., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Karnaukhov I.G. [Results of work of the Rospotrebnadzor SAET on the provision of sanitary epidemiological welfare of the population during the summer health-promotion campaign, 2014 in the Crimean Federal District]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 4:45–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-45-48.

12. Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Luck P.C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T.G. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 2005;

43(5):2047–52. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005.

13. Lück C., Fry N.K., Helbig J.H., Jarraud S., Harrison T.G. Typing methods for *Legionella*. In: Buchrieser C., Hilbi H., editors. *Legionella. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. NJ, Totowa: Humana Press; 2013. Vol. 954. P. 119–48. DOI: 10.1007/978-1-62703-161-5\_6.

**Authors:**

Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Shcherbakova N.E., Erokhin P.S., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Shcherbakova S.A., Kutyrrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

**Об авторах:**

Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Щербакова Н.Е., Ерохин П.С., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шаропова Н.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 27.11.19.

Принята к публ. 03.12.19.