

Ю.В.Останкова<sup>1</sup>, А.В.Семенов<sup>1</sup>, Н.А.Стойнова<sup>1</sup>, Н.К.Токаревич<sup>1</sup>,  
Н.Е.Любимова<sup>1</sup>, О.А.Петрова<sup>1</sup>, Ю.В.Ананьина<sup>2</sup>, Е.М.Петров<sup>2</sup>

## ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ LEPTOSPIRA SPP. НА ОСНОВЕ 16S рРНК

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

*Цель.* Сравнительное типирование коллекции штаммов *Leptospira* spp. на основе анализа 16S фрагмента РНК. *Материалы и методы.* Для ПЦР использовали две пары праймеров, совместно фланкирующих фрагмент размером 1423 п.о. Для филогенетического анализа были использованы последовательности штаммов 16S рРНК *Leptospira* spp., представленные в международной базе данных. *Результаты.* Показано высокое сходство, в том числе межвидовое, 16S фрагмента у штаммов *Leptospira* spp., независимо от источника получения, серовара и серогруппы. Обсуждаются гетерогенность первичной матрицы, спонтанные мутации горячих точек и ошибочные спаривания нуклеотидов, характерные для 16S последовательности патогенных штаммов *Leptospira* spp. Получена молекулярно-генетическая характеристика некоторых референсных штаммов *Leptospira* spp. по 16S последовательности. *Заключение.* Результаты исследований свидетельствуют о целесообразности введения в клиническую практику идентификацию штаммов *Leptospira* spp. по 16S последовательности непосредственно из клинического материала, что позволит значительно сократить время идентификации, отказаться от сложных типоспецифических сорворотов и иных трудоемких методов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 35—39

Ключевые слова: лептоспироз, зооантропонозы, 16S РНК секвенирование

Yu.V.Ostankova<sup>1</sup>, A.V.Semenov<sup>1</sup>, N.A.Stoyanova<sup>1</sup>, N.K.Tokarevich<sup>1</sup>,  
N.E.Lyubimova<sup>1</sup>, O.A.Petrova<sup>1</sup>, Yu.V.Ananina<sup>2</sup>, E.M.Petrov<sup>2</sup>

## TYPING OF LEPTOSPIRA SPP. STRAINS BASED ON 16S rRNA

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg; <sup>2</sup>Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

*Aim.* Comparative typing of *Leptospira* spp. strain collection based on analysis of 16S RNA fragment. *Materials and methods.* 2 pairs of primers were used for PCR, that jointly flank 1423 b.p. sized fragment. Sequences of *Leptospira* spp. strain 16S rRNA, presented in the international database, were used for phylogenetic analysis. *Results.* A high similarity, including interspecies, of the 16S fragment in *Leptospira* spp. strains was shown independently of the source, serovar and serogroup. Heterogeneity of the primary matrix, spontaneous mutations of hotspots and erroneous nucleotide couplings, characteristic for 16S sequence of pathogenic *Leptospira* spp. strains, are discussed. Molecular-genetic characteristic of certain reference *Leptospira* spp. strains by 16S sequence is obtained. *Conclusion.* Results of the studies give evidence on expedience of introduction into clinical practice of identification of *Leptospira* spp. by 16S sequence directly from the clinical material, that would allow to significantly reduce identification time, dismiss complex type-specific sera and other labor-intensive methods.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 35—39

Key words: leptospirosis, zoo anthroponoses, 16S RNA sequencing

## ВВЕДЕНИЕ

Лептоспироз — широко распространенная в мире зооантропонозная инфекция. Наиболее высокий уровень заболеваемости людей отмечается в странах с влажным субтропическим и тропическим климатом, где регистрируются вспышки, возникающие в сезон дождей и охватывающие сотни человек [2, 8]. В России более чем в 50 субъектах федерации ежегодно выявляются заболевания лептоспирозом, и летальность при этой инфекции на некоторых территориях превышает 20%, что позволяет рассматривать лептоспироз в одном ряду с особо опасными инфекциями [1].

Возбудителями лептоспироза являются микроорганизмы *Leptospira interrogans sensu lato*, принадлежащие к порядку Spirochaetales, самостоятельного семейства Leptospiraceae, рода *Leptospira*. Один и тот же серовар лептоспир у разных людей может вызывать разное по течению и симптоматике заболевание. Однако *L. icterohaemorrhagiae* в большинстве случаев протекает более тяжело с высоким процентом летальности. В настоящее время систематика и номенклатура лептоспир включает две различные классификационные системы: серологическую и генотипическую. Таксономическим критерием для серологической системы служит антигенный состав, и основным таксоном является серовар. В настоящее время насчитывается более 268 серологических вариантов патогенных лептоспир. В основе генотипической классификации лептоспир лежит различие в размере и структуре генома. В ряде случаев генотипическая классификация не всегда коррелирует с серологической — лептоспиры одной серогруппы могут принадлежать к разным геновидам [Paul N., Levett P., 2001]. В настоящее время как за рубежом, так и в России проводятся активные исследования по изучению генома и генетического разнообразия лептоспир, а также по определению возможности использования молекулярно-генетических методов для решения диагностических и эпидемиологических задач.

В связи с этим, целью данной работы являлось сравнительное типирование коллекции штаммов *Leptospira spp.* на основе анализа 16S фрагмента РНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы стали международные референс-штаммы, используемые в лаборатории зооантропонозных инфекций Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Пастера для диагностики лептоспироза в реакции микроагглютинации, а также новый штамм № 350 «А», выделенный в 2013 году из крови человека (табл.). Штамм «А» депонирован в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ — Оболенск» для целей национальной патентной процедуры (№ В-7745 от 05.11.2014).

Для исключения контаминаций и иных ошибок человеческого фактора в качестве контроля из музея лептоспир Центра Минздрава России по лептоспирозам при ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи методом случайной выборки были взяты четыре референсных штамма, аналогичных исследованным в работе. Контейнеры с полученными штаммами были открыты единственный раз непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот (НК). Таким образом, исключали возможные заносы в процессе пересевания и роста культур. Полученные последовательности 16S полностью совпадали с соответствующими последовательностями аналогичных штаммов, культивированных в нашей лаборатории.

Серологическое типирование штаммов проведено с помощью перекрестной реакции микроагглютинации (РМА) по методике, предложенной в [5].

Выделение НК проводили двумя методами, принцип действия которых основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора, содержащего гуанидин тиоцианат, и последующим осаждением нуклеиновых кислот

### Штаммы *Leptospira* spp., использованные в работе

Штамм	Серогруппа	Серовар	Где, когда, кем выделен
Akiyami A	Autumnalis	Autumnalis	Япония, 1925, Koshina et al.
Castellon-3	Ballum	Castellonis	Испания, 1955, Babudieri
Veldrat Bataviae 46 <sup>1</sup>	Javanica	Javanica	Индонезия, 1938, Esseveld, Mochtar
Mus-24 <sup>2</sup>	Sejroe	Saxkoebing	Дания, 1942, Borg-Petersen
M-84	Sejroe	Sejroe	Дания, 1937, Borg-Petersen, Christensen
3705	Wolffi	Sejroe	Индонезия, 1937, Wolff
M-20	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Дания, 1935, Borg-Petersen
Hond Utrecht 1V <sup>3</sup>	Canicola	Canicola	Голландия, 1931, Klarenbeck, Schuffner
Pomona	Pomona	Pomona	Австралия, 1936, Clayton et al.
5621 <sup>4</sup>	Pomona	Mozdok	СССР, 1961, Семенова
Salinem	Pyrogenes	Pyrogenes	Индонезия, 1922, Vervoort
Ballico	Australis	Australis	Австралия, 1937, Lumley
Van Tienen	Bataviae	Bataviae	Индонезия, 1925, Walch
Moskva-V	Grippotyphosa	Grippotyphosa	СССР, 1928, Тарасов
Perpelicin	Tarassovi	Tarassovi	СССР, 1938, Киктенко, Ананьин
Абайдуллаев № 350	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Россия, 2013, Стоянова

Примечание. Источник выделения: <sup>1</sup> черная крыса, <sup>2</sup> желтогорлая мышь, <sup>3</sup> собака, <sup>4</sup> полевка обыкновенная, в остальных случаях — человек.

изопропанолом и/или этанолом: хлороформ-солевая экстракция и с помощью тест-системы «АмплиПрайм Рибо-преп» (ЦНИИЭ). Выход рРНК при использовании тест-системы был меньше, однако достаточный для дальнейшей работы с полученной НК. Обратная транскрипция проводилась на неспецифичных праймерах. Для ПЦР использовали две пары праймеров, совместно фланкирующих фрагмент размером 1423 пар оснований (п.о.), сконструированных на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК. При этом одна из пар специфична для лептоспир.

Постановку ПЦР для каждой пары праймеров осуществляли по следующей схеме: в пробирке объемом 1,5 мл смешивали 16,6 мМ сульфата аммония; 67 мМ трис HCl, pH 8,8; 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 6,7 мкМ ЭДТА; 0,17 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 1 мМ смеси четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов; 1 ед. активности Taq ДНК-полимеразы и по 30 пМ каждого олигопраймера. В полученную смесь для ПЦР добавляли 1 мкг исследуемого образца. Амплификацию проводили при условиях: после денатурации (94°C, 5 мин) устанавливали 40 циклов амплификации в режиме 94°C — 30 сек. (денатурация); 55°C — 30 сек (отжиг праймеров); 72°C — 1 мин 30 сек (синтез). Финальный синтез при 72°C длился 7 мин.

Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по следующей методике: смесь из 2 мкл 3М ацетата натрия, 2 мкл 0,125М EDTA и 1 мкл гликогена вносили в 20 мкл продукта амплификации и инкубировали при комнатной температуре в присутствии охлажденного 96% этилового спирта 15 минут. Центрифугировали при 14 000 об/мин, 4°C 15 мин супернатан удаляли и дважды промывали осадок охлажденным 70% этиловым спиртом, повторяя процедуру центрифугирования на холоде. Промытый осадок сушили.

Для анализа качества очищения осадок растворяли в 30 мкл TE-буфера и визуализировали в агарозном геле. Очищенный фрагмент достаточной концентрации использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере, содержащем формамид, и помещали в генетический анализатор.

Анализ фрагментов проводили на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP.

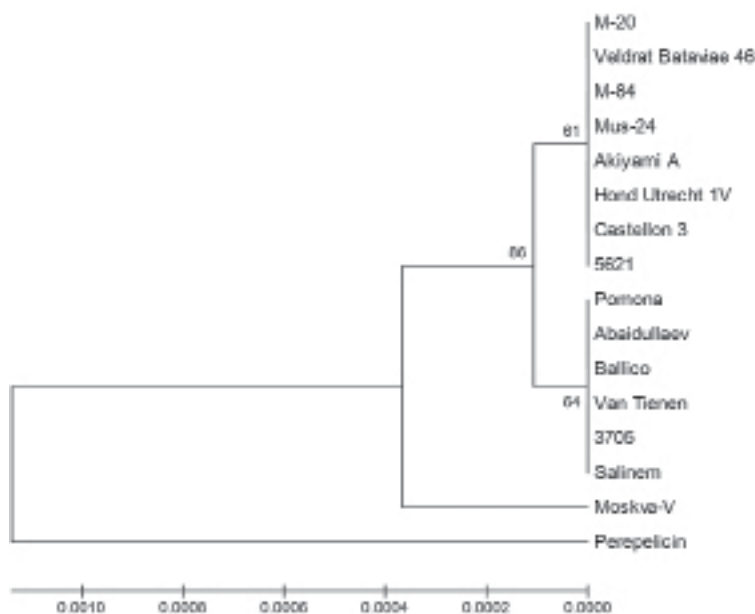
Первичный сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA5, используя алгоритм ClustalW. Поскольку для фрагмента 16S показана высокая консервативность, для филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом невзвешенной попарной группировки с усреднением (UPGMA). Для оценки достоверности построенных деревьев проведен бутстреп (bootstrap) анализ для 500 повторностей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получены фрагменты размером 1423 п.о., для которых определены последовательности НК. Данные последовательности приняты к депонированию в международную базу данных.

Согласно международной базе данных, для большинства исследуемых в нашей работе штаммов (14 образцов) была показана наибольшая идентичность со штаммами *L. interrogans*, независимо от источника получения, серогруппы и серовара. При этом группа разделялась на две подгруппы, одна из которых включала как некоторые штаммы, полученные от человека, так и все штаммы, полученные от животных (рис.). Филогенетическое древо построено по результатам сравнительного анализа последовательности 16S гена рРНК фрагментов *Leptospira* spp. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью bootstrap анализа 500 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Интересно отметить, что два штамма, относящиеся к серогруппе Sejroe (штамм Mus-24 серовар Saxkoebing и штамм M-84 серовар Sejroe) относились к одной подгруппе, а штамм 3705 серовар Sejroe серогруппы Sejroe к другой. Штаммы, относящиеся к серогруппе Pomona (штамм Pomona серовар Pomona и штамм 5621 серовар Mozdok), также оказались в разных подгруппах.

Обращает на себя внимание, что столь высокое сходство с *L. interrogans* проявили также некоторые из штаммов, предположительно относящихся к иным видам — *L. borgpetersenii* и *L. kirschneri*.



Филогенетическое древо, построенное по результатам сравнительного анализа последовательности 16S гена рРНК фрагментов *Leptospira* spp. (UPGMA, bootstrap=500).

В связи с обнаруженной высокой схожестью 16S последовательностей штаммов разных видов, было высказано предположение о контаминации, так как известно, что содержание коллекций референсных штаммов нередко осложняется проблемой перекрестных заносов [3]. Однако использование в работе контрольных штаммов исключило эту вероятность. Проанализировав фрагменты НК штаммов, представленных в нашей работе и в международной базе данных, мы пришли к выводу, что их последовательности 16S имеют крайне незначительные межвидовые отличия на данных участках, которые легко могут быть отнесены к гетерогенности первичной матрицы или спонтанным мутациям горячих точек. То есть оценка только по 16S фрагменту не позволяет достаточно точно типировать *Leptospira* spp., что противоречит некоторым данным о высокой специфичности типирования *Leptospira* spp. по 16S [7], но совпадает с результатами, демонстрирующими необходимость дополнительного типирования штаммов по специфичным генам в связи с вероятной идентичностью результатов 16S типирования и метода серологического типирования [4].

Кроме того, возможной причиной сходства последовательностей могут являться ошибочные спаривания нуклеотидов, характерные для 16S последовательности патогенных штаммов *Leptospira* spp. [6].

Таким образом, очевидна необходимость идентификации *Leptospira* spp. по специфическим генам, что позволит контролировать качество работы лаборатории, а также будет способствовать сохранению коллекционных штаммов.

Результаты наших исследований свидетельствуют о целесообразности введения в клиническую практику идентификацию штаммов *Leptospira* spp. по 16S последовательности непосредственно из клинического материала, что значительно сократит время идентификации и исключит необходимость использования типоспецифических сывороток и иных трудоемких методов. Использование для характеристики штаммов *Leptospira* spp. метода секвенирования 16S рРНК с последующим филогенетическим анализом позволит выявить молекулярно-генетическую основу внутривидовой гетерогенности штаммов, а также с большим успехом решать такие эпидемиологические задачи, как поиск источника заражения, закономерности распространения инфекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы в Российской Федерации: современные особенности эпидемического проявления природных и техногенных очагов. Ветеринарная патология. 2004, 4: 54-57.
2. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Ваганова А.Н. Лептоспирозы: пособие для врачей. Санкт-Петербург, 2010.
3. Chappel R.J., Goris M., Palmer M.F. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 2004, 42: 5484-5488.
4. Cerqueira G.M., McBride A.J.A., Queiroz A. et al. Monitoring leptospira strain collections: The need for quality control. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010, 82 (1): 83-87.
5. Faine S., Adler B., Bolin C. *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne, Australia, 1999.
6. Morey R.E., Galloway R.L., Bragg S.L. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. J. Clin. Microbiol. 2006, 44: 3510-3516.
7. Postic D., Riquelme-Sertour N., Merien F. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. Res. Microbiol. 2000, 151 (5): 333-341.
8. Sagunan A. Risk factor associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. Indian J. Med. Res. 2009, 130 (1): 114-116.

*Поступила 10.04.15*

Контактная информация: Останкова Юлия Владимировна,  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)232-81-22



## СПЕКТР АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ОХА-КАРБАПЕНЕМАЗ СРЕДИ ШТАММОВ ACINETOBACTER BAUMANNII, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ ХИРУРГИЧЕСКИХ И РЕАНИМАЦИОННЫХ ОТДЕЛЕНИЙ В МОСКВЕ

Научный центр здоровья детей, Москва

*Цель.* Охарактеризовать спектр антибиотикорезистентности штаммов *Acinetobacter baumannii*, изолированных от пациентов 8 хирургических и реанимационных отделений 3 лечебных учреждений в городе Москва, и определить молекулярно-генетические механизмы устойчивости их карбапенем-резистентных форм. *Материалы и методы.* Исследовано 95 штаммов *A. baumannii*, изолированных от пациентов реанимационных и хирургических отделений города Москва в 2012 — 2014 годах. Чувствительность штаммов к антибиотикам была тестирована фенотипически согласно рекомендациям EUCAST. Наличие у исследуемых штаммов генов VIM, IMP, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-58 и NDM определяли при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени. *Результаты.* Нечувствительными к карбапенемам оказались 86,3% штаммов, чувствительными — 13,7%. К гентамицину были нечувствительны 80,0% штаммов, к нетилмицину — 80,0% штаммов, к ципрофлоксацину — 94,7% штаммов, к колистину — 2,1%. Нечувствительность к представителям двух и более классов антибиотиков проявляли 91,6% изолятов, представителям трех классов — 78,9% штаммов. Два штамма были панрезистентны, 4,2% (4/95) изолятов были чувствительны ко всем классам антибиотиков. Металло-β-лактамазы не были обнаружены. Гены карбапенемаз (OXA-23 и/или OXA-40) были выявлены у 85,3% (81/95) штаммов, охарактеризованных фенотипически как нечувствительные к карбапенемам. *Заключение.* Полученные результаты говорят о росте резистентности к карбапенемам и множественной резистентности у клинически значимых штаммов *A. baumannii*. Резистентность к карбапенемам ассоциирована с генами OXA-23 и OXA-40. Выводы позволяют обосновать перспективность внедрения технологий молекулярно-генетического тестирования антибиотикорезистентности.

Журн.микробиол., 2016, № 1, С. 40—45

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, антибиотики, резистентность, гены карбапенемаз

О.А.Крыжановская, А.В.Лазарева, И.В.Чеботарь, Ю.А.Бочарова, Н.А.Маянский

## SPECTRUM OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND PREVALENCE OF OXA-CARBAPENEMASES AMONG ACINETOBACTER BAUMANNII STRAINS, ISOLATED FROM PATIENTS OF SURGICAL AND REANIMATION DEPARTMENTS IN MOSCOW

Scientific Centre of Children's Health, Moscow, Russia

*Aim.* Characterize spectrum of antibiotics resistance of *Acinetobacter baumannii* strains, isolated from patients of 8 surgical and reanimation departments of 3 medical institution of Moscow, and determine molecular-genetic mechanisms of stability of their carbapenem-resistant forms. *Materials and methods.* 95 strains of *A. baumannii*, isolated from patients of reanimation and surgical departments of Moscow in 2012 — 2014, were studied. Sensitivity of strains to antibiotics was tested phenotypically according to recommendations of EUCAST. The presence of VIM, IMP, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-58 and NDM genes in the studied strains was determined by polymerase chain reaction in real time. *Results.* 86.3% of strains turned out to be non-sensitive to carbapenems, sensitive — 13.7%. 80.0% of strains were non-sensitive to gentamicin, 80.0% of strains — to netilmicin, 94.7% of strains — to ciprofloxacin, 2.1% — to colistin. 91.6% of isolates have shown non-sensitivity to members of 2 and more classes of antibiotics, 78.9% of strains — to members of 3 classes. 2 strains were panresistant, 4.2% (4/95) of the isolates were sensitive to all